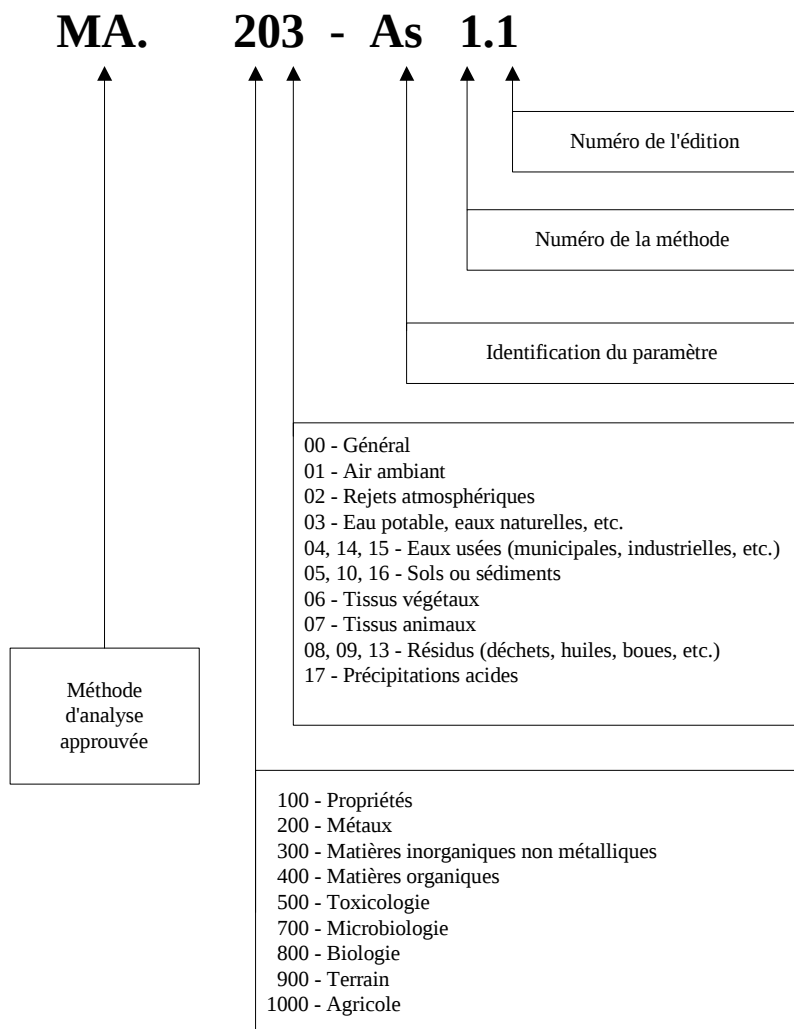


**MA. 800 – Chlor. 1.0**  
Édition : 2003-02-21

**Méthode d'analyse**  
Détermination de la chlorophylle *a* : méthode  
par fluorométrie

## Exemple de numérotation :



ÉDITION APPROUVÉE LE : 21 février 2003

### Historique de la méthode

Cette méthode remplace le document MENVIQ. 94.06/803 - Chlo. 1.1 Eaux - Détermination de la chlorophylle *a*; Dosage par fluorométrie 1994.

**Reproduction et traduction, même partielles, interdites sans l'autorisation du Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, ministère de l'Environnement du Québec.**

Ce document doit être cité de la façon suivante :

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC,  
Détermination de la chlorophylle *a* : méthode par fluorométrie. MA. 800 – Chlor. 1.0,  
Ministère de l'Environnement du Québec, 2003, 18 p.



## TABLE DES MATIÈRES

|                                               |    |
|-----------------------------------------------|----|
| INTRODUCTION                                  | 7  |
| 1. DOMAINE D'APPLICATION                      | 7  |
| 2. PRINCIPE ET THÉORIE                        | 7  |
| 3. FIABILITÉ                                  | 8  |
| 3.1. Interférence                             | 8  |
| 3.2. Limite de détection                      | 9  |
| 3.3. Limite de quantification                 | 9  |
| 3.4. Limite de linéarité                      | 9  |
| 3.5. Fidélité                                 | 10 |
| 3.6. Justesse                                 | 10 |
| 3.7. Sensibilité                              | 10 |
| 4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION                | 10 |
| 5. APPAREILLAGE ET MATÉRIEL                   | 11 |
| 6. RÉACTIFS ET ÉTALONS                        | 11 |
| 7. PROTOCOLE ANALYTIQUE                       | 11 |
| 7.1. Extraction des pigments                  | 11 |
| 7.2. Calibration du fluorimètre               | 12 |
| 7.3. Dosage de l'échantillon                  | 14 |
| 7.4. Contrôle de qualité                      | 15 |
| 7.5. Critères d'acceptabilité                 | 16 |
| 8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS         | 16 |
| 8.1. Limites à l'interprétation des résultats | 16 |
| 9. BIBLIOGRAPHIE                              | 17 |



## INTRODUCTION

La mesure de la chlorophylle *a* est utilisée comme indicateur de la biomasse phytoplanctonique dans les eaux naturelles. Elle représente le plus important pigment chez les organismes photosynthétiques aérobies (excluant les cyanobactéries); toutes les algues d'ailleurs en contiennent. Le contenu cellulaire en chlorophylle *a* est de 1 à 2 % en poids sec.

La méthode de dosage par fluorométrie a été élaborée à l'origine par Yentsch et Menzel (1963) et a été décrite par Holm-Hansen *et al.* (1965) et par Strickland et Parsons (1972). Elle a été élaborée pour une application en milieu marin, a l'avantage d'être très sensible et ne nécessite qu'un faible volume d'échantillon. Elle est préférée à la méthode spectrophotométrique, laquelle manque de sensibilité.

Il faut préciser, pour la compréhension, que les algues possèdent une diversité de pigments dont les plus importants sont les chlorophylles *a*, *b*, *c1*, *c2* et *d*. Il existe également des formes de dégradation des pigments chlorophylliens, qui sont les phéophytines *a*, *b* et *c*, les phéophorbides *a* et *b* ainsi que les chlorophyllides *a* et *b*. Les phéophorbides sont probablement la forme dominante des chlorophylles dégradées en eaux douces (Hallegraeff, 1976, 1977; Riemann, 1982), alors que les chlorophyllides sont particulièrement importantes en présence de diatomées (Jeffreys, 1974).

### 1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode s'applique à la détermination de la chlorophylle *a* dans les eaux de surface.

### 2. PRINCIPE ET THÉORIE

L'échantillon est filtré et les pigments sont recueillis sur un filtre et extraits dans l'acétone 90 %. La concentration de chlorophylle *a* est déterminée en mesurant la fluorescence émise à une longueur d'onde de 664 nm, à la suite d'une excitation à une longueur d'onde de 430 nm.

La méthode apporte une correction pour la présence de phéophytine *a*, laquelle absorbe à une longueur d'onde voisine de la chlorophylle *a*. La mesure fluorométrique est effectuée avant acidification (mesure de la chlorophylle *a*) et après une acidification qui transforme toute la chlorophylle *a* en phéophytine *a*, laquelle émet de la fluorescence avec moins d'intensité. Cette opération permet de corriger l'interférence de la phéophytine *a* sur la chlorophylle *a* et, du même coup, de doser la phéophytine *a*.

La calibration du fluorimètre est préalablement effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre et des solutions étalons de chlorophylle *a* pure. Les unités fluorométriques correspondantes peuvent alors être converties en concentration de chlorophylle *a*.

### 3. FIABILITÉ

#### 3.1. INTERFÉRENCE

La présence de pigments, qui absorbent à une longueur d'onde voisine de la chlorophylle *a*, peut entraîner une sous-estimation ou une surestimation de la concentration en chlorophylle *a*. Pour pallier ce problème, l'échantillon doit être dosé avant et après acidification. En milieu acide, l'atome de magnésium du noyau porphyrinique de la chlorophylle *a* est déplacé et la molécule résultante est la phéophytine *a*. Cette opération permet de corriger les valeurs fluorométriques obtenues pour la présence de phéophytine *a*.

La problématique du dosage de la chlorophylle *a* et de la phéophytine *a* est liée au chevauchement des spectres d'absorption ainsi que d'émission de fluorescence par les différentes formes de chlorophylles et de leurs intermédiaires de dégradation.

La méthode avec la correction pour la phéophytine *a* par acidification entraîne potentiellement une sous-estimation de la chlorophylle *a* et une surestimation de la phéophytine *a*, s'il y a présence dans l'échantillon de chlorophylle *b*. En effet, lors de l'acidification, la chlorophylle *b* est convertie en phéophytine *b*, laquelle est dosée comme étant de la phéophytine *a*, étant donné le chevauchement des spectres d'émission des phéophytines *a* et *b*. Si aucune correction n'est appliquée par le traitement d'acidification, le résultat est une surestimation de la chlorophylle *a*.

La présence de chlorophylle *c* entraîne l'effet inverse, c'est-à-dire une surestimation de la chlorophylle *a* (Lorenzen, 1981).

Il est connu (Loftus et Carpenter, 1971; APHA, 1995; Marker *et al.*, 1980) que l'application de la méthode fluorométrique en eaux douces est soumise à ces interférences. Par le passé, elles étaient considérées comme mineures (Lorenzen, 1967) dans la mesure où les populations algales étaient suffisamment diversifiées.

Tree *et al.* (1985) ont démontré que la méthode fluorométrique peut entraîner une sous-estimation moyenne de 39 % de la chlorophylle *a* en milieu marin. Toutefois, le biais causé par la méthode s'est avéré très variable selon la région de prélèvement et, dans certains cas, il y avait surestimation plutôt que sous-estimation.

Selon Arar (1994), la méthode fluorométrique peut sous-estimer jusqu'à 19 % la concentration de chlorophylle *a* lorsque le ratio chl. *a* : chl. *b* est de 1 : 1, et que la concentration en chlorophylle *a* est de 180 µg/l. Ces résultats ont été obtenus avec des solutions étalons ne contenant que des chlorophylles *a* et *b*. Toutefois, il faut mentionner qu'un ratio de 1 : 1 est le maximum pouvant être trouvé en milieu naturel.

Lors d'une étude réalisée dans notre laboratoire et utilisant des ajouts dosés pour déterminer le pourcentage de récupération de la chlorophylle *a* dans 101 échantillons d'eau de surface au cours de l'été 1999, nous avons démontré que le pourcentage de récupération médian est de 99,7 % pour un coefficient de variation de 18,7 %. Il est également intéressant de noter que le pourcentage de récupération médian présente des variations saisonnières, étant en surestimation à 107 % en mai et en sous-estimation à 95 % en juillet et août. Nos résultats démontrent donc que

globalement le problème de sous-estimation ou de surestimation n'est pas important dans les eaux de surface du Québec.

Lors d'une autre étude réalisée dans notre laboratoire sur 30 échantillons de périphyton, nous avons observé que la méthode fluorométrique a donné des résultats similaires ou légèrement surestimés par rapport à la méthode spectrophotométrique. Ces résultats sont cohérents avec l'observation de Arar (1994) selon laquelle la sous-estimation de la chlorophylle *a* n'est pas problématique en présence d'une dominance des diatomées.

Nos résultats démontrent que pour un ratio chl. *a* : chl. *b* variant entre 1 : 0,16 et 1 : 0,22 et un ratio chl. *a* : chl. *c* variant entre 1 : 0,64 et 1 : 0,92, les concentrations de chlorophylle *a* mesurées par la méthode fluorométrique sont équivalentes ou surestimées jusqu'à un maximum de 13 % par rapport à la méthode spectrophotométrique. Lorenzen (1981) a déjà souligné le fait qu'en présence de forte concentration de chlorophylle *c* (diatomées), l'effet sur le dosage de la chlorophylle *a* est une surestimation. En d'autres termes, lorsque les chlorophylles *b* et *c* sont présentes simultanément, il y a un effet d'annulation des interférences, ce qui confirme l'importance de la composition de la communauté algale sur la justesse des mesures.

Le niveau de sous-estimation (théorique) de 60 % rapporté par Welshmeyer (1994) pour la méthode fluorométrique semble exagéré et n'est pas confirmé par nos résultats ainsi que par l'étude de Arar (1994), qui rapporte une valeur maximale de 19 % dans les pires conditions (ratio 1/1 de chl. *a*/chl. *b*).

Les biais causés par la méthode fluorométrique sont variables et sont influencés par la composition de la communauté algale.

### 3.2. LIMITE DE DÉTECTION

La limite de détection instrumentale a été déterminée à 0,15 µg/l.

La limite de détection de la méthode, incluant l'étape de concentration de l'échantillon, a été déterminée à 0,006 µg/l pour un volume filtré de 250 ml.

### 3.3. LIMITE DE QUANTIFICATION

La limite de quantification de la méthode a été déterminée à 0,02 µg/l pour un volume filtré de 250 ml.

### 3.4. LIMITE DE LINÉARITÉ

La limite de linéarité connue pour cette méthode est de 250 µg/l.

### 3.5. FIDÉLITÉ

#### 3.5.1. Répétabilité

La répétabilité de l'ensemble de la procédure (extraction et dosage) est déterminée en effectuant 21 essais avec des volumes de 100 ml de culture d'algues (*Selenastrum capricornutum*). La répétabilité de la méthode exprimée en coefficient de variation est de 3,6 %.

### 3.6. JUSTESSE

La justesse a été déterminée à l'aide de deux solutions étalons de chlorophylle *a* pure à des concentrations de 15 et 60 µg/l. Les écarts observés par rapport aux valeurs étalons ont été respectivement de + 3,8 % et + 4,8 %.

Voir la section Interférence pour la justesse dans les échantillons d'eau de surface.

### 3.7. SENSIBILITÉ

La pente de la courbe d'étalonnage pour le niveau 1 de sensibilité a été déterminée à 10. Donc, 100 unités fluorométriques sont disponibles pour discriminer 10 µg/l de chlorophylle *a*.

## 4. **PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION**

Un volume de 250 ml d'échantillon doit être prélevé dans un contenant de 250 ml en polypropylène opaque. Aucun préservatif n'est ajouté.

Le contenant doit être rempli à ras bord, préservé sur glace et acheminé au laboratoire dans un délai de 48 heures. L'échantillon filtré (pigments déposés sur le filtre) peut être conservé au congélateur pour une période de 3 semaines.

Toutefois, il est préférable que l'échantillon soit filtré et extrait immédiatement dans l'acétone 90 %. L'extrait dans l'acétone peut être conservé indéfiniment au congélateur et à l'obscurité avant de procéder au dosage. Dans cette méthode, le filtre utilisé se dissout instantanément dans l'acétone. La réalisation simultanée des étapes de filtration et extraction est donc grandement facilitée par rapport à la technique utilisant le broyage d'un filtre de fibre de verre.

Le délai maximal de conservation de l'échantillon non traité est de 48 heures.

La chlorophylle *a* en solution aqueuse se dégrade rapidement en présence de lumière et à la température ambiante. Le rythme de dégradation peut être grandement réduit en conservant l'échantillon au froid et à l'obscurité.

## 5. APPAREILLAGE ET MATÉRIEL

Les marques de commerce apparaissant ci-dessous ne sont mentionnées qu'à titre de renseignement.

Le matériel utilisé doit être exempt de toute trace de contaminant organique, inorganique ou biologique. Une procédure de lavage adéquate est de rigueur.

- 5.1. Fluorimètre Sequoia-Turner modèle 450 ou autre fluorimètre équivalent
- 5.2. Spectrophotomètre
- 5.3. Équipement de filtration avec filtres Millipore 0,8 µm en acétate de cellulose et nitrate de cellulose
- 5.4. Tubes Vacutainer® stériles et sans additif de 15 ml en polypropylène avec capuchons 16 × 100 mm
- 5.5. Pincette

## 6. RÉACTIFS ET ÉTALONS

Tous les réactifs commerciaux utilisés sont de qualité A.C.S., à moins d'indication contraire.

L'eau utilisée pour la préparation des réactifs et des solutions toxiques de référence est de l'eau ultra-pure de type Milli-Q.

- 6.1. Solution d'acétone (grade A.C.S.) 90 % dans l'eau déminéralisée
- 6.2. Solution saturée de carbonate de magnésium ( $\text{MgCO}_3$ )  
Ajouter 1 g de  $\text{MgCO}_3$  en poudre fine dans 100 ml d'eau déminéralisée.
- 6.3. Solution mère de chlorophylle *a* (Sigma C-6144) à une concentration de 4 mg/l (conserver au congélateur)
- 6.4. Solutions étalons de chlorophylle *a* dans l'acétone 90 %, à des concentrations de 1, 2, 5, 10, 20, 50 et 100 µg/l
- 6.5. Acide chlorhydrique 0,2 N

## 7. PROTOCOLE ANALYTIQUE

### 7.1. EXTRACTION DES PIGMENTS

Appliquer 2 ml de solution saturée de carbonate de magnésium sur une membrane de 0,8 µm, et filtrer l'échantillon avec une pression maximum de 380 mm de Hg. Procéder avec une lumière

tamisée et éviter d'exposer l'échantillon trop longtemps à la lumière. Noter avec exactitude le volume filtré. Plier le filtre en quatre à l'aide de pincette et l'insérer dans un tube de 15 ml préalablement identifié et ajouter 10 ml d'acétone 90 %. Agiter au vortex et laisser dissoudre le filtre au réfrigérateur ou au congélateur pour une période minimum de 12 heures. Sous cette forme, l'échantillon peut être conservé plusieurs semaines.

L'usage de filtres qui se dissolvent complètement dans l'acétone simplifie beaucoup la procédure d'extraction et permet de conserver l'extrait presque indéfiniment avant de procéder au dosage.

## 7.2. CALIBRATION DU FLUORIMÈTRE

Préparer une solution mère de chlorophylle *a* pure à une concentration de 4 mg/l (Sigma C 6144). La concentration de la solution mère doit être déterminée précisément par spectrophotométrie.

- Déterminer la densité optique de la solution mère aux longueurs d'onde de 664, 647 et 630 nm pour évaluer les concentrations des chlorophylles *a*, *b* et *c* respectivement. Le dosage des chlorophylles *b* et *c* est effectué essentiellement pour s'assurer qu'il n'y a pas de contamination par les autres types de chlorophylles. Une lecture est également effectuée à 750 nm pour corriger l'interférence de la turbidité.
- Soustraire la valeur de densité optique obtenue à 750 nm des valeurs obtenues aux trois autres longueurs d'onde. Utiliser ces valeurs corrigées pour calculer les concentrations de chlorophylles *a*, *b* et *c* à l'aide des équations de la méthode trichromatique (Jeffrey et Humphrey, 1975) :
  - Chl. *a* (mg/l) : 11,85 (DO 664) - 1,54 (DO 647) - 0,08 (DO 630);
  - Chl. *b* (mg/l) : 21,03 (DO 647) - 5,43 (DO 664) - 2,66 (DO 630);
  - Chl. *c* (mg/l) : 24,52 (DO 630) - 7,60 (DO 647) - 1,67 (DO 664).
- Déterminer la densité optique aux longueurs d'onde de 664 nm avant acidification et de 665 nm après acidification avec 2 gouttes de HCl 2N/10 ml. Calculer la concentration de chlorophylle *a* corrigée pour la phéophytine en utilisant les équations de la méthode monochromatique (Lorenzen, 1967 : modifié) :
  - Chl. *a* (mg/l) : 26,7 (DO 664 av. - DO 665 ap.);
  - Phéophytine *a* (mg/l) : 26,7 (1,7 (DO 665 ap.) - (DO 664 av.)).
- Noter la concentration de chlorophylle *a* corrigée et procéder à une série de dilutions de la solution mère non acidifiée, de façon à obtenir des concentrations de 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 et 100 µg/l de chlorophylle *a* et déterminer les valeurs fluorométriques pour les différents niveaux de sensibilité de l'appareil.

- Pour chacun des niveaux de sensibilité, calculer un facteur de calibration pour convertir les unités fluorométriques en concentration de chlorophylle *a* :

$$F = Ca / Rs$$

où

F : facteur de calibration;  
Ca : concentration chlorophylle *a*;  
Rs : valeur fluorométrique.

- Calculer le facteur F moyen pour les 7 concentrations de chlorophylle *a*, pour chacun des niveaux de sensibilité.
- Selon la concentration de chlorophylle, l'usage de filtres atténuateurs neutres s'avère nécessaire pour réduire la transmittance et permettre le dosage.
- Ajuster ce facteur afin de corriger la concentration de l'échantillon (volume filtré vs volume d'extrait dans l'acétone), en fonction du filtre atténuateur du fluorimètre et en fonction de la dilution, s'il y a lieu :

$$F (ajusté) = \frac{Va}{Vf} \times F \times \frac{100}{atténuation} \times D$$

où

Va : volume acétone;  
Vf : volume d'échantillon filtré;  
D : facteur de dilution.

- Tracer une courbe de calibration avec les unités fluorométriques en ordonnée et les concentrations de chlorophylle *a* en abscisse.
- Acidifier les solutions étalons avec 2 gouttes de HCl 2N/10 ml et procéder à une nouvelle lecture fluorométrique. Déterminer le facteur T pour chacune des solutions de calibration :

$$T = Rb / Ra$$

où

T : rapport Rb/Ra pour une solution de chlorophylle *a* pure;  
Rb : mesure fluorométrique avant acidification;  
Ra : mesure fluorométrique après acidification.

- Déterminer ensuite un facteur T moyen pour les 7 solutions de calibration.

- Un facteur T de 1,7 ou plus est indicateur d'une solution de chlorophylle *a* pure exempte de phéophytine. Un facteur T se situant entre 1,0 et 1,7 est indicateur d'une solution mixte de chlorophylle *a* et de phéophytine.

La courbe de calibration doit être réalisée au début de la saison d'échantillonnage (mai). Le fluorimètre est un appareil stable et il n'est pas nécessaire de refaire la courbe de calibration à une fréquence très élevée. L'analyse des échantillons de contrôle (cf. 7.4.2) à chaque jour de dosage permet de valider l'adéquation de la courbe. Si les valeurs des contrôles deviennent au-delà de  $\pm 10\%$ , la courbe de calibration doit être refaite. Autrement, une nouvelle courbe de calibration sera constituée au trois mois.

### 7.3. DOSAGE DE L'ÉCHANTILLON

- Mettre l'appareil en marche environ 30 minutes avant de procéder aux dosages.
- Au début de chaque lot d'échantillons, un blanc est préparé comme suit : 2 ml de solution de carbonate de magnésium sont passés sur un filtre de 0,8  $\mu\text{m}$ . Le filtre est par la suite inséré dans un tube de 15 ml et 10 ml d'acétone 90 % sont ajoutés. Le tube est agité au vortex et conservé au congélateur. Ce blanc sera centrifugé en même temps que l'échantillon. Remplir la cuvette du fluorimètre avec 5 ml du blanc et ajuster la lecture fluorométrique à zéro pour le niveau de sensibilité (gain) qui est utilisé pour le dosage. Si ce niveau est changé au cours des dosages, réajuster le zéro avec le blanc.
- Sortir l'échantillon du réfrigérateur ou du congélateur. Centrifuger 15 minutes à 2 500 tr/min de façon à éliminer les particules en suspension.
- L'échantillon est prêt pour le dosage fluorométrique.
- Préparer une cuvette et y introduire 4 ml d'une solution standard de 100  $\mu\text{g/l}$  de chlorophylle *a* pure. La température de cette solution doit être ajustée à la même température que celle de l'échantillon lors du dosage.
- Ajuster la lecture de l'appareil à 1000 unités fluorométriques (U.F.) avec la solution de 100  $\mu\text{g/l}$  de chlorophylle *a* pure.
- Remplir la cuvette du fluorimètre avec 5 ml de l'échantillon et prendre la lecture fluorométrique.
- Acidifier l'échantillon avec 2 gouttes de HCl 2 N/10 ml et prendre de nouveau une lecture fluorométrique après 1 minute.
- Éviter d'exposer les échantillons à la lumière et procéder le plus rapidement possible afin de minimiser la dégradation de la chlorophylle *a* par la lumière et la chaleur.

## 7.4. CONTRÔLE DE QUALITÉ

### 7.4.1. Blanc de méthode

Le blanc de méthode constitué d'acétone à 90 % et d'un filtre dissous est mesuré avant le dosage de chaque lot d'échantillon. Il permet de procéder à l'ajustement du zéro de l'appareil. À noter que le blanc de méthode n'est pas réellement utile pour la détection de contamination par l'environnement du laboratoire. La chlorophylle se dégrade rapidement à la lumière et à la température de la pièce et elle ne constitue pas une source plausible de contamination environnementale.

### 7.4.2. Échantillon de contrôle

La justesse des mesures doit être vérifiée chaque jour lorsque des dosages sont réalisés à l'aide de deux solutions étalons de chlorophylle *a* pure dans l'acétone à des concentrations de 1, 5 et 50 µg/l. Deux de ces trois solutions sont choisies alternativement pour chacune des journées de dosage. Ces mesures permettent également de valider régulièrement l'adéquation de la courbe d'étalonnage.

### 7.4.3. Ajouts dosés

L'ajout dosé permet d'intégrer l'ensemble des interférences liées à la matrice et à la présence des autres types de chlorophylle et de pigments. Les variations temporelles de sous-estimation ou de surestimation en fonction de la composition taxinomique de la communauté algale peuvent ainsi être déterminées pour les conditions écologiques prévalant dans les rivières du Québec. L'ajout dosé remplace l'usage d'un matériau de référence. En effet, pour la chlorophylle *a*, il n'existe pas de matériaux de référence permettant de vérifier la justesse de l'analyse dans une matrice représentative des vrais échantillons.

Deux ajouts dosés de chlorophylle *a* pure dans l'acétone équivalant à une valeur approximative de 10 à 50 % de la concentration de l'échantillon doivent être intégrés dans la chaîne d'analyse selon la fréquence suivante :

- minimum de un par journée où il y a des analyses s'il y a moins de 20 échantillons;
- un à tous les 20 échantillons s'il y a plus de 20 échantillons dans la journée.

L'ajout dosé est additionné en un volume de 20 µl à un aliquot de l'échantillon de 4 ml de telle sorte que la modification apportée au volume total soit négligeable.

Aucun critère d'acceptabilité n'est lié à l'usage de l'ajout dosé. Il vise essentiellement à documenter les niveaux de sous-estimation ou de surestimation liés aux effets de matrice.

### 7.5. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ

Les résultats sont acceptables si les valeurs mesurées des échantillons de contrôle ne dévient pas plus de 10 % des valeurs attendues.

## 8. **CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS**

Les calculs de chlorophylle *a* et de la phéophytine *a* sont effectués comme suit :

$$\text{Chlorophylle } a = F \times \frac{T}{T-1} \times (Rb - Ra)$$

$$\text{Phéophytine } a = F \times \frac{T}{T-1} \times (TRa - Rb)$$

où

- F : voir la section 7.2;
- T : facteur T (Rb/Ra pour une solution pure de chlorophylle *a*);
- Rb : mesure fluorométrique avant acidification;
- Ra : mesure fluorométrique après acidification.

Un fichier Excel est utilisé pour le calcul des résultats.

### 8.1. LIMITES À L'INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Compte tenu de la nature de la méthode de dosage, l'utilisation de la mesure de phéophytine *a* devrait être remise en question et les termes chlorophylle total et chlorophylle active se doivent d'être abandonnés.

En effet, comme il vient d'être mentionné, la phéophytine *a* ne représente qu'une fraction des phéopigments totaux. La sommation de la chlorophylle *a* et de la phéophytine *a* ne peut être interprétée comme étant la chlorophylle *a* totale, puisqu'une partie de la chlorophylle *a* dégradée peut être sous forme de phéophorbide *a* ou de chlorophyllide *a*. De même, en présence de chlorophylle *b*, il y a surestimation de la phéophytine *a* causée par le chevauchement des spectres d'émission des phéophytines *b* et *a*, après le traitement d'acidification.

La chlorophylle *a* est une molécule spécifique et est, par définition, active au plan photosynthétique. Il n'existe pas de chlorophylle *a* inactive mais que de la phéophytine *a*. Le terme chlorophylle totale, tel qu'il est utilisé, réfère à la sommation de la chlorophylle *a* et de la phéophytine *a*. Ce terme porte à confusion, d'une part parce que la phéophytine *a* n'est pas de la chlorophylle *a*, et d'autre part parce qu'on pourrait associer faussement ce terme à la sommation des chlorophylles *a*, *b*, *c1*, *c2* et *d*, alors que ce n'est pas le cas.

Compte tenu de l'absence d'interprétation claire que l'on peut donner, la mesure de la phéophytine *a* n'apparaît pas très utile. Elle est effectuée uniquement pour corriger son interférence sur la chlorophylle *a*, et non pour sa valeur intrinsèque.

Comme il a été mentionné plus haut, la mesure de la chlorophylle *a* est soumise à des interférences inévitables en fluorométrie. Il faut donc être conscient que la justesse de la mesure varie en fonction de la composition taxinomique des algues (ratio chl. *a*, chl. *b*, chl. *c*) et que le résultat peut être une sous-estimation ou une surestimation. Il semblerait sage d'accorder une variation potentielle de  $\pm 15$  à 20 % autour de la mesure.

## 9. BIBLIOGRAPHIE

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION AND WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed., American Public Health Association, Washington, D.C., 1995.

ARAR, E.J., Evaluation of a new fluorometric technique that uses highly selective interference filters for measuring chlorophyll *a* in the presence of chlorophyll *b* and pheopigments, Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of Research and Development, USEPA, Cincinnati, 1994.

ARAR, E.J. and G.B. COLLINS, In vitro determination of chlorophyll *a* and pheophytine *a* in marine and freshwater phytoplankton by fluorescence, Method 445.0, Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of Research and Development, USEPA, Cincinnati, 1992.

HALLEGRAEFF, G.M., Pigment diversity in freshwater phytoplankton. I.A.: Comparison of spectrophotometric and paper chromatographic methods, Int. Rev. ges. Hydrobiol. 61 : 149-168, 1976.

HALLEGRAEFF, G.M., Pigment diversity in freshwater phytoplankton II, Summer succession in three Dutch lakes with different trophic characteristics, Int. Rev. ges. Hydrobiol. 62 : 19-39, 1977.

HANSON, L.A., Chlorophyll *a* determination of periphyton on sediments: Identification of problems and recommendation of method, Freshwater Biology, 20 : 347-342.

HOLM-HANSEN O., C.J. LORENZEN, R.W. HOLMES and J.D.H. STRICKLAND, Fluorometric determination of chlorophyll, J. Cons. perm. int. Explor. Mer., 30(1) : 3-15, 1965.

JEFFREY S.W., Profiles of photosynthetic pigments in the ocean using thin-layer chromatography, Mar. Biol. 26 : 101-110, 1974.

- JEFFREY S.W. and G.F. HUMPHREY, New spectrophotometric equations for determining chlorophyll *a*, *b*, *c*1 and *c*2 in higher plants, algae and natural phytoplankton, Biochem. Physiol. Pflanzen, Bd. 167 : 191-194, 1975.
- LEE, R.E., Phycology, Cambridge University Press. 478 p., 1980.
- LOFTUS M.E. and J.H. CARPENTER, A fluorometric method for determining chlorophyll *a*, *b* and *c*, J. Mar. Res. 29 : 319-338, 1971.
- LORENZEN, C.J., Determination of chlorophyll and pheopigments: Spectrophotometric equations, Limnol. Oceanogr. 12 : 343-346, 1967.
- LORENZEN, C.J., Chlorophyll *b* in the Eastern North Pacific Ocean, Deep Sea Res. 28A : 1049-1056, 1981.
- MARKER, A.F.H., E.A. NUSCH, H. RAI and B. RIEMANN, The measurement of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods: Conclusions and recommendations, Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 14 : 91-106, 1980.
- RIEMANN B., Measurement of chlorophyll *a* and its degradation products: A comparison of methods, Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 16: 19-24, 1982.
- ROTT, E., Spectrometric and chromatographic chlorophyll analysis: Comparison of results and discussion of the trichromatic method, Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol., 14 : 37-45, 1980.
- STRICKLANDS, J.D. and T.R. PARSONS, A practical handbook of seawater analysis, 2nd ed., Bull. Fish. Res. Bd. Can. 167, 1997.
- TREES, C.C., M.C. KENNICUTT and J.M. BROOKS, Errors associated with the standard fluorometric determination of chlorophylls and phaeopigments, Marine Chemistry, 17 : 1-12.
- USEPA, Quality control samples: Instruction for fluorometric analysis of chlorophyll, Environmental monitoring and support laboratory, Cincinnati, 1981.
- YENTSCH, C.S. and D.W. MENZEL, A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence, Deep-Sea Res., 10 : 221-231, 1963.
- WELSHMEYER, A.N., Improved chlorophyll *a* analysis: Single fluorometric measurement with no acidification, Moss Landing Marine Laboratory, ASLO Meeting, June 1994.