

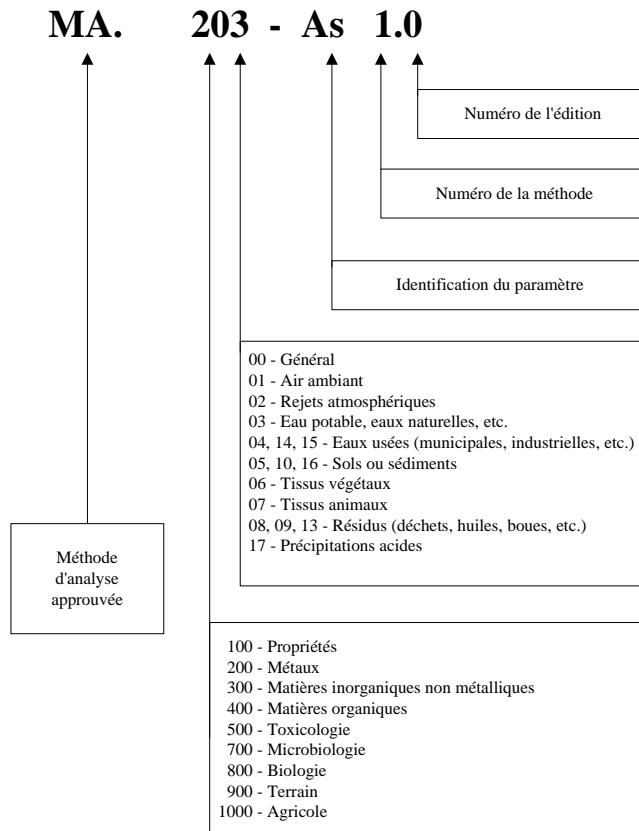
Méthode d'analyse



MA. 800 – Chlor. 1.0

Détermination de la chlorophylle *a* : méthode par fluorométrie

Exemple de numérotation :



La première édition d'une méthode est marquée de l'indice « 0 ». De façon usuelle, après quatre révisions successives, l'indice est augmenté de 1. Il peut également être élevé si une révision entraîne des modifications en profondeur de la méthode. La date de révision est suivie d'un chiffre qui indique le numéro de la révision en cours.

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,
Rév. 2, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 2012, 16 p.

Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec
2700, rue Einstein, bureau E.2.220
Québec (Québec) G1P 3W8

Téléphone : 418 643-1301
Télécopieur : 418 528-1091
Courriel : ceaeq@mddep.gouv.qc.ca

© Gouvernement du Québec, 2012

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	5
1. DOMAINE D'APPLICATION	5
2. PRINCIPE ET THÉORIE	5
3. FIABILITÉ	5
3.1. Interférence	5
3.2. Limite de détection	7
3.3. Limite de quantification	7
3.4. Limite de linéarité	7
3.5. Fidélité	7
3.6. Justesse	8
3.7. Sensibilité	8
4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION	8
5. APPAREILLAGE ET MATÉRIEL	8
6. RÉACTIFS ET ÉTALONS	9
7. PROTOCOLE ANALYTIQUE	10
7.1. Extraction des pigments	10
7.2. Calibration du fluorimètre	10
7.3. Dosage de l'échantillon	12
7.4. Contrôle de qualité	13
7.5. Critères d'acceptabilité	13
8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS	13
8.1. Limites à l'interprétation des résultats	14
9. BIBLIOGRAPHIE	14

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).

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. Elle présente 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.

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 algues sont recueillies sur un filtre et extraites dans l'acétone 90 %. La concentration de chlorophylle *a* est déterminée en mesurant la fluorescence émise à une longueur d'onde > 665 nm, à la suite d'une excitation à une longueur d'onde de 340 – 500 nm. [La longueur d'onde peut varier légèrement selon le modèle de fluorimètre utilisé.](#)

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*.

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*. Inversement, 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 [l'interférence des autres pigments sur le dosage](#) de la chlorophylle *a* dans 101 échantillons d'eau de surface au cours de l'été 1999, nous avons démontré que le pourcentage de [sous-estimation](#) médian est de [0,3 %](#) pour un coefficient de variation (C.V.) de 18,7 %. Il est également intéressant de noter que [l'interférence](#) présente des variations saisonnières, étant en surestimation de [7 %](#) en mai et en sous-estimation de [5 %](#) 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 0,06 µg/l.

La limite de détection de la méthode, incluant l'étape de concentration de l'échantillon et l'extraction a été déterminée à 0,04 µg/l pour un volume filtré de 100 ml.

3.3. LIMITE DE QUANTIFICATION

La limite de quantification de la méthode a été déterminée à 0,15 µg/l pour un volume filtré de 100 ml.

3.4. LIMITE DE LINÉARITÉ

La limite de linéarité est de 250 µg/l pour le [fluorimètre en usage](#) (Turner-Designs TD-700).

3.5. FIDÉLITÉ

3.5.1. Répliquabilité

La répliquabilité de l'ensemble de la procédure (extraction et dosage) a été déterminée en effectuant 10 essais avec des volumes de 100 ml de culture d'algues (*Pseudokirchneriella subcapitata*). La répliquabilité de la méthode pour un échantillon de densité cellulaire de 80 000 cell/ml est de 4,4 µg/l ± 0,19 (C.V. = 5,4 %). La répliquabilité de la méthode pour un échantillon de densité cellulaire de 500 000 cell/ml est de 27 µg/l ± 1,4 (C.V. = 6,4 %).

3.5.2. Répétabilité

La répétabilité pour un échantillon de densité cellulaire de 80 000 cell/ml est de $4,3 \mu\text{g/l} \pm 0,18$ (C.V. = 7,8 %) et de $27 \mu\text{g/l} \pm 0,97$ (C.V. = 6,4 %) pour un échantillon de densité cellulaire de 500 000 cell/ml.

3.6. JUSTESSE

La justesse a été déterminée à l'aide d'une solution étalon certifiée de chlorophylle *a* à une concentration de 3,68 $\mu\text{g/l}$. L'écart observé par rapport à la valeur étalon a été de - 1,4 %.

3.7. SENSIBILITÉ

Pour le fluorimètre Turner-Designs TD-700, l'échelle de mesure est de 1 000 unités fluorométriques et la sensibilité utilisée couramment est de 10, soit 1 $\mu\text{g/l}$ de chlorophylle *a* pour 10 unités fluorométriques.

4. **PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION**

Un volume d'environ 225 ml d'échantillon doit être prélevé dans un contenant de 250 ml en polypropylène opaque. Aucun préservatif n'est ajouté et la bouteille ne doit pas être remplie à ras bord de façon à permettre le brassage de l'échantillon pour en assurer l'homogénéité.

L'échantillon doit être impérativement conservé au froid (près de 4 °C) et être acheminé au laboratoire le plus tôt possible. L'extraction doit être effectuée dans un délai n'excédant pas 72 heures après le prélèvement et elle est effectuée immédiatement après la filtration. L'extrait dans l'acétone est conservé 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.

À noter que l'échantillon filtré (pigments déposés sur le filtre) pourrait être conservé au congélateur pour une période de 3 semaines avant l'extraction.

La chlorophylle *a* se dégrade rapidement à la température ambiante et en présence de lumière. Il est donc impératif de conserver les échantillons 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 Turner-Designs modèle TD-700 ou un autre fluorimètre équivalent

- 5.2. Spectrophotomètre [\(si des solutions étalons certifiées ne sont pas disponibles\)](#)
- 5.3. Équipement de filtration
- 5.4. Filtres Millipore 0,8 µm en acétate de cellulose et nitrate de cellulose
- 5.5. Cuvettes en borosilicate de 13 mm x 100 mm
- 5.6. Centrifugeuse de table
- 5.7. Vortex
- 5.8. Tube conique de 15 ml en polypropylène
- 5.9. Pincette

6. RÉACTIFS ET ÉTALONS

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

L'eau utilisée pour la préparation des réactifs et des solutions étalons est de l'eau ultrapure de type Milli-Q.

- 6.1. Solution d'acétone (grade ACS) 90 % dans l'eau ultrapure
- 6.2. Solution saturée de carbonate de magnésium ($MgCO_3$)

Ajouter 1 g de $MgCO_3$ en poudre fine dans 100 ml d'eau ultrapure.

- 6.3. [Solution étalon certifiée](#) de chlorophylle *a* [de Turner-Designs; si non disponible, utiliser de la chlorophylle a](#) de Sigma (n° C-6144), 1 mg sous forme solide, conservée entre -20 °C et -70 °C à l'obscurité [et préparer la solution mère maison comme il est spécifié](#) à la section 6.4.
- 6.4. Solution mère [maison](#) à 2 mg/l de chlorophylle *a* préparée dans l'acétone 90 % (1 mg/500 ml) et conservée à -20 °C à l'obscurité. Cette solution est préparée en début de saison et est renouvelée chaque année. [Cette solution est nécessaire seulement s'il n'y pas de solution étalon certifiée disponible.](#)
- 6.5. Solutions étalons [de travail](#) de chlorophylle *a* dans l'acétone 90 %, à des concentrations [se situant autour](#) de 1, 3, 5, 10, 50 [et 100](#) µg/l pour faire la courbe de calibration [et servir d'échantillons de contrôle de la qualité \(préparés soit à l'aide d'une solution étalon certifiée ou d'une solution mère maison\).](#)
- 6.6. Acide chlorhydrique 0,2 N

7. PROTOCOLE ANALYTIQUE

7.1. EXTRACTION DES PIGMENTS

Mouiller un filtre de 0,8 µm avec 2 ml de solution saturée de carbonate de magnésium juste avant de filtrer l'échantillon avec une pression maximum de 380 mm de Hg. Procéder sous 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.

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

7.2.1. Validation de la concentration de chlorophylle a de la solution mère maison

Cette étape est nécessaire seulement s'il n'y pas de solution étalon certifiée disponible.

Préparer une solution mère de chlorophylle *a* pure à une concentration de 2 mg/l (Sigma C 6144). La concentration de cette solution 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. Déterminer également la densité optique à 665 nm, cette valeur étant utilisée dans les équations monochromatiques. 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 quatre 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 à 665 nm après acidification avec 2 gouttes de HCl 0,2N/10 ml. Calculer la concentration de chlorophylle *a* corrigée pour la

phéophytine en utilisant les équations de la méthode monochromatique¹ (Lorenzen, 1967 : modifié) et en appliquant les valeurs de DO corrigées pour la turbidité (incluant DO 665 ap.) :

- 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.

7.2.2. Calibration du fluorimètre

- Procéder à une série de dilutions de la solution étalon certifiée (ou de la solution mère préparée en 6.4. et dont la concentration a été validée en 7.2.1.) de façon à obtenir des concentrations se situant autour de 1, 3, 5, 10, 50 et 100 µg/l de chlorophylle *a* et déterminer les valeurs fluorométriques pour le niveau de sensibilité choisi (généralement 1 µg/l pour 10 UF).
- 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* attendue;
Rs : valeur fluorométrique mesurée.

- Calculer un facteur F moyen pour les 6 concentrations de chlorophylle *a*.
- Corriger les valeurs de chlorophylle *a* en multipliant chaque valeur de fluorescence par le facteur de calibration F moyen.
- Tracer une courbe de calibration avec les concentrations de chlorophylle *a* corrigées en ordonnée et les concentrations de chlorophylle *a* attendues en abscisse. La pente de la courbe doit être le plus près possible de 1.
- Acidifier les solutions étalons avec 2 gouttes (pipette Pasteur) ou 60 µl de HCl 0,2 N, agiter au vortex 10 secondes, attendre 30 secondes et procéder à une nouvelle lecture fluorométrique. Déterminer le facteur T pour chacune des solutions de calibration :

$$T = Rb / Ra$$

¹ Les équations monochromatiques présentées ici ne tiennent pas compte des volumes d'extractant et d'échantillon comme c'est normalement le cas puisqu'elles s'appliquent sur une solution mère dans l'acétone, donc non extraite. La cuvette utilisée à une largeur de 1 cm.

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 6 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. Le facteur T doit minimalement être supérieur à 1,6.

Une courbe de calibration doit être réalisée une fois par mois au cours de la saison d'analyse. 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 de la qualité (cf. 7.4.2.) à chaque jour de dosage permet de valider l'adéquation de la courbe (cf. 7.5.).

7.3. DOSAGE DE L'ÉCHANTILLON

7.3.1. Dosage avec le fluorimètre (TD-700)

- Mettre l'appareil en marche pour la période de préchauffage (environ 20 minutes) avant de procéder [à la calibration et](#) aux dosages.
- [Sortir les trois solutions étalons qui serviront à la calibration à un point et comme contrôles de la qualité. Ces solutions doivent être ramenées à la température ambiante avant le dosage. Sortir également du congélateur un blanc de méthode \(cf. 7.4.1.\) et centrifuger 15 minutes à 2 500 tr/min.](#)
- Procéder à une calibration [à un point](#) « simple mode » chaque jour de dosage en préparant une cuvette avec 4 ml d'une solution étalon [autour](#) de 50 µg/l de chlorophylle *a* pure et ajuster la lecture de l'appareil en unités fluorométriques ([ex. : 50 µg/l doit donner 500 U.F.](#)). [Lorsque l'appareil demande le blanc, utiliser un blanc de méthode.](#)
- [Remplir la cuvette du fluorimètre avec le blanc, prendre la lecture fluorométrique et indiquer à l'appareil de soustraire cette valeur de toutes les autres valeurs mesurées ou utiliser ce blanc pour ajuster l'appareil à zéro U.F.](#)
- [Procéder au dosage des trois solutions étalons en mode normal et noter les résultats avant et après acidification, comme décrit en 7.2.2. \(2 gouttes \[pipette Pasteur\] ou 60 µl de HCl 0,2 N, agiter au vortex 10 secondes, attendre 30 secondes\).](#)
- Sortir les échantillons du congélateur et centrifuger 15 minutes à 2 500 tr/min de façon à éliminer les particules en suspension.

- [Remplir la cuvette du fluorimètre avec 4 ml d'échantillon centrifugé et prendre la mesure fluorométrique. Acidifier l'échantillon comme décrit préalablement et prendre la lecture fluorométrique après acidification.](#)
- [Procéder de la même façon avec tous les échantillons.](#)

7.4. CONTRÔLE DE QUALITÉ

7.4.1. Blanc de méthode

Un blanc de méthode [est](#) constitué d'acétone à 90 % et d'un filtre dissous [vierge. Il](#) est mesuré avant le dosage de chaque lot d'échantillon.

7.4.2. Échantillon de contrôle

Chaque jour [d'analyse](#), trois solutions étalons de chlorophylle *a* à des concentrations [se situant dans la plage habituelle de dosage](#) (ex : 3, 10 et 50 µg/l) sont analysées. Ces mesures permettent de valider l'adéquation de la courbe d'étalonnage.

7.4.3. Duplicatas de méthode

[Un duplicata de méthode est effectué tous les 15 échantillons en effectuant deux filtrations/extractions distinctes sur le même échantillon.](#)

7.5. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ

Les résultats des [échantillons de contrôle](#) ne doivent pas dévier de plus de 10 % des valeurs attendues. Si c'est le cas, la courbe de calibration doit être refaite et l'échantillon dosé de nouveau.

Les résultats des duplicatas [de méthode](#) ne doivent pas présenter d'écart de plus de [30](#) %.

8. **CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS**

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

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

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

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;

V_{ex} : volume d'extractant

V_{éch} : volume d'échantillon filtré

D : dilution

Un fichier Excel est utilisé pour le calcul des résultats avec le TD-700.

8.1. LIMITES À L'INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L'interprétation des mesures de chlorophylle *a* et de phéophytines *a* comme étant de la chlorophylle active (chl.*a*) et chlorophylle totale (chl.*a* + phéo.) n'est pas justifiable.

La phéophytine *a* ne représente qu'une fraction des pigments de dégradation de la chlorophylle *a*. Cette dernière se dégrade également 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. De plus, le terme chlorophylle totale porte à confusion et pourrait être associé faussement à la sommation des chlorophylles *a*, *b*, *c1*, *c2* et *d*.

Par ailleurs, des concentrations élevées en phéophytine *a* pourrait être un indicateur d'une dégradation de la chlorophylle *a* à la suite d'une mauvaise conservation de l'échantillon.

Compte tenu de l'absence d'interprétation claire que l'on peut donner, la mesure de la phéophytine *a* n'est généralement pas utilisée en termes d'interprétation écologique. Elle sert essentiellement pour corriger son interférence sur la chlorophylle *a*.

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, c1 and c2 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.