

**MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT,
DE LA LUTTE CONTRE
LES CHANGEMENTS CLIMATIQUES,
DE LA FAUNE ET DES PARCS**

Méthode d'analyse

**Détermination de la chlorophylle *a* :
méthode par fluorimétrie**

MA. 800 – Chlor. 2.0

2022-01-05

Coordination et rédaction

Cette publication a été réalisée par la Direction générale de la coordination scientifique et du Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (DGCSCAEQ) du ministère de l'Environnement, de la Lutte contre les changements climatiques, de la Faune et des Parcs (MELCCFP). Elle a été produite par la Direction des communications du MELCCFP.

Renseignements

Téléphone : 418 521-3830
1 800 561-1616 (sans frais)

Télécopieur : 418 646-5974
Formulaire : www.environnement.gouv.qc.ca/formulaires/reenseignements.asp
Internet : www.environnement.gouv.qc.ca

Pour obtenir un exemplaire du document :

Visitez notre site Web : www.environnement.gouv.qc.ca

Dépôt légal – 2022
Bibliothèque et Archives nationales du Québec
ISBN 978-2-550-93565-0 (PDF)

Tous droits réservés pour tous les pays.

© Gouvernement du Québec – 2022

Table des matières

1. Domaine d'application	1
2. Principe et théorie	1
3. Interférence	1
4. Conservation	2
5. Matériel et appareillage	2
6. Réactifs et étalons	3
6.1 Acétone, C ₃ H ₆ O (CAS n° 67-64-1)	3
6.2 Carbonate de magnésium, MgCO ₃ (CAS n° 546-93-0)	3
6.3 Solutions étalons certifiées de chlorophylle a	3
6.4 Solution mère maison de chlorophylle a	3
6.5 Solutions étalons de travail de chlorophylle a	3
6.6 Acide chlorhydrique 0,2N (CAS n° 7647-01-0)	4
7. Protocole d'analyse	4
7.1 Préparation du matériel	4
7.2 Préparation des échantillons	5
7.3 Purification des échantillons	5
7.4 Étalonnage et dosage	5
8. Calcul et expression des résultats	7
9. Critères d'acceptabilité	7
10. Références bibliographiques	8

1. Domaine d'application

Cette méthode par fluorimétrie sert à déterminer la concentration de chlorophylle *a* présente dans les eaux de surface.

La gamme de concentration applicable se situe entre 0,16 et 239 microgrammes par litre ($\mu\text{g/l}$). Des concentrations plus élevées peuvent être rapportées en appliquant des dilutions appropriées aux échantillons avant le dosage. La limite de détection de cette méthode est de 0,05 $\mu\text{g/l}$.

2. Principe et théorie

Un échantillon d'eau de surface est filtré sur une membrane afin de recueillir les algues. La membrane filtrante est ensuite déposée dans l'acétone à 90 % pour en extraire la chlorophylle *a*. La concentration de chlorophylle *a* est finalement déterminée à l'aide d'un lecteur de microplaque en mesurant la fluorescence émise à une longueur d'onde de 680 nanomètres (nm), à la suite d'une excitation à une longueur d'onde de 436 nm (Welschmeyer, 1994). Les bandes passantes pour l'excitation et l'émission ne doivent pas excéder 20 nm. Différents modèles de fluorimètres à microplaque, utilisant soit des filtres, soit un monochromateur pour la sélection des longueurs d'onde, peuvent convenir. Selon le type de fluorimètre utilisé et l'ajustement de la sensibilité (« gain » en anglais), la valeur inférieure (ou limite de quantification, LQM) et la valeur supérieure de la gamme de concentration applicable, ainsi que la limite de détection de la méthode (LDM), peuvent varier. Les appareils à filtres permettent d'atteindre des valeurs de LDM et de LQM plus basses et offrent une plus grande justesse.

3. Interférence

Tous les pigments chlorophylliens et leurs produits de dégradation ont leur propre spectre d'absorption et d'émission. Toutefois, en raison de leur structure chimique similaire, ces spectres se chevauchent significativement. La présence de pigments, qui absorbent à une longueur d'onde voisine de la chlorophylle *a*, peut donc entraîner une sous-estimation ou une surestimation de la concentration de chlorophylle *a*.

Par le passé, la méthode avec la correction pour la phéophytine *a* par acidification a beaucoup été utilisée. Cependant, cette méthode 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 en présence de chlorophylle *b*, le résultat est une surestimation de la chlorophylle *a*. En présence de chlorophylle *c*, l'acidification entraîne l'effet inverse, c'est-à-dire une surestimation de la chlorophylle *a* (Lorenzen, 1981).

En ciblant des zones du spectre plus étroites autour des pics d'absorption et de fluorescence de la chlorophylle *a*, il est toutefois possible de réduire considérablement les interférences associées aux autres pigments chlorophylliens (Welschmeyer, 1994). La méthode sans acidification a ainsi l'avantage d'être plus précise pour la concentration de chlorophylle *a*. Par contre, elle ne permet pas de fournir un résultat pour la phéophytine *a*.

L'utilisation d'un lecteur de microplaque nécessite des précautions particulières pour réduire au maximum l'évaporation des échantillons pendant le remplissage de la plaque. Des manipulations inadéquates risquent d'entraîner une évaporation du solvant (l'acétone) et une augmentation du signal menant à une surestimation de la chlorophylle *a* (Mandalakis *et al.*, 2017).

4. Conservation

Les échantillons sont prélevés dans un contenant opaque de polypropylène (ou autre) non toxique, neuf ou ayant subi un lavage approprié. Un échantillon de 225 ml est requis pour réaliser l'analyse. Le contenant ne doit pas être rempli à ras bord de façon à permettre le brassage et, ainsi, l'homogénéisation de l'échantillon. De plus, les échantillons ne doivent pas être congelés avant leur filtration.

Les échantillons sont conservés jusqu'à l'extraction de la chlorophylle *a* selon les modalités suivantes :

Nature de l'échantillon	Conditions de conservation	Délais de conservation
Eau de surface	Environ 4 °C, obscurité, aucun agent de conservation	72 h
	≤ 10 °C, obscurité, aucun agent de conservation	48 h

L'extraction doit être effectuée dans un délai n'excédant pas 48 ou 72 heures après le prélèvement et elle est effectuée immédiatement après la filtration. On doit conserver l'extrait dans l'acétone au congélateur (-20 °C) et à l'obscurité avant de procéder au dosage. Il faut attendre, au minimum, 24 heures avant d'effectuer le dosage. Il est recommandé d'effectuer le dosage dans les 30 jours suivant l'extraction. Le délai maximal de conservation des extraits est de trois mois suivant l'extraction (Wasmund *et al.*, 2006).

Dans cette méthode, la membrane filtrante utilisée se dissout instantanément dans l'acétone. La réalisation simultanée des étapes de filtration et d'extraction est donc grandement facilitée par rapport à la technique utilisant le broyage d'un filtre de fibre de verre.

Si l'extraction dans l'acétone ne peut être faite tout de suite après la filtration, la congélation rapide de la membrane filtrante dans l'azote liquide, puis l'entreposage à -80 °C, permet une conservation jusqu'à trois mois. Si l'azote liquide est utilisé seul, la membrane filtrante peut être conservée jusqu'à deux mois avant d'être extraite dans l'acétone (Wasmund *et al.*, 2006). La congélation à -20 °C de la membrane filtrante peut être acceptable, mais uniquement pour une conservation d'au plus trois à quatre semaines avant l'extraction dans l'acétone. En effet, une congélation de la membrane filtrante à -20 °C ne permet pas d'inhiber complètement l'activité enzymatique menant à la dégradation de la chlorophylle (Aminot et Rey, 2001).

5. Matériel et appareillage

Les marques de commerce qui apparaissent ci-dessous ne sont mentionnées qu'à titre de renseignement. Un modèle équivalent d'un autre fabricant peut également être utilisé.

Le matériel utilisé doit être exempt de toute trace de contaminant et une procédure de lavage adéquate est de rigueur :

1. Fluorimètre à microplaque Biotek LX ou un autre fluorimètre à microplaque équivalent (à filtres ou à monochromateur, permettant une excitation à 436 nm, une lecture à 680 nm et une bande passante d'au plus 20 nm);
2. Spectrophotomètre (si des solutions étalons certifiées ne sont pas disponibles);

3. Équipement de filtration;
4. Membranes filtrantes Millipore 0,8 µm en acétate de cellulose et nitrate de cellulose;
5. Microplaque 96 puits en polypropylène noir à fond plat;
6. Centrifugeuse;
7. Vortex;
8. Tube conique de 15 ml en polypropylène avec couvercle.

6. Réactifs et étalons

Tous les solvants utilisés sont de qualité ACS ou l'équivalent. 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 Acétone, C₃H₆O (CAS n° 67-64-1)

Préparer une solution d'acétone à 90 % dans l'eau ultrapure. Cette solution est conservée à la température de la pièce.

6.2 Carbonate de magnésium, MgCO₃ (CAS n° 546-93-0)

Préparer une solution saturée de carbonate de magnésium en ajoutant 1 g de carbonate de magnésium (MgCO₃) en poudre fine dans 100 ml d'eau ultrapure. Cette solution est conservée à la température de la pièce et une solution fraîche est préparée hebdomadairement.

6.3 Solutions étalons certifiées de chlorophylle a

Si des solutions étalons certifiées ne sont pas disponibles, il faut préparer une solution mère maison (cf. 6.4). **Les solutions de chlorophylle a certifiées doivent être conservées selon les directives du fabricant. Les ampoules non ouvertes sont donc conservées à l'obscurité, entre -20 °C et -70 °C, pour une durée maximale de 12 mois.**

6.4 Solution mère maison de chlorophylle a

Préparer une solution mère maison à 2 mg/l dans l'acétone à 90 % à partir de chlorophylle a sous forme solide (CAS n° 479-61-8). La concentration de cette solution doit être déterminée précisément par spectrophotométrie (cf. 7.1.1). **Cette solution mère de chlorophylle a doit être conservée à l'obscurité, entre -20 °C et -70 °C, pour une durée maximale de 12 mois.**

6.5 Solutions étalons de travail de chlorophylle a

Procéder à une série de dilutions des solutions étalons certifiées (ou de la solution mère mentionnée à la section 6.4 et dont la validation de la concentration est expliquée à la section 7.1.1.) de façon à obtenir cinq solutions étalons de travail aux concentrations se situant autour de 1, 3, 10, 20 et 50 µg/l de chlorophylle a. Noter précisément les valeurs de préparation. **Ces solutions étalons de travail de chlorophylle a doivent être conservées à l'obscurité, entre -20 °C et -70 °C, pour une durée maximale de six mois.**

6.6 Acide chlorhydrique 0,2N (CAS n° 7647-01-0)

7. Protocole d'analyse

7.1 Préparation du matériel

7.1.1 Validation de la concentration de chlorophylle a de la solution mère maison par spectrophotométrie

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

- 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 avoir acidifié la solution mère en ajoutant deux gouttes de HCl 0,2 N/10 ml directement dans la cuvette. Calculer la concentration de chlorophylle *a* corrigée pour la phéophytine en utilisant les équations de la méthode monochromatique (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.

7.1.2 Validation des solutions étalons de travail par fluorimétrie

Note : Effectuer les mesures de validation de chaque solution étalon de travail sur la même microplaque. Utiliser une microplaque pour valider une ou deux solutions étalons à la fois.

- Déterminer les valeurs fluorimétriques, pour le niveau de sensibilité choisi (gain), pour chacune des cinq solutions étalons de travail mentionnées à la section 6.5 en effectuant 10 lectures de chacune des concentrations d'environ 1, 3, 10, 20 et 50 µg/l de chlorophylle *a*. Déterminer également les valeurs fluorimétriques des solutions étalons certifiées, lorsqu'elles sont disponibles, sur chaque microplaque utilisée pour la validation.

2. À l'aide des solutions étalons certifiées (ou à l'aide des solutions étalons de travail préparées avec une solution mère maison), calculer un facteur de calibration moyen par microplaque pour convertir les unités fluorimétriques en concentrations de chlorophylle *a* :

$$F = Ca / Rs$$

où

- F : facteur de calibration;
Ca : concentration de chlorophylle *a* attendue;
Rs : valeur fluorimétrique mesurée.

3. Calculer la concentration de chlorophylle *a* corrigée des solutions étalons de travail en multipliant les valeurs fluorimétriques mesurées par le facteur de calibration moyen (F moyen). Faire une moyenne des valeurs obtenues pour chacune des solutions étalons de travail. Ces concentrations corrigées seront les nouvelles valeurs attendues utilisées dans les courbes d'étalonnage lors des dosages.

7.2 Préparation des échantillons

La préparation des échantillons consiste en l'extraction de la chlorophylle. Pour ce faire, il faut procéder selon les étapes suivantes :

1. Mouiller une membrane filtrante de 0,8 µm avec 2 ml de solution saturée de carbonate de magnésium (cf. 6.2).
2. Homogénéiser l'échantillon en agitant la bouteille et filtrer 100 ml d'échantillon avec une pression maximale de 50 kPa (380 mm Hg ou 0,5 bar). Procéder rapidement et éviter d'exposer l'échantillon trop longtemps à la lumière.
3. Noter avec exactitude le volume filtré, la présence de débris ou d'autres observations.
4. Plier la membrane en quatre à l'aide d'une pincette, l'insérer dans un tube de 15 ml préalablement identifié et ajouter 10 ml d'acétone à 90 %.
5. Agiter vigoureusement au vortex jusqu'à ce que la membrane se brise, puis laisser dissoudre cette dernière au congélateur pour une période minimale de 24 heures afin d'assurer une bonne extraction de la chlorophylle.

7.3 Purification des échantillons

Juste avant d'effectuer les mesures au fluorimètre, les extraits de chlorophylle doivent être agités vigoureusement au vortex puis centrifugés pendant 15 minutes à 1 175 g de façon à éliminer les particules en suspension et à clarifier les extraits.

7.4 Étalonnage et dosage

Une courbe d'étalonnage, des blancs d'appareil, un blanc de méthode (contrôle négatif), des duplicatas et un contrôle positif sont réalisés sur chaque microplaque. Il faut déposer le contrôle en premier, ensuite charger les échantillons et leurs duplicatas, et terminer avec les blancs et la courbe d'étalonnage. Un modèle de microplaque est proposé à la figure 1.

Lors du chargement d'une microplaque, il faut prendre soin, au fur et à mesure, de cacher les puits déjà remplis de la lumière et réduire l'évaporation de l'acétone. Il est donc nécessaire d'utiliser des bandelettes autocollantes, ou un système similaire, pour sceller les rangées remplies jusqu'au moment de la lecture.

De plus, la microplaque doit être gardée sur la glace pendant le chargement pour maintenir l'acétone froide et, ainsi, réduire davantage sa vitesse d'évaporation.

Une fois remplie, il faut laisser la microplaque se tempérer une minute et demie sur le comptoir avant de retirer l'ensemble des bandelettes et d'insérer la microplaque dans le lecteur. La lecture de l'ensemble de la microplaque s'effectue immédiatement après cette période (excitation à 436 nm et lecture à 680 nm). Par la suite, les calculs sont effectués de la façon suivante :

1. À partir des valeurs fluorimétriques obtenues pour chacune des cinq solutions étalons de travail, calculer un facteur de calibration moyen pour la microplaque afin de convertir les unités fluorimétriques en concentrations de chlorophylle *a* :

$$F = Ca / Rs$$

où

- F : facteur de calibration;
 Ca : concentration de chlorophylle *a* attendue;
 Rs : valeur fluorimétrique mesurée.

2. Appliquer ce facteur de calibration moyen à l'ensemble des échantillons, des solutions étalons, des blancs et du contrôle de la plaque.
3. Tracer une courbe d'étalonnage avec les concentrations de chlorophylle *a* calculées en ordonnée et les concentrations de chlorophylle *a* attendues en abscisse. La pente de la courbe devrait être entre 0,9 et 1,1 et le R² doit être supérieur à 0,995.

Figure 1. Exemple de microplaque (Ctrl : solution étalon certifiée servant de contrôle positif, E1 à E5 : solutions étalons de travail pour la courbe d'étalonnage de chlorophylle *a*, T : blanc de méthode [contrôle négatif], n : échantillon #n, ndup : duplicata d'analyse de l'échantillon #n, BI : blanc d'appareil [acétone à 90 %] à soustraire de toutes les valeurs)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ctrl	T	7	15	22	30	37	45	52	60	67	BI
B		1	8	16	23	31	38	46	53	61	68	BI
C		1dup	9	16dup	24	31dup	39	46dup	54	61dup	69	BI
D	E1	2	10	17	25	32	40	47	55	62	70	
E	E2	3	11	18	26	33	41	48	56	63	71	
F	E3	4	12	19	27	34	42	49	57	64	72	
G	E4	5	13	20	28	35	43	50	58	65	73	
H	E5	6	14	21	29	36	44	51	59	66	74	

8. Calcul et expression des résultats

Les résultats sont exprimés en µg/l de chlorophylle a d'après l'équation suivante.

$$\text{Chlorophylle } a = F \times (R - Bl) \times \left(\frac{V_{ex}}{V_{éch}}\right) \times D$$

où

- F : facteur F moyen pour la microplaque (voir la section 7.4);
- R : mesure fluorimétrique de l'échantillon;
- Bl : moyenne des blancs d'appareil pour la microplaque (acétone à 90 %);
- V_{ex} : volume d'extractant;
- V_{éch} : volume d'échantillon filtré;
- D : dilution.

9. Critères d'acceptabilité

Les critères d'acceptabilité sont appliqués comme suit :

Élément de contrôle	Critères d'acceptabilité
Solutions étalons de travail	L'écart entre la valeur calculée et la valeur attendue, pour les solutions étalons de travail servant à la courbe de calibration, ne doit pas dépasser 15 %.
Étalons de contrôle positif	La valeur calculée de l'étalon servant de contrôle positif ne doit pas dévier de plus de 10 % de sa valeur attendue.
Duplicatas de méthode	Un duplicata de méthode est effectué tous les 15 échantillons en effectuant deux filtrations/extractions distinctes sur le même échantillon. Le dosage des duplicatas se fait systématiquement en même temps que l'échantillon correspondant. Les résultats des duplicatas de méthode ne doivent pas présenter plus de 30 % d'écart.
Blanc de méthode	Un blanc de méthode est réalisé toutes les 74 filtrations environ, ou l'équivalent d'un blanc par microplaque analysée. Il est réalisé en procédant de la même façon que pour les échantillons, mais en utilisant l'eau ultrapure. Un blanc de méthode est dosé en même temps que les échantillons lors de la lecture d'une microplaque. Son résultat doit se situer sous la limite de détection.
Courbe d'étalonnage	Une courbe d'étalonnage doit être tracée pour chaque microplaque. Le R ² de la courbe d'étalonnage doit être > 0,995.

Les biologistes peuvent valider les résultats des analyses à partir de l'ensemble des données du contrôle de la qualité, même s'il y a dépassement des critères.

10. Références bibliographiques

NOTE - Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION AND WATER ENVIRONMENT FEDERATION, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 23^e édition, American Public Health Association, Washington, D.C., 2018.

AMINOT, A. et F. REY, *Chlorophyll a: Determination by spectroscopic methods*, International Council for the Exploration of the Sea (ICES) Techniques in Marine Environmental Sciences, n° 30, décembre 2001.

JEFFREY S.W. et 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.

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.

MANDALAKIS, M., A. STRAVINSKAITE, A. LAGARIA, S. PSARRA et P. POLYMENAKOU. *Ultrasensitive and high-throughput analysis of chlorophyll a in marine phytoplankton extracts using a fluorescence microplate reader*, Anal. Bioanal. Chem., 409 : 4539-4549, 2017.

WASMUND, N., I. TOPP et D. SCHORIES. *Optimising the storage and extraction of chlorophyll samples*, Oceanologia, 48(1): 125-144, 2006.

WELSCHMEYER, A.N., *Fluorometric analysis of chlorophyll a in the presence of chlorophyll b and pheopigments*, Limnol. Oceanogr., 39(8): 1985-1992, 1994.



**Environnement,
Lutte contre
les changements
climatiques,
Faune et Parcs**

Québec 