

Novembre 1981

DOCUMENT



**DÉPARTEMENT
ENVIRONNEMENT AQUATIQUE ET ATMOSPHÉRIQUE**

10045

**DIVISION
ÉCHAUFFEMENT ET POLLUTION DES EAUX, ÉCOLOGIE**

6, QUAI WATIER - 70400 CHATOU

TÉL : 071 72 44

M. KHALANSKI et J. NEAU

**CORRECTION DE L'ÉQUATION TRICHROMATIQUE
DU SCOR-UNESCO POUR LA MESURE DE LA
CHLOROPHYLLE A NON DÉGRADÉE DANS LE
PLANCTON D'EAU DOUCE**

HE/31-81-45

ARD E3A 03

Résumé :

La chlorophylle a extraite dans l'acétone à 90 % est dosée selon la méthode du SCOR-UNESCO. La valeur obtenue par l'application de la relation trichromatique est entachée d'erreur par excès du fait des produits de dégradation de la chlorophylle. Des résultats préliminaires indiquent que le rapport des absorbances à 430 et 415 ou 410 nm constitue un indice de dégradation qui permet d'évaluer la proportion de chlorophylle a non dégradée et de corriger les valeurs obtenues par la relation trichromatique.

1 - INTRODUCTION

La teneur en chlorophylle a est le paramètre le plus couramment utilisé pour la détermination de la biomasse végétale planctonique.

Les mesures de laboratoire font appel à des techniques chromatographiques qui séparent les pigments préalablement extraits dans des solvants. Celles-ci nécessitent parfois la mise en oeuvre d'un appareillage coûteux et complexe et sont aussi mal adaptées à des dosages de routine. C'est pourquoi des techniques moins contraignantes ont été mises au point dans le but d'une application à la mesure quantitative de la chlorophylle a sur des grands effectifs d'échantillons : il s'agit de techniques fondées sur la spectrophotométrie et la fluorimétrie. L'intérêt de ces méthodes réside dans leur relative simplicité de mise en oeuvre et la brièveté de chaque dosage; elles présentent par contre des inconvénients que l'on peut classer ainsi par ordre d'importance croissante :

- faible sensibilité des méthodes spectrophotométriques,
- non linéarité aux fortes concentrations dans les extraits par les méthodes fluorimétriques (NEVEUX, 1976 [1]),
- interférences avec d'autres pigments végétaux ou animaux ; c'est la principale source d'erreurs dans les dosages de chlorophylle a. Les interférences concernent les chlorophylles b et c , les produits de dégradation des chlorophylles, les pigments non chlorophylliens dont les caroténoïdes.

La validité des méthodes spectrophotométriques et fluorimétriques est soumise à l'élimination de ces interférences qui constituent la principale cause d'erreur.

Les méthodes proposées par différents auteurs ont fait l'objet de comparaisons portant à la fois sur le procédé de filtration, le choix et le conditionnement des filtres en vue d'une conservation de longue durée, les solvants utilisés pour l'extraction, la durée d'extraction mais aussi sur la validité des formules de calcul en tant que moyen de mesure de la chlorophylle a non dégradée.

Ces diverses questions ont été abordées par deux groupes d'experts qui ont tiré des conclusions et des recommandations :

- le SCOR-UNESCO en 1966 proposait notamment l'usage de l'équation trichromatique de RICHARDS et THOMPSON pour le calcul de la teneur en chlorophylle dans des échantillons de plancton marin [2] :

$$\text{chl}a \text{ (mg.m}^{-3}\text{)} = \frac{v}{V \cdot L} \left[\begin{array}{l} 11,64 (e_{663} - e_{750}) - 2,16 (e_{645} - e_{750}) + \\ 0,10 (e_{630} - e_{750}) \end{array} \right]$$

v : volume d'extrait acétonique à 90 % en ml

V : volume d'eau filtrée en l

L : chemin optique en cm.

- plus récemment, en 1978, un groupe d'experts s'est réuni à PLÖN en République Fédérale Allemande, les résultats de leurs travaux ont été publiés en 1980 [3].

Dans ses conclusions et recommandations, ce groupe d'experts présente une critique des méthodes spectrophotométriques qui conduit à préconiser l'usage de l'équation monochromatique de LORENZEN (1967 [4]):

$$\text{chl}a \text{ (mg.m}^{-3}\text{)} = \frac{(e_{665_o} - e_{750}) - (e_{665_a} - e_{750})}{V \cdot \ell} \cdot v \cdot k \cdot \frac{R}{R - 1}$$

où e_{665_o} = absorbance à 665 nm avant acidification

e_{665_a} = absorbance à 665 nm après acidification

e_{750} = absorbance à 750 nm

v = volume de solvant en ml

V = volume d'eau filtrée

ℓ = chemin optique de la cuve de mesure en cm

k = $1000 \times \frac{1}{k_c}$ avec k_c = coefficient d'absorption spécifique de la chlorophylle a à 665 nm*

R = rapport d'acidification maximum : 1,7

* Selon MARKER et al 1980 [5], la valeur de k pour l'acétone à 90 % est 11,62 et 11,62 dans le méthanol soit $k_c = 95,4$ pour l'acétone à 90 % et $k_c = 86$ pour le méthanol à 100 %. NUSCH 1980 [6] prend $k_c = 82$ dans l'acétone à 90 %. Nous avons choisi $k_c = 90,8$ pour les calculs effectués dans ce rapport.

LORENZEN propose également de calculer la phéophytine a selon :

$$\text{Phéophytine a (mg.m}^{-3}\text{)} = \frac{R(e_{665a} - e_{750}) - (e_{665a} - e_{750})}{V \cdot L} \cdot v \cdot k \cdot \frac{R}{R - 1} \quad (3)$$

Dans l'acétone à 90 %, (2) devient :

$$\text{chl a (mg.m}^{-3}\text{)} = 26,73 \frac{(e_{665o} - e_{750}) - (e_{665a} - e_{750})}{V \cdot L} \cdot v \quad (4)$$

La principale difficulté rencontrée dans la mise en oeuvre de cette méthode réside dans la procédure d'acidification. Il a été en effet montré que la concentration en acide dans l'extrait et la durée d'acidification influent sur la cinétique de dégradation de la chlorophylle a, NUSCH (1980) [6].

D'autre part, une interférence avec d'autres pigments dégradés a été observée (époxycarténoïdes ?) qui produit une augmentation de l'absorbance à 665 nm dans l'extrait acidifié. MARKER et al (1980) [5].

Depuis 1973 notre laboratoire effectue des mesures de chlorophylle a sur des cours d'eau : SEINE, LOIRE, RHONE et des retenues, fondées sur l'équation trichromatique du SCOR-UNESCO. L'objectif poursuivi dans cette étude préliminaire est de tester une méthode simple permettant de corriger les valeurs de chlorophylle a obtenues par l'équation trichromatique de l'interférence due à la phéophytine sans recourir à la procédure d'acidification.

2 - PRINCIPE DE LA METHODE UTILISEE

Le pic d'absorption de la chlorophylle a à 430 nm subit une évolution au cours de la dégradation en phéophytine, qui se traduit par un décalage vers 415-410 nm. Ce décalage a été observé par GORHAM (1960) [7] sur des extraits obtenus à partir de vase superficielle, il a été à l'origine de la méthode proposée par MOSS en 1967 [8] pour la détermination du % de phéophytine par le rapport $\frac{e_{430}}{e_{420}}$ sur des échantillons acidifiés. Nous avons constaté à l'occasion de mesures effectuées en 1973 sur la LOIRE une évolution du rapport $\frac{e_{430}}{e_{415}}$ de l'amont vers l'aval, KHALANSKI et RENON 1977 [9]. Par ailleurs ce rapport diminue dans les échantillons d'eau de mer chlorée prélevés dans l'eau rejetée par la centrale de GRAVELINES, KHALANSKI 1980 [10], GROSSEL 1981 [11]. D'autres indications, comme par exemple la diminution de ce rapport

Des extraits acétoniques de chlorophylle a provenant d'échantillons de SULLY/LOIRE et LANGEAIS ont été exposés pendant des durées variables à la lumière naturelle, les résultats sont rapportés dans la figure 6 et le tableau 2 ; ils indiquent un bon accord entre les valeurs de teneur en chlorophylle a calculées selon l'équation de SCOR-UNESCO et corrigées d'après les relations (9) et (10) et les valeurs calculées selon l'équation monochromatique (4).

7 - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ces résultats préliminaires établissent l'existence d'une étroite corrélation entre les indices de dégradation dérivés de la méthode de MOSS et la proportion de chlorophylle a non dégradée calculée selon l'équation monochromatique de LORENZEN. Ils permettent d'envisager une correction de l'équation trichromatique de SCOR-UNESCO qui éviterait la procédure d'acidification.

Des essais complémentaires sont nécessaires pour vérifier sur des échantillons de plancton, représentatifs de la succession des peuplements au cours de l'année, la validité des relations trouvées sur le plancton estival de la LOIRE et de la SEINE.

Il conviendrait d'autre part de rechercher si les relations établies sur des extraits acétoniques correspondent à d'autres relations observables sur des extraits dans des solvants ayant un meilleur rendement d'extraction (par exemple le méthanol).

Dans la mesure où des résultats ultérieurs confirmeraient ces indications préliminaires, la proposition d'une méthode simple de détermination de la chlorophylle a non dégradée sans acidification est envisageable. Il faudrait alors quantifier l'incertitude liée à cette méthode.