

## Dosage de la Chl a EtOH 90 %

### Matériel

- 1 pompe à vide
- 1 unité de filtration
- Membranes filtrantes de type GF/F (porosité nominale de 0.7  $\mu\text{m}$ )
- Éthanol 90% préparé à partir d'éthanol absolu pour analyses, ACS,ISO,Reag. Ph Eur, pureté  $\geq 99,9\%$  (Merck)
- Tubes falcons de 15 mL
- Spectrophotomètre UV-vis

### Filtration de l'eau brute

Selon la charge en phytoplancton du prélèvement, on filtre 100 à 1000 mL d'eau brute sur filtres GF/F en fibres de verre de 47 mm de diamètre. Le filtre est ensuite déposé dans un tube Falcon de 15 mL recouvert de papier aluminium et annoté de la façon suivante :

**Site d'échantillonnage - date - n° de réplicat – volume filtré.**

Le filtre est ensuite congelé à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant au moins quelques heures avant d'effectuer l'extraction. En effet, la congélation / décongélation, fait éclater les cellules ce qui facilite l'extraction de la Chl a.

### Extraction

#### Remarques importantes :

- ❖ La Chl a étant photodégradable il faut absolument protéger les échantillons de la lumière en enroulant une feuille de papier d'aluminium autour des tubes.
- ❖ L'éthanol est un solvant relativement toxique par ingestion, il est également toxique par inhalation et par contact cutané. Il faut donc le manipuler avec des gants et sous hotte.

- 1) **Après décongélation du filtre, ajouter 7.5 mL d'éthanol 90%.**  
Bien refermer le tube pour éviter toute évaporation du solvant.
- 2) **Agiter énergiquement le tube pour détruire le filtre jusqu'à ce qu'il forme une pâte.**
- 3) **Placer le tube 10 min au bain marie porté à  $70^{\circ}\text{C}$ .**
- 4) **Laisser refroidir à température ambiante pendant une heure avant d'effectuer la mesure au spectrophotomètre voire laisser reposer environ 16h à  $4^{\circ}\text{C}$  et à l'obscurité**

### Mesures de l'absorbance au spectrophotomètre

- 1) **Centrifuger 5 min à 4000 rpm et  $10^{\circ}\text{C}$ .** La majeure partie de la pâte de filtre va former un culot mais certains fragments resteront collés sur les parois du tube, il faut alors incliner le tube pour remettre ces morceaux en suspension dans l'EtOH 90%.

- 2) **Centrifuger 10 min à 4000 rpm et 10°C** pour former le culot.
- 3) Prélever 1 mL du surnageant à l'aide d'une micropipette, le placer dans une cuve semi-micro en verre, ou en polystyrène à usage unique. **Lire l'absorbance à 665 nm** (longueur d'onde correspondant à l'absorption maximale de la *Chl a*) **et à 750 nm** (pour l'évaluation de la turbidité de l'échantillon).
  - Si la mesure à 750 nm est trop élevée (> 0,005, pour des niveaux d'absorbance de 0,1-0,2), c'est que des particules du filtre en fibre de verre étaient présentes dans le surnageant prélevé. Celles-ci ont donc faussé la mesure d'absorbance, il faut centrifuger à nouveau et recommencer les mesures d'absorbance.
  - Le prélèvement peut également être trop concentré. Au-delà de 0.8-1 unité d'absorbance, il faut diluer l'extrait avec de l'EtOH 90%, car on n'est plus dans la partie linéaire de la plage de lecture. A l'inverse il faut essayer de toujours se placer à des absorbances > 0.1, c'est à dire au-delà des limites de détection.

**Faire un blanc à l'Ethanol 90% dans un premier temps puis réaliser trois lectures par échantillon**

### *Estimation de la concentration en Chl a (selon Talling , 1963)*

Si on est certain que l'échantillon analysé contient uniquement de la Chl a, la concentration dans l'eau brute en µg/L se calcule de la façon suivante :

$$[\text{Chl a}] = 12.05 * (\text{DO}_{665} - \text{DO}_{750}) * (\text{VE} / \text{VF})$$

avec **VE** : volume d'extraction (mL)

**VF** : volume filtré (L)

En revanche, si l'échantillon d'eau contient d'autres pigments chlorophylliens la méthode de Wintermans & de Mots (1965) propose, toujours avec l'éthanol 90 % comme solvant, en plus de la *Chl a*, une estimation de la *Chl b* (en µg/L).

$$[\text{Chl a}] = [13.7 * (\text{DO}_{665} - \text{DO}_{750}) - 5.76 * (\text{DO}_{649} - \text{DO}_{750})] * (\text{VE} / \text{VF})$$

$$[\text{Chl b}] = [25.8 * (\text{DO}_{649} - \text{DO}_{750}) - 7.6 * (\text{DO}_{665} - \text{DO}_{750})] * (\text{VE} / \text{VF})$$