

NORME
INTERNATIONALE

ISO
10260

Première édition
1992-07-15

**Qualité de l'eau — Mesurage des paramètres
biochimiques — Dosage spectrométrique de la
chlorophylle *a***

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)
*Water quality — Measurement of biochemical parameters —
Spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration*

ISO 10260:1992

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d5952a45-7531-4427-ad7c-ca6047b90f0f/iso-10260-1992>



Numéro de référence
ISO 10260:1992(F)

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 10260 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 12, *Méthodes physiques, chimiques et biochimiques*.

Les annexes A et B de la présente Norme internationale sont données uniquement à titre d'information.

Introduction

La chlorophylle *a* est le principal pigment photosynthétique des algues vertes. La teneur en chlorophylle *a* des eaux de surface constitue un indicateur de leur état trophique. Sa détermination permet d'évaluer la biomasse et l'activité photosynthétique potentielle des algues. Les principaux produits de dégradation de la chlorophylle sont la phéophytine et la phéophorbide, et le rapport chlorophylle *a*/phéopigments est un indicateur de l'état physiologique des algues.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 10260:1992

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d5952a45-7531-4427-ad7c-ca6047b90f0f/iso-10260-1992>

Page blanche

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 10260:1992

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d5952a45-7531-4427-ad7c-ca6047b90f0f/iso-10260-1992>

Qualité de l'eau — Mesurage des paramètres biochimiques — Dosage spectrométrique de la chlorophylle *a*

1 Domaine d'application

1.1 La présente Norme internationale prescrit une méthode de dosage de la chlorophylle *a*. Elle est applicable à l'évaluation du phytoplancton dans les eaux de surface naturelles et aux essais biologiques portant sur la croissance algale.

À condition d'utiliser des méthodes d'échantillonnage appropriées, elle peut également être appliquée aux communautés phytobenthiques (voir annexe A).

1.2 Les autres pigments tels que les chlorophylles *b* et *c* et certains des produits de dégradation de la chlorophylle n'interviennent pas dans le dosage. Il est possible d'effectuer une analyse semi-quantitative des phéopigments afin de tenir compte de leur interférence dans le dosage de la chlorophylle *a* et d'évaluer la proportion de biomasse algale inactive.

1.3 La chlorophylle est sensible à l'action de la lumière et de l'oxygène, notamment au moment de l'extraction. Pour empêcher sa dégradation par oxydation ou photoréaction, il faut éviter toute exposition à la lumière des échantillons et tout contact avec l'air. L'homogénéisation de l'échantillon permet dans certains cas d'accroître le rendement d'extraction.

1.4 Si l'extraction est effectuée à l'éthanol, il faut chauffer à 75 °C pendant 5 min afin d'inactiver la chlorophyllase et d'accélérer la lyse des pigments. Le temps entre l'extraction et le mesurage doit être bref, mais il est possible de conserver les extraits (mais non les filtres) au réfrigérateur (4 °C), pendant 3 jours au maximum, ou à température inférieure à - 25 °C pendant au moins 30 jours.

1.5 Bien que le mode opératoire comprenne une étape de filtration ou centrifugation destinée à la clarification de l'extrait final, il peut subsister une légère turbidité. L'acidification, également, peut en-

traîner une certaine turbidité. Il faut donc soustraire de la valeur de l'absorbance à 665 nm une correction de turbidité égale à l'absorbance à 750 nm.

1.6 Le pigment de certaines bactéries phototrophes peu courantes (*Chlorobium* par exemple) interfère dans le dosage de la chlorophylle *a* [1]. Par contre, la contribution des chlorophylles *b* et *c* à l'absorbance à 665 nm est négligeable [2].

2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Au moment de la publication, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 5667-1:1980, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 1: Guide général pour l'établissement des programmes d'échantillonnage.*

ISO 5667-2:1991, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 2: Guide général sur les techniques d'échantillonnage.*

3 Principe

Filtration d'un échantillon d'eau pour isoler les algues et autres matières en suspension. À partir du résidu de filtration, extraction des pigments à l'éthanol chaud. Dosage spectrométrique de la chlorophylle *a* contenue dans l'extrait. Évaluation de la concentration de la chlorophylle *a* et des phéopigments d'après la différence d'absorbance à

665 nm avant et après acidification de l'extrait [3], [4].

4 Réactifs

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau désionisée ou de pureté équivalente.

4.1 Acide chlorhydrique, $c(\text{HCl}) = 3 \text{ mol/l}$.

4.2 Éthanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, en solution aqueuse à 90 % (V/V).

NOTE 1 En règle générale, la présence d'un dénaturant dans l'éthanol n'interfère pas dans le dosage. Il est toutefois recommandé de procéder à un dosage comparatif avec de l'éthanol pur (90 %) lors de la réception de tout lot inconnu [4].

5 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et

5.1 Spectromètre, permettant de mesurer l'absorbance dans le domaine visible, jusqu'à 750 nm, avec une résolution de 1 nm, une largeur de bande inférieure ou égale à 2 nm, et une sensibilité inférieure ou égale à 0,001 unité d'absorbance, muni de cuves de parcours optique compris entre 1 cm et 5 cm.

5.2 Dispositif de filtration sous vide, support et pince de fixation.

5.3 Filtres en fibre de verre sans liant organique, destinés à la filtration des échantillons d'eau, retenant plus de 99 % des particules de diamètre supérieur à 1 μm , et de diamètre compris entre 25 mm et 50 mm.

5.4 Filtres destinés à la filtration des extraits, présentant les mêmes caractéristiques que les filtres décrits en 5.3, mais de diamètre inférieur, par exemple 25 mm,

ou

Centrifugeuse, avec accélération de 6 000 g et rotor pouvant recevoir les tubes à extraction spécifiés.

5.5 Bain d'eau, pouvant être maintenu à $75 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, avec support destiné à recevoir les tubes à extraction.

5.6 Tubes à extraction, par exemple en verre ambré à col large et capuchon à vis revêtu de polytétrafluoréthylène (PTFE), capacité 30 ml à 50 ml, utilisables pour la centrifugation à 6 000 g.

6 Échantillonnage et conservation des échantillons

L'échantillonnage doit être conduit comme spécifié dans l'ISO 5667-1 et l'ISO 5667-2. La conservation des échantillons d'eau au réfrigérateur (à l'obscurité et pendant moins de 8 h) est admise, mais il est préférable, si possible, de procéder aux opérations 7.1 à 7.3 immédiatement après l'échantillonnage. Les extraits bruts peuvent être conservés à température inférieure à $-25 \text{ }^\circ\text{C}$, pendant au moins 30 jours, dans des tubes à extraction en verre brun (5.5) hermétiquement fermés. Les échantillons et les filtres, par contre, ne doivent pas être congelés.

7 Mode opératoire

7.1 Filtration

Agiter les échantillons pour bien les homogénéiser.

Filtrer un volume d'échantillon V_s (généralement compris entre 0,1 litre et 2 litres, suivant la teneur en algues) à travers un filtre en fibre de verre (5.3) fixé sur un support adéquat avec une pince.

Sécher le filtre sous vide, le séparer de son support et le placer dans le tube à extraction. S'il entre difficilement dans le tube, le découper en morceaux.

Éviter tout contact avec les doigts.

7.2 Variante d'extraction A

Chauffer à $75 \text{ }^\circ\text{C}$ le volume requis d'éthanol (4.2).

Verser un petit volume d'éthanol chaud (généralement 30 ml à 40 ml) dans le tube contenant les morceaux de filtre. Laisser refroidir quelques minutes, puis déchiqueter le filtre, de préférence avec une baguette de broyage de tissus, pour faciliter l'extraction. Laver la baguette avec un peu d'éthanol (4.2) pour entraîner les particules adhérentes. Procéder à l'extraction pendant au moins 3 min.

NOTE 2 En règle générale, l'extraction est conduite à température ambiante pendant plusieurs heures ou toute une nuit. Si elle est prolongée, ou si l'extrait doit être conservé pendant plusieurs jours (par exemple un week-end), il convient de placer les tubes à extraction au réfrigérateur.

Transférer la suspension, au travers d'un filtre (5.4), dans une fiole jaugée avec bouchon (capacité 50 ml ou 100 ml). Laver le tube à extraction avec de l'éthanol (4.2) pour entraîner l'extrait résiduel et transférer quantitativement le produit de lavage dans la fiole jaugée, en rinçant le filtre. Compléter au trait, boucher et bien homogénéiser. Le volume obtenu est le volume d'extrait V_E .

Procéder ensuite comme décrit en 7.4.

7.3 Variante d'extraction B

Mesurer exactement un volume V_E d'éthanol (4.2) (généralement 20 ml ou 25 ml), le placer dans le tube à extraction (5.6) et y plonger les morceaux de filtre. Visser hermétiquement le capuchon sur le tube pour éviter les pertes de solvant par évaporation. Agiter doucement pour remettre le résidu de filtration en suspension. Placer le tube dans le bain d'eau (5.5), de façon que le niveau de l'extrait soit aligné avec le niveau de l'eau du bain. Chauffer pendant 5 min, en agitant doucement vers la fin. Sortir les tubes à extraction du bain d'eau et les laisser refroidir pendant 15 min à température ambiante.

Mesurer l'extrait, si possible, immédiatement.

NOTE 3 À ce stade, l'extrait peut être conservé au réfrigérateur pendant toute une nuit, avant l'analyse (voir 7.4). La durée de stockage ne doit pas dépasser 3 jours.

Transférer le surnageant, au travers d'un filtre (5.4), dans une fiole propre (5.6), mais sans rincer avec du solvant frais (voir note 4).

Il est également possible de centrifuger l'extrait contenu dans les tubes à extraction jusqu'à l'obtention d'un surnageant clair.

Le dosage photométrique doit être réalisé sur un extrait ou un surnageant limpide.

NOTE 4 Lorsque l'on utilise cette méthode, il suffit de récupérer une partie de l'extrait puisque le volume initial de solvant utilisé, V_E , est exactement connu et reste constant, la fermeture hermétique des tubes empêchant les pertes par évaporation. Par ailleurs, la teneur en eau résiduelle des filtres (voir 7.1), qui représente moins de 5 % du volume de l'extrait, est négligeable.

7.4 Dosage photométrique

7.4.1 Transférer à la pipette une partie de l'extrait clair dans la cuve du spectromètre, en laissant un volume libre suffisant pour l'étape d'acidification (voir 7.4.2).

Mesurer l'absorbance à 665 nm (A_{665}) et à 750 nm (A_{750}) par comparaison avec une cuve de référence remplie d'éthanol (4.2).

NOTE 5 L'absorbance à 665 nm doit normalement être comprise entre 0,01 et 0,8. On peut satisfaire à cette condition en modulant le volume d'eau filtrée, le volume de solvant, la dilution, le parcours optique, etc. Opérer pour commencer avec 0,5 litre d'échantillon, un filtre de 50 nm de diamètre, 20 ml d'éthanol et une cuve de 5 cm.

7.4.2 Acidifier une fraction de l'extrait (généralement 5 ml à 10 ml) avec 0,01 ml d'acide chlorhydrique (4.1) pour 10 ml d'extrait, agiter, attendre 5 min à 30 min, puis mesurer à nouveau l'absorbance à 665 nm et 750 nm.

8 Calcul et expression des résultats

8.1 La concentration ρ_c de la chlorophylle *a*, en microgrammes par litre, se calcule d'après l'équation suivante:

$$\rho_c = \frac{(A - A_a)}{K_c} \times \frac{R}{R - 1} \times \frac{10^3 V_e}{V_s \cdot d} \quad \dots (1)$$

où

$A = A_{665} - A_{750}$ est l'absorbance de l'extrait avant acidification (voir 7.4.1);

$A_a = A_{665} - A_{750}$ est l'absorbance de l'extrait après acidification;

V_e est le volume d'extrait, en millilitres;

V_s est le volume d'échantillon filtré, en litres;

$K_c = 82 \text{ l} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ est la valeur opérationnelle du coefficient d'absorption spectral spécifique de la chlorophylle *a* (extraite du document [2]);

$R = 1,7$ est le rapport A/A_a pour une solution de chlorophylle *a* pure transformée en phéophytine par acidification (voir 7.4.2) (valeur extraite du document [2]);

d est le parcours optique de la cuve, en centimètres;

10^3 est un facteur dimensionnel s'appliquant à V_e .

8.2 La concentration ρ_p des phéopigments, en microgrammes par litre, se calcule d'après l'équation suivante:

$$\rho_p = A_a \times \frac{R}{K_c} \times \frac{10^3 V_e}{V_s \cdot d} - \rho_c \quad \dots (2)$$

8.3 Si l'on prend 82 comme valeur du coefficient d'absorption spectral spécifique de la chlorophylle *a* dans l'éthanol à 90 %, et 1,7 comme valeur du coefficient d'acidification maximal (R), établi pour la chlorophylle *a* pure, la concentration de chlorophylle

ρ_c dans l'échantillon d'eau peut se calculer plus simplement par l'équation

$$\rho_c = (A - A_a) \times 29,6 \times \frac{V_e}{V_s \cdot d} \quad \dots (3)$$

et la concentration des phéopigments, par l'équation

$$\rho_p = A_a \cdot 20,8 \cdot \frac{V_e}{V_s \cdot d} - \rho_c \quad \dots (4)$$

NOTES

6 Les concentrations ainsi calculées sont moins fiables pour les phéopigments que pour la chlorophylle *a*. Un essai circulaire a mis en évidence une variabilité interlaboratoire de l'ordre de 5 % à 11 % pour la chlorophylle *a* et de 6 % à 46 % pour les phéopigments.

7 Le rapport A/A_a est égal à 1,7 si l'échantillon ne contient pas de chlorophylle dégradée, et à 1 s'il contient exclusivement des produits dégradés de la chlorophylle *a*.

La valeur opérationnelle du coefficient d'absorption spécifique de la chlorophylle *a* dans l'éthanol (4.2), 82, a été déterminée à partir de la valeur opérationnelle recommandée dans le document [5] à 665 nm. Cette valeur (84), tient compte de la présence des chlorophylles *b* et *c*, et l'absorbance de la chlorophylle *a* à 665 nm est, à concentration égale, de 2 % à 3 % plus élevée dans l'acétone que dans l'éthanol (4.2) [2], [4].

8.4 Noter les résultats, en microgrammes par litre (ou en milligrammes par mètre cube), avec, au plus, deux chiffres significatifs ou un chiffre après la virgule. Exemples:

Concentration de chlorophylle *a* 5,5 µg/l

Concentration de phéopigments < 0,1 µg/l

9 Fidélité

Un essai interlaboratoire, conduit en 1983, a fourni les résultats donnés au tableau 1 [6].

10 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

- a) référence à la présente Norme internationale;
- b) identification de l'échantillon d'eau;
- c) expression des résultats comme spécifié dans l'article 8;
- d) éventuellement, pré-traitement appliqué à l'échantillon;
- e) tout écart par rapport au mode opératoire spécifié ou tout incident susceptible d'avoir agi sur les résultats.

ISO 10260:1992
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d5952a45-7531-4427-ad7c-ca6047b90f0f/iso-10260-1992>

Tableau 1 — Résultats de fidélité

Échantillon	<i>l</i>	<i>n</i>	<i>n_a</i> %	\bar{x} µg/l	σ_r µg/l	VC _r %	σ_R µg/l	VC _R %
A	18	71	0	126,5	5,46	4,3	6,36	5,0
B	18	70	2,8	20,3	3,67	18,1	2,90	11,3
C	17	67	5,6	24,6	2,21	9,0	2,8	11,4

l est le nombre de laboratoires participants
n est le nombre de valeurs obtenues
n_a est le pourcentage de valeurs aberrantes
 \bar{x} est la moyenne totale

σ_r est l'écart-type de répétabilité
 VC_r est le coefficient de variation de répétabilité
 σ_R est l'écart-type de reproductibilité
 VC_R est le coefficient de variation de reproductibilité

Annexe A (informative)

Détermination de la concentration phytobenthique

A.1 Détermination du phytobenthos

Le prélèvement de phytoplancton est conduit comme spécifié dans l'ISO 5667-1 et dans l'ISO 5667-2.

L'échantillonnage du phytobenthos (algues fixées) dépend de la nature du substrat colonisé. On peut racler avec un couteau ou une lame de rasoir une aire définie de la surface d'un rocher ou d'un autre substrat immergé. Les graviers et petites pierres peuvent être prélevés et placés directement dans le solvant. L'échantillonnage quantitatif est facilité par l'utilisation de substrats artificiels, par exemple des lames de verre, que l'on immerge dans l'eau. Les lames colonisées, ou les algues prélevées, sont transportées dans de l'eau du site de prélèvement. Les algues benthiques ou les sédiments en suspension, de masse connue, sont ensuite traités comme le phytoplancton suivant la méthode décrite dans la présente Norme internationale.

A.2 Solvant

L'acétone a été un temps largement utilisée, conformément aux recommandations SCOR-

UNESCO (1966) relatives à l'extraction sur les algues. Son rendement d'extraction s'étant toutefois avéré assez faible dans certains cas, elle a été remplacée par des alcools. Il a été démontré que l'éthanol chaud et le méthanol sont d'efficacité équivalente, et largement supérieure à celle de l'acétone [4]. L'utilisation du méthanol pose toutefois certains problèmes spécifiques s'il est nécessaire de procéder à une acidification pour évaluer l'interférence des phéopigments. Il peut en effet y avoir déplacement du pic d'absorption vers les longueurs d'onde plus courtes et, par suite, variation importante du coefficient d'acidification maximal en fonction, par exemple, de la concentration de l'acide, de la teneur en eau du solvant et du filtre, et du temps écoulé entre l'acidification et l'analyse. Le seul moyen de surmonter ces problèmes est d'inclure des étapes supplémentaires dans le mode opératoire, par exemple une neutralisation avec des bases organiques (diméthylaniline ou diphenylaniline). Le méthanol étant par ailleurs toxique, il est recommandé de recourir plutôt à l'éthanol comme solvant de référence pour le dosage de la chlorophylle *a* dans les échantillons d'eau douce et d'eau marine.