

Analyse automatique des nutriments
 NO_2 - NO_3 - PO_4 - $\text{Si}(\text{OH})_4$
dans l'eau de mer

Rédigé par :

Nicole Garcia
Louise Oriol

Corrections/Annotations :

Nicole Garcia

Visé par :

Nicole GARCIA, responsable
qualité national
Le : 31 Janvier 2019



I - Introduction

Intérêt du paramètre :

Les éléments nutritifs sont des descripteurs hydrologiques indispensables à l'étude d'un écosystème marin. En milieu aquatique, la chaîne alimentaire repose sur les producteurs primaires représentés dans les eaux de surface par le phytoplancton. Oxygène, carbone et hydrogène sont disponibles en abondance dans le milieu marin mais l'azote et le phosphore sont en concentrations relativement faibles.

L'une des grandes classes de phytoplancton est constituée par les diatomées comportant un squelette de silice, fabriqué à partir du silicium dissous dans l'eau de mer. La production primaire des eaux de surface est essentiellement autotrophe et s'effectue à partir des constituants minéraux présents en solution dans l'eau de mer (CO_2 , NO_3 , PO_4 , $SiOH_4$, NH_4) en utilisant la lumière comme source d'énergie.

Difficultés particulières :

Il faut faire attention à deux choses :

- 1) les interactions entre échantillons et flacons d'échantillonnage.
- 2) les risques de contamination de l'échantillon lors du prélèvement, du stockage et de l'analyse.

Méthode :

La méthode d'analyse des sels nutritifs repose sur la colorimétrie. L'utilisation d'analyseurs automatiques (type "TECHNICON AA2", « AXFLOW/SEAL AA3 AAHR », « ALLIANCE » ou "SKALAR") est fortement recommandée. Cependant des mesures dites manuelles peuvent également être utilisées pour la mesure de certains paramètres délicats comme le phosphate.

Unité :

$\mu\text{mole /litre } (\mu\text{M})$.

Précision souhaitée :

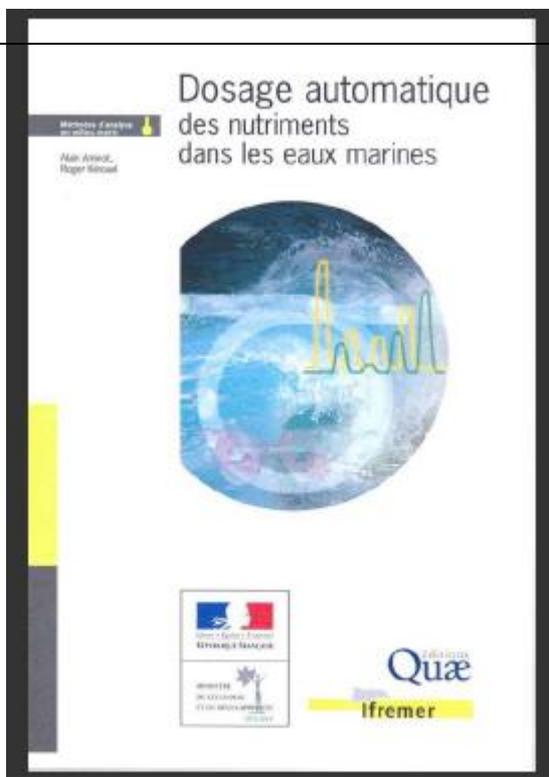
La précision minimale demandée est dépendante de la gamme de mesure mais une valeur de l'ordre de 5 à 10% semble acceptable compte tenu de la diversité des milieux pris en compte dans SOMLIT.

Les limites de détection pour les 4 sels mesurés avec des colorimètres AA3 sont de $0.05\mu\text{mol/l}$ pour le NO_2+NO_3 et le $SiOH_4$ et de 0.003 à $0.006 \mu\text{mol/l}$ pour le PO_4 (Aminot et Kérouel, 2007). Cependant de manière usuelle, la limite de détection pour les phosphates est plutôt de l'ordre de 0.015 - $0.020\mu\text{mol/l}$ avec les colorimètres AXFLOW AAHR.

II - Méthodes

Les laboratoires SOMLIT utilisent les méthodes décrites par Alain AMINOT et Roger KEROUEL, tout d'abord en 2004 (Aminot A., Kérouel R., 2004. Hydrologie des écosystèmes marins. Paramètres et analyses. Ed. Ifremer, 336p) puis dans le livre traitant exclusivement des analyses automatiques :

Aminot A., Kérouel R., 2007. Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines : méthodes en flux continu. Ed. Ifremer, Méthodes d'analyse en milieu marin 188p.



Afin de ne pas être redondant avec le livre, ce protocole décrira les bonnes pratiques de préparation des échantillons, d'analyses et de corrections. Concernant les différents circuits, la préparation des réactifs, la préparation des solutions étalon et des gammes standards, il faut se référer au livre.

III - Hygiène et sécurité

Sécurité individuelle :

Mesures de sécurité classiques mises en œuvre dans les laboratoires lors de dosages chimiques : port de blouse, gants et lunettes, travail sous hotte pour certains produits etc.... Certains dangers et précautions sont précisés dans les paragraphes concernant la préparation des réactifs. De manière générale se référer aux fiches de sécurité de chaque produit chimique utilisé. En cas de doute, consulter le site de l'INRS, santé et sécurité au travail : <http://www.inrs.fr/accueil.html>

Evacuation des déchets :

Les déchets provenant des analyses colorimétriques sont à évacuer en Déchets liquides aqueux contenant des substances dangereuses (code européen 16.10.01*).

IV - Matériel

Appareil utilisé : Autoanalyseur AXFLOW SEAL AA3 AAHR ; il est utilisé dans la plupart des stations du SOMLIT: Banyuls sur mer, Luc sur mer, Villefranche sur mer, Marseille, Arcachon, Brest, Roscoff et La Rochelle en 2012. Wimereux utilisait un autoanalyseur type ALLIANCE mais s'est équipé d'un AA3 SEAL depuis décembre 2016. Dinard et Sète sous-traitent leurs analyses sels nutritifs.

V- Echantillons

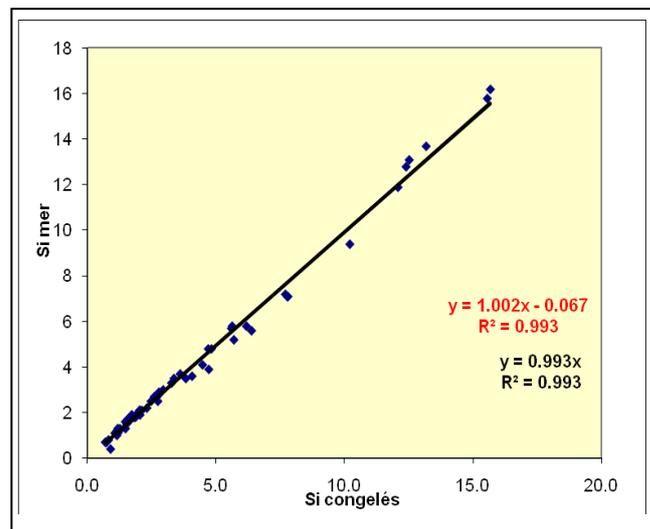
Prétraitement :

Pour certaines eaux très chargées (ex : estuaire de la Gironde), le prétraitement commence dès le prélèvement à la bouteille NISKIN. On place un filtreur type Swinex muni d'une soie de filet à plancton (10-200 μ m) au robinet de la bouteille Niskin. Le prélèvement se fait en évitant que l'embout ne touche le flacon de prélèvement et en portant des gants. Il est également possible de filtrer au laboratoire occasionnellement selon la charge ou systématiquement (exemple : à Brest, filtration sur polycarbonate 0.4 μ m pour les 4 sels).

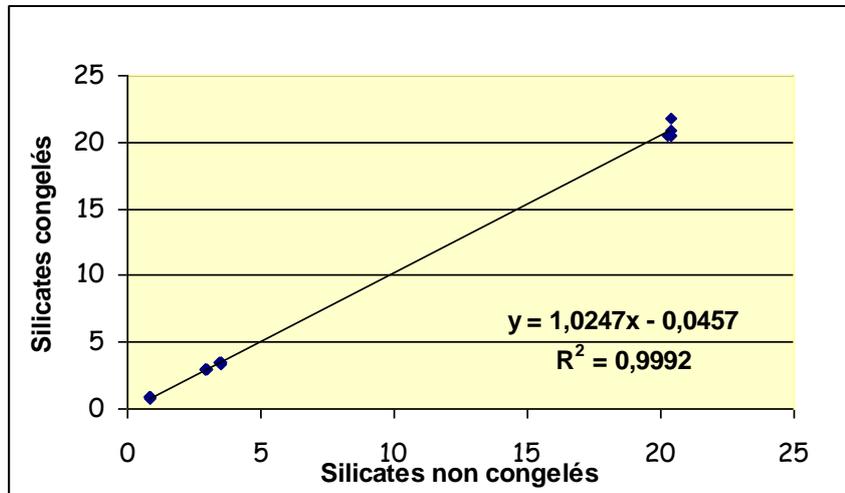
Pour les eaux méditerranéennes, ce prétraitement n'est pas nécessaire.

Conservation :

- Congélation : Les échantillons NO₂, NO₃ et PO₄ sont placés debout au congélateur (-20°C). Il est préconisé de filtrer les échantillons Si(OH)₄ sur acétate de cellulose de 0.8 μ m et de les conserver au réfrigérateur au maximum 2 mois. Cependant, dans les zones oligotrophes, les échantillons silicates ne sont pas obligatoirement filtrés et peuvent même être congelés. Des comparaisons ont été faites entre échantillons congelés et échantillons filtrés qui n'ont pas montré de différence significative entre les deux modes de conservation.



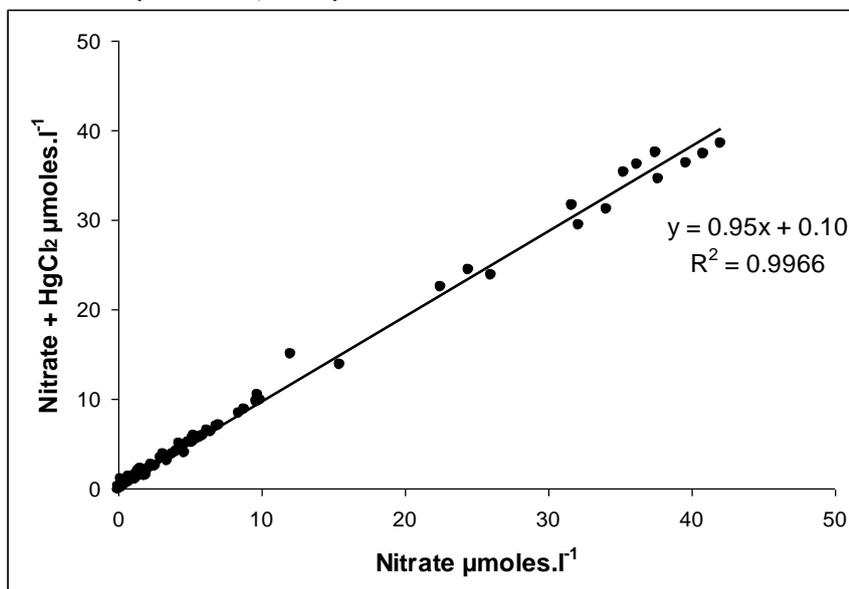
Comparaison entre mesures de silicates réalisées à bord immédiatement après le prélèvement et dans des échantillons ayant été congelés à -20°C. Campagne GASPROD 2002. (30.591<Salinité PSU< 35.603) PSU. (Données personnelles, P. Morin Roscoff).

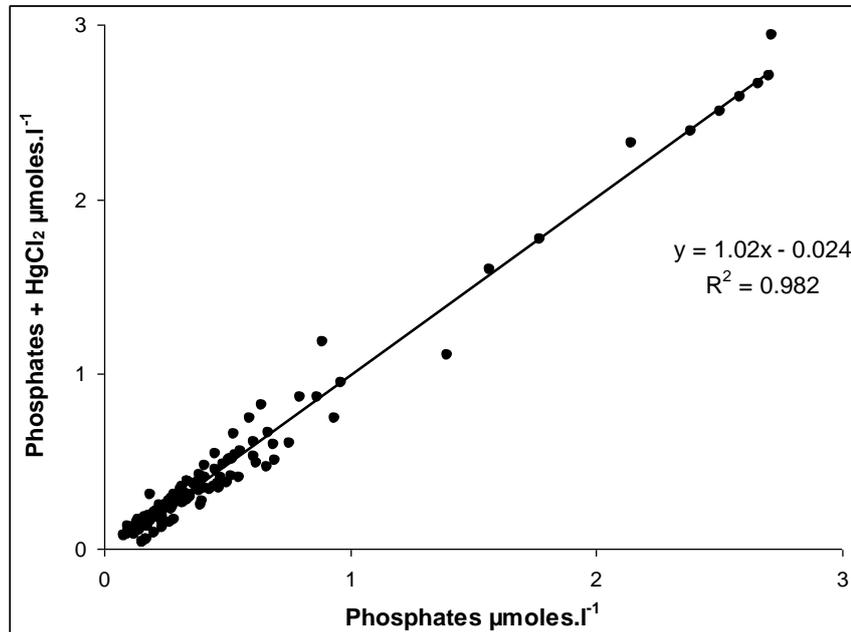


Comparaison entre mesures de silicates analysés au laboratoire après conservation au réfrigérateur et ayant été congelés à -20°C . Données SOMLIT de Roscoff 2003 et 2009, Banyuls 2006 et Marseille 2008.

Il existe deux autres méthodes de conservation des échantillons :

- l'empoisonnement au chlorure mercurique HgCl_2 à 6g/l à raison de 100 μl de cette solution pour 20ml d'échantillon. Des comparaisons ont été faites entre congélation et empoisonnement sans que des différences significatives soient relevées. Les échantillons se conservent jusqu'à un an à l'obscurité et à température ambiante. (Kirkwood, 1992).





Comparaison des concentrations en NO₃ et PO₄ obtenues lors de dosages réalisés immédiatement à bord et sur des échantillons ayant été conservés 3 mois après empoisonnement avec du chlorure mercurique (Campagne BIOSOPE 2004 - données personnelles de P. RAIMBAULT Marseille)

- la pasteurisation à 80°C : Les prélèvements se font à la Niskin avec un swinnex Millipore dans des flacons NALGENE en PP 30ml ou 60ml parfaitement hermétiques (condition indispensable pour ne pas qu'il n'y ait pas de perte lors de la pasteurisation). Remplir les flacons au 4/5. Disposer les flacons dans un bac et les placer dans une étuve à 80°C. Au bout de 2h30, sortir le bac, resserrer les bouchons (dilatation due à la chaleur). Stocker les flacons debout dans des sacs plastiques, au sec et à l'obscurité. Les échantillons ainsi préparés se conservent plusieurs mois sans dégradation.

Décongélation :

Les échantillons à analyser doivent être sortis du congélateur la veille, placés au réfrigérateur puis à l'obscurité et à température ambiante avant l'analyse. Bien agiter avant l'analyse. Il faut faire attention à ne pas contaminer directement l'échantillon : porter des gants (surtout pour PO₄) et transvaser le moins possible l'échantillon avant l'analyse; l'idéal étant d'analyser dans le flacon de prélèvement. A noter que la décongélation peut également s'effectuer dans un bain marie rempli d'eau MQ ultrapure chauffé à 30°C.

VI-Analyses

Ce paragraphe est valable pour des analyses effectuées sur un analyseur automatique type AA3 SEAL/AXFLOW AAHR piloté par le logiciel AACE. Cependant certains principes de base sont utilisables quelques soient les méthodes d'analyse utilisées.

Ligne de base :

La ligne de base peut être faite soit avec de l'eau ultrapure MilliQ fraîche, c'est la référence « zéro sels nutritifs », ou de l'eau de mer appauvrie ou de l'eau de mer artificielle. Aminot et Kérouel utilisent de l'eau MQ ultrapure.

Attention : Il faut cependant être très vigilant quant à la qualité de l'eau MQ ultrapure. En effet les résines en fin de vie peuvent apporter une contamination en silicates. Pour éviter cela, vérifiez la stabilité de la ligne de base et que les échantillons de faibles concentrations ne présentent pas de pic négatif.

Il faut également mesurer, par rapport à l'eau MQ ultrapure, la quantité de sels nutritifs apportée par l'eau de mer pauvre ou les différents constituants de l'eau de mer artificielle.

Étalonnage :

L'étalonnage se fait TOUJOURS dans la même matrice que les échantillons à analyser. Dans la majorité des cas, ce sont des échantillons d'eau de mer, les standards se feront donc dans de l'eau de mer pauvre en NO_2 , NO_3 , PO_4 et $\text{Si}(\text{OH})_4$.

On utilisera pour cela soit l'eau de mer naturelle mais appauvrie en sels nutritifs soit une eau de mer artificielle.

Fabrication de l'eau de mer appauvrie : Prélever dans de grands bidons transparents de l'eau de mer lorsque les concentrations en NO_2 , NO_3 , PO_4 et $\text{Si}(\text{OH})_4$ sont au plus bas (de juillet à septembre dans la plupart des milieux). Faire une préfiltration sur une soie de $100\mu\text{m}$ afin d'éliminer le gros zooplancton. Laisser les bidons ouverts, à la lumière et à température ambiante pendant 4 à 5 mois afin d'épuiser le milieu en sels nutritifs (pas de filtration sinon élimination du zooplancton et pas d'obscurité sinon élimination du phytoplancton). Suivre régulièrement l'épuisement en sels nutritifs pour utiliser l'eau de mer quand les concentrations sont proches de 0. Pour les NO_2 , NO_3 et PO_4 , filtrer sur GF/F avant utilisation. Pour les $\text{Si}(\text{OH})_4$, quand la concentration est minimale, filtrer sur filtre d'acétate $0.7\mu\text{m}$ afin d'éviter la reminéralisation qui entraînerait une augmentation de la concentration en silicates.

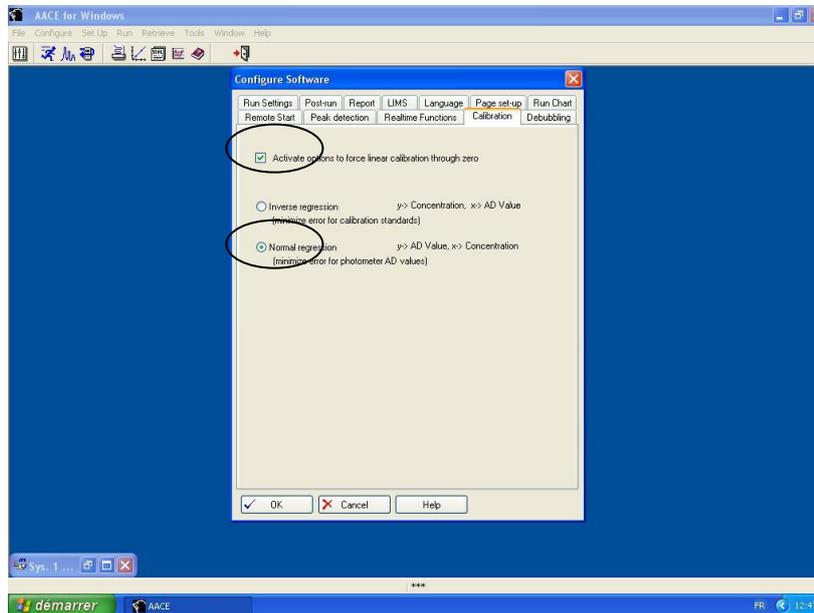
Fabrication de l'eau de mer artificielle de salinité proche de 38: Dissoudre dans 700ml d'eau MQ ultrapure et dans l'ordre : 30g de Chlorure de sodium, 0.8g de Chlorure de potassium, 6.6g de Sulfate de magnésium, 0.5g d'Hydrogénocarbonate de sodium, et 1.3g de Chlorure de calcium, Compléter à 1l avec l'eau MQ ultrapure. S'assurer de la pureté des produits chimiques afin de ne pas contaminer en NO_2 , NO_3 , PO_4 et $\text{Si}(\text{OH})_4$.

On peut également dissoudre 38g de NaCl (attention à sa pureté) dans 1 litre d'eau MQ ultrapure.

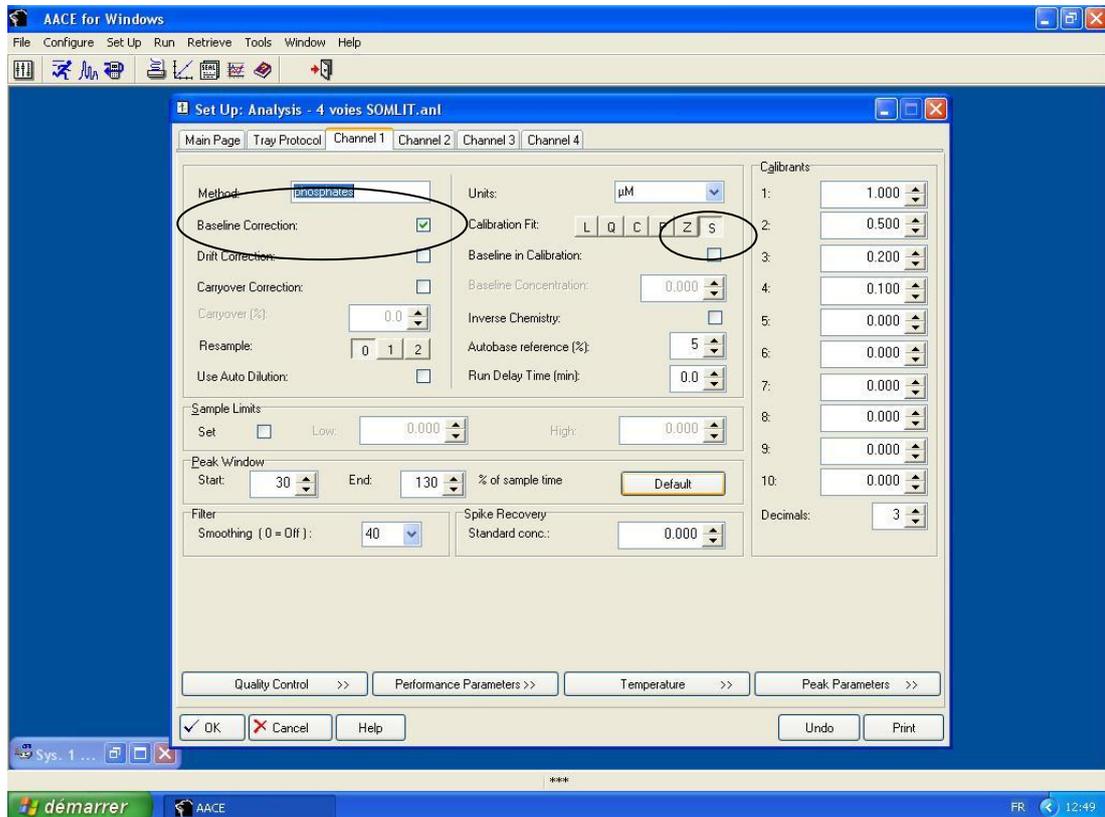
La gamme standard choisie encadrera la gamme de concentrations des échantillons à analyser. Les calculs de concentration des échantillons se feront en utilisant seulement la pente de la droite d'étalonnage.

Ce paragraphe est valable pour des analyses effectuées sur un analyseur automatique type AA3 SEAL/AXFLOW AAHR piloté par le logiciel AACE.

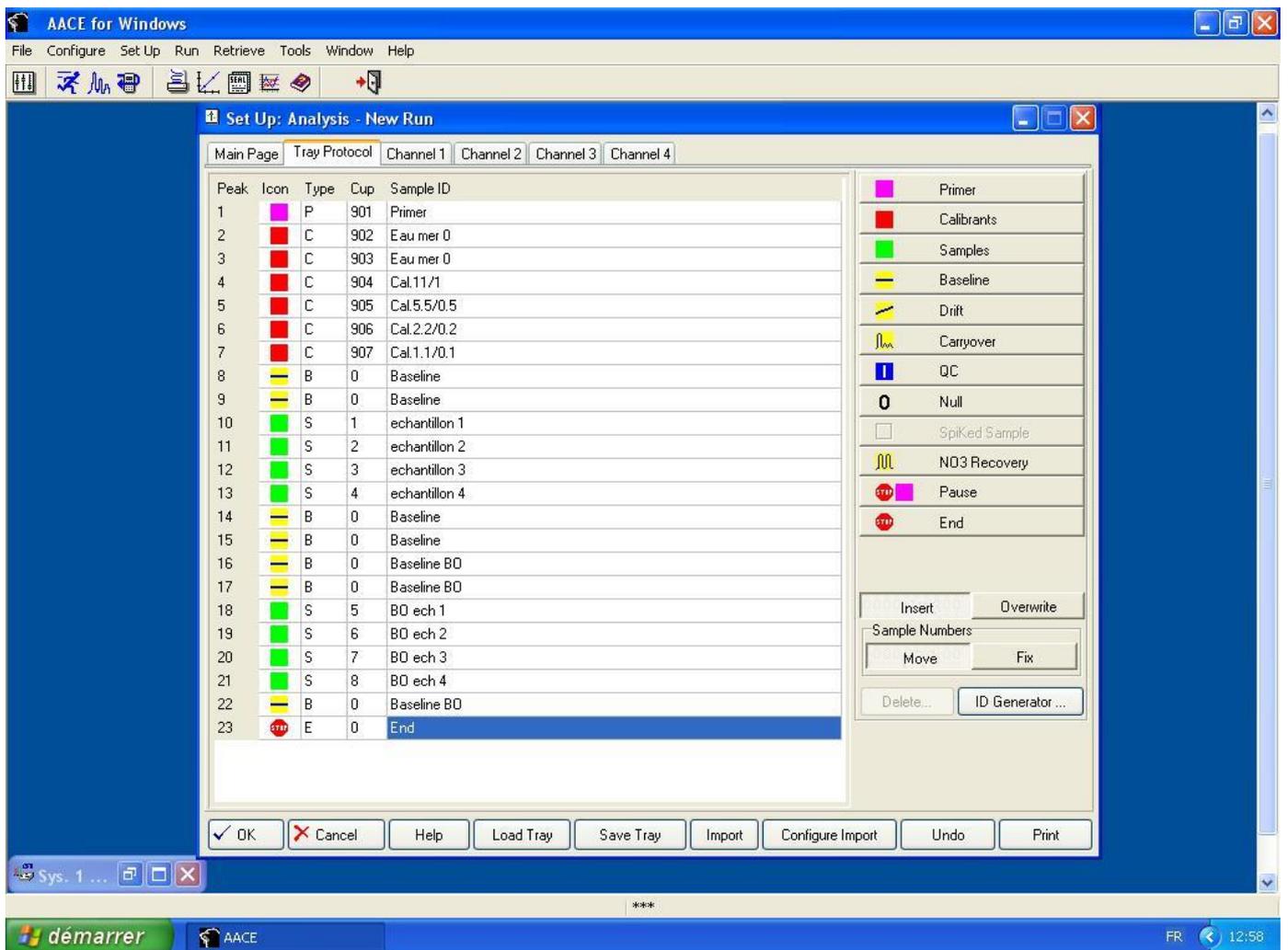
Pour cela, ouvrir le logiciel AACE, puis la fenêtre « Configure Software » puis « Calibration », et sélectionner les cases « Activate options to force linear calibration through zero » et « Normal regression » :



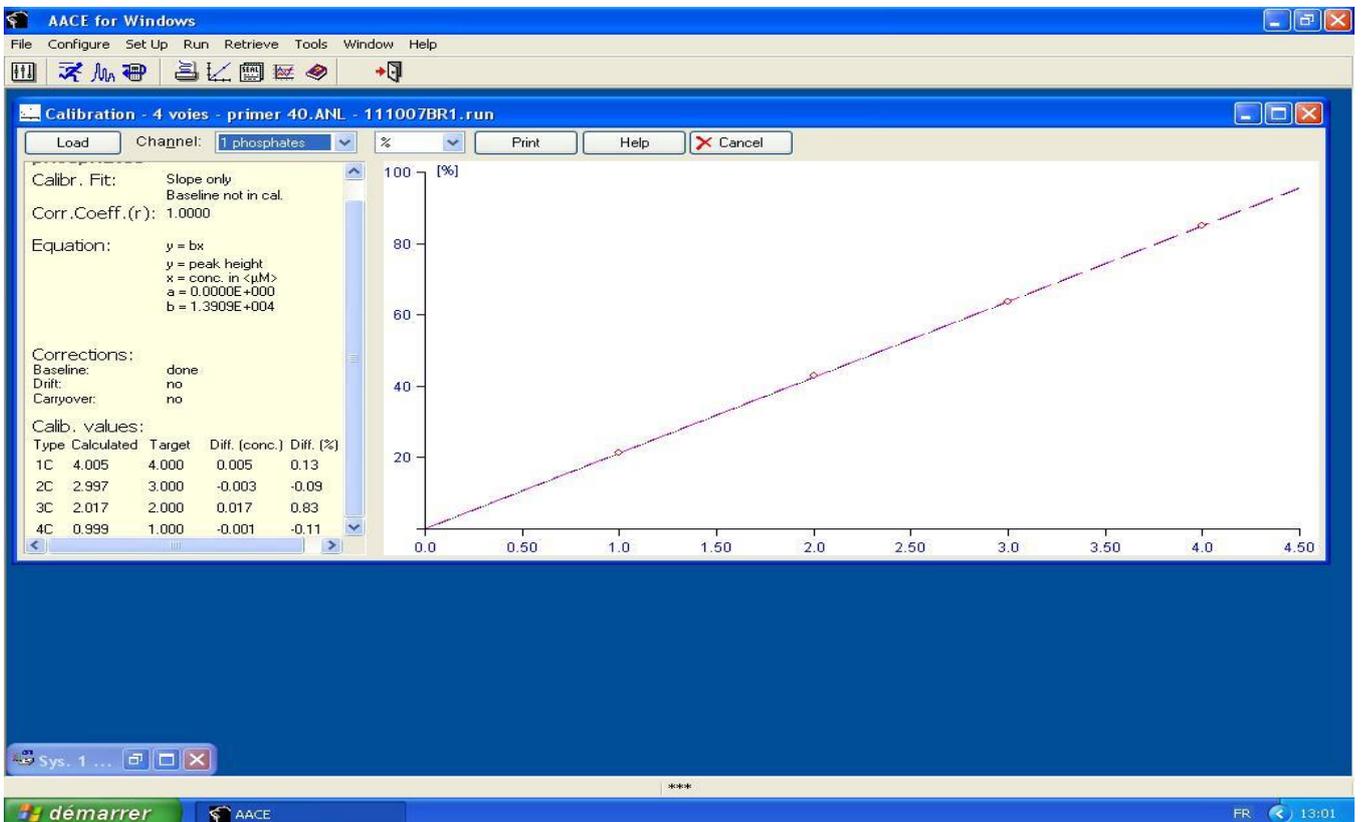
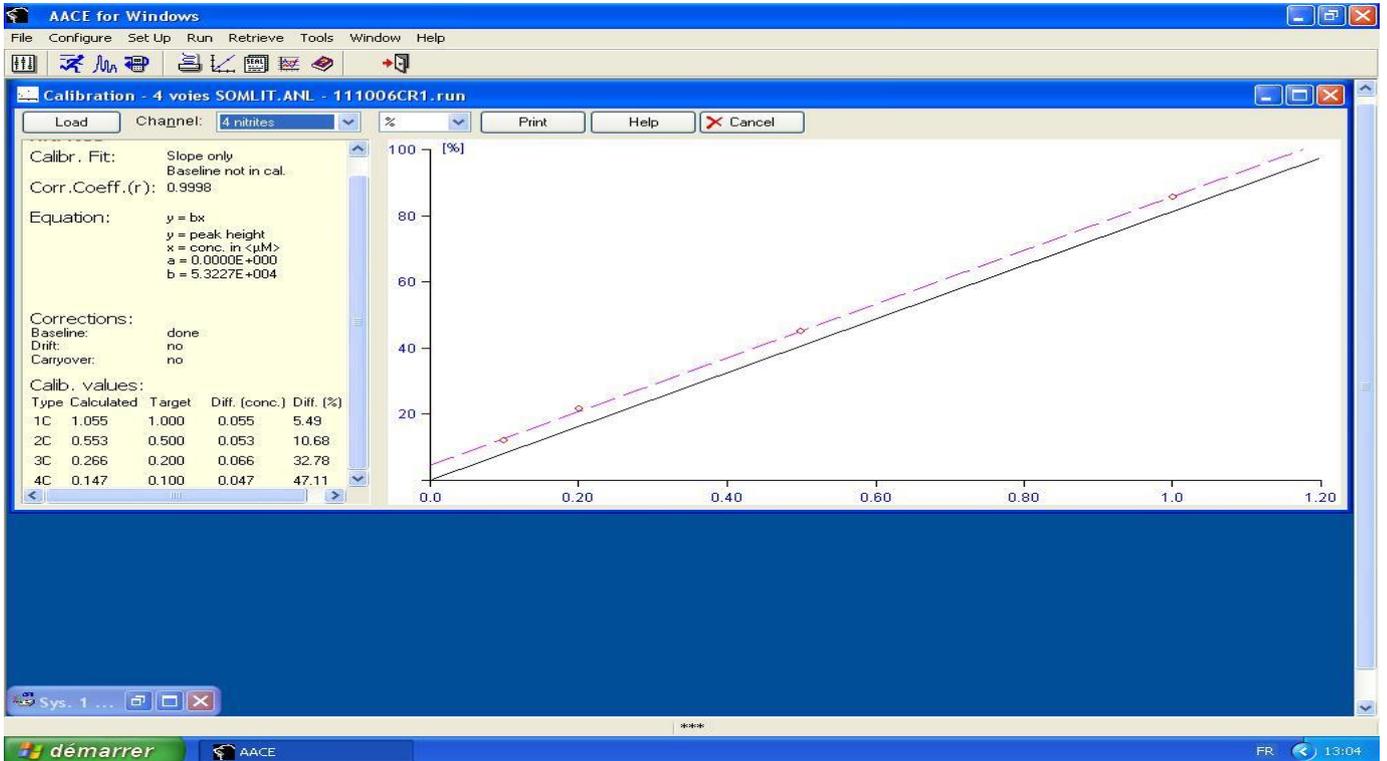
Puis dans le « Set up analysis », sélectionner « Baseline correction » et « S = Slope Only » dans « Calibration Fit ». Les standards peuvent être mis en ordre croissant (Aminot et Kérouel) ou décroissant (à condition d'être vigilant sur un éventuel « carryover » dans ce dernier cas).



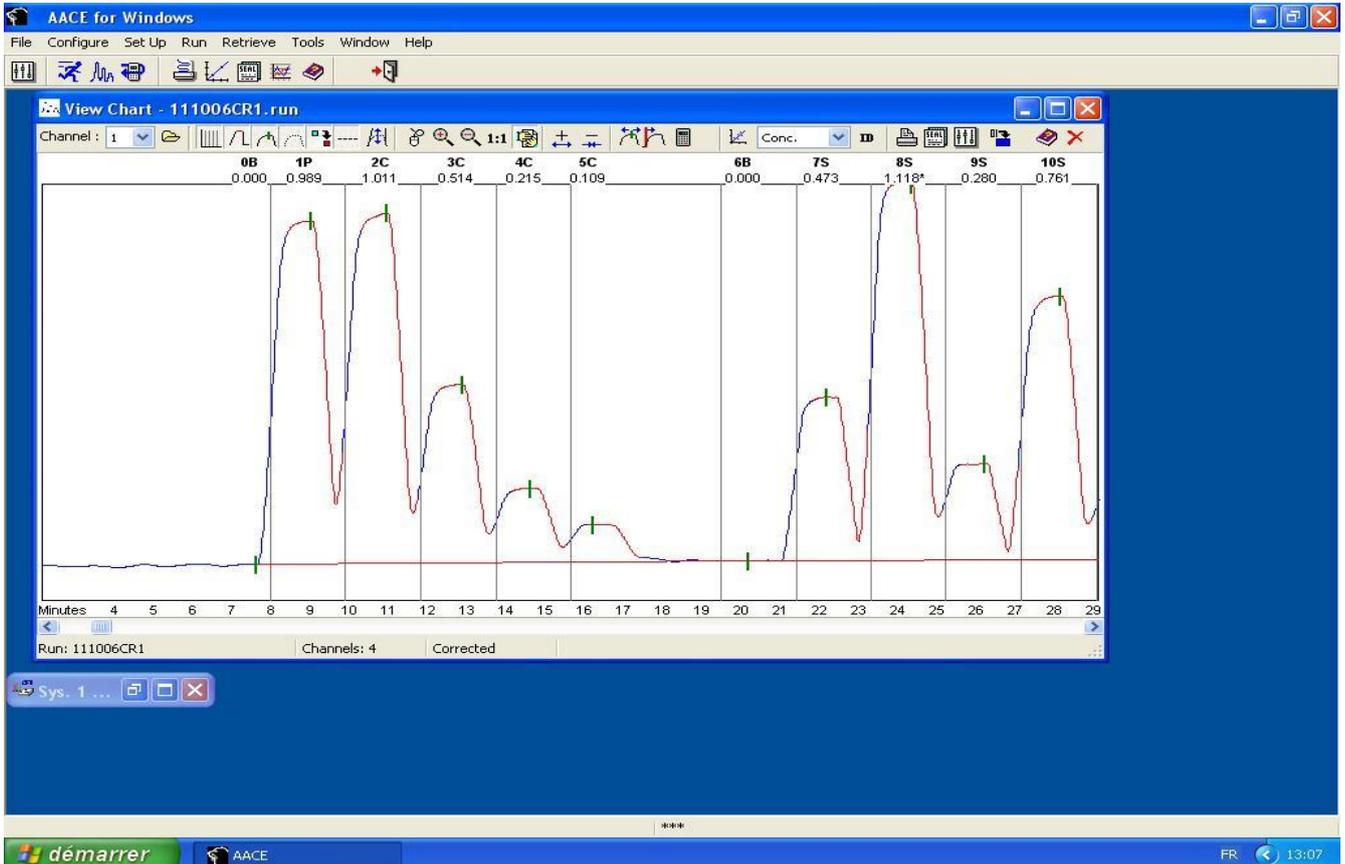
Voici un exemple de « Tray protocol » :



Voici deux exemples de courbes d'étalonnages :



Voici un exemple d'enregistrement :



VII - Corrections

Ce paragraphe est valable pour des analyses effectuées sur un analyseur automatique type AA3 SEAL/AXFLOW AAHR piloté par le logiciel AACE.

Correction de la ligne de base :

Elle est obligatoire : « Baseline » dans le « Tray protocol ». Pour une série d'environ 20 échantillons, il est conseillé de placer une « Baseline » après les standards, une au milieu de la série et une à la fin.

Dérive de sensibilité :

Elle permet de vérifier qu'il n'y a pas de dérives hydraulique, électrique ou réactionnelle (baisse du rendement de la colonne Cd-Cu par exemple).

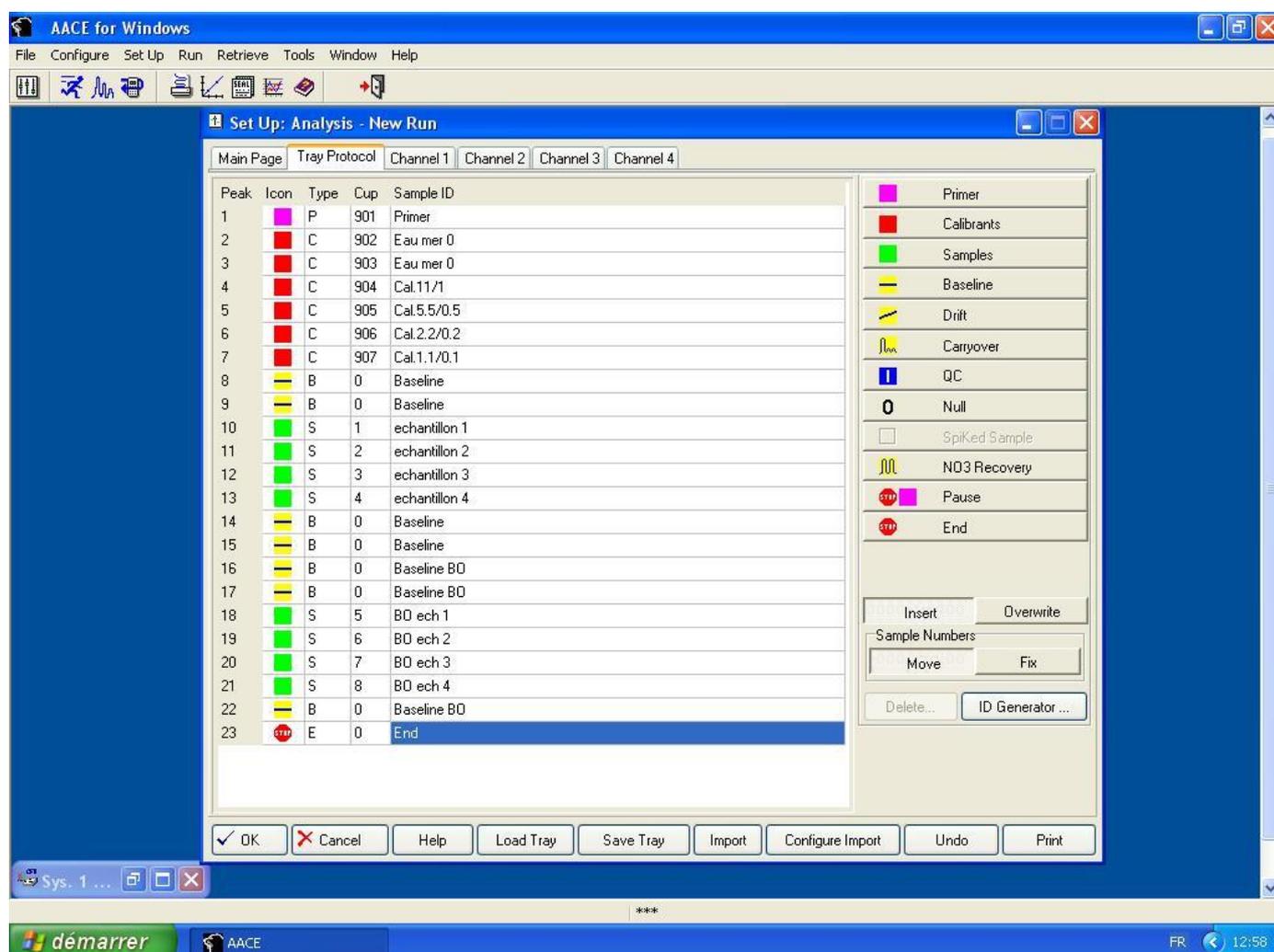
Pour cela, on place le même étalon plusieurs fois en cours de « Run » (= « Drift »). Cette dérive est rare surtout si les séries d'analyses ne dépassent pas une vingtaine d'échantillons. Si nécessaire, on peut recalculer les valeurs obtenues en cochant la case « Drift correction » dans le « Set up analysis ».

On peut utiliser dans ce cas de dérive un standard certifié (OSIL ou CERTIPUR MERCK) qui sont les matériaux de référence pour ce système.

Correction de blanc optique :

« Le blanc optique (BO) est la hauteur du signal produit par l'eau de mer, en phase stationnaire (plateau), mesurée par rapport à l'eau de lavage en l'absence de toute réaction produisant le composé coloré. »*

Cette correction concerne le nitrite, le phosphate et le silicate. On enlève le réactif indispensable à la réaction colorée (garder le réactif où se trouve le mouillant) et on prépare la fin de « Run » comme indiqué ci-dessous (le nombre de « Baseline » après les derniers échantillons peut être augmenté si nécessaire, parfois jusqu'à 5 pour le NO₃):



* Aminot A., Kérouel R., 2007. Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines : méthodes en flux continu. Ed. Ifremer, Méthodes d'analyse en milieu marin 188p.

Il faut savoir que le BO est très faible voir nul avec les nouveaux colorimètres AA3HR. Les valeurs données à titre indicatif par Aminot et Kérouel pour ces colorimètres sont de moins de 0.005µM pour NO₂, 0.10µM pour Si(OH)₄ et -0.03µM pour PO₄.

Correction de l'effet de sel :

Cela concerne des séries d'analyses d'échantillons de salinité différentes. Il est donc préconisé d'analyser dans un « run » des échantillons de même salinité pour s'en affranchir.

VIII - Evolution des méthodes

Nitrite et Nitrate :

Les circuits préconisés par Aminot et Kérouel sont des évolutions de ceux donnés par Tréguer et Le Corre (1974). L'ajout de soude au NH_4Cl directement dans le circuit permet un ajustement automatique du pH à 8.5 et ainsi de ne pas utiliser comme tampon l'ammoniaque, source de contamination pour les analyses NH_4 . La gamme de concentration est très étendue (0-200 μM ou 0-1000 μM avec dilution automatique). La limite de détection est de 0.05 μM^* .

Phosphate :

Les circuits préconisés par Aminot et Kérouel sont des évolutions de ceux donnés par Tréguer et Le Corre (1974). Les réactifs sont injectés directement et non plus mélangés hors circuit. La mesure se fait à 820nm. La gamme est linéaire de 0 à 50 μM . La limite de détection est de 0.003-0.006 μM^* .

Silicate :

Les circuits préconisés par Aminot et Kérouel sont des évolutions de ceux donnés par Tréguer et Le Corre (1974). Les réactifs ont changé (suppression du métol dangereux et remplacement par de l'acide ascorbique). La réponse est linéaire de 0 à 200 μM . La limite de détection est de 0.05 μM^* .

Bilan :

L'évolution des méthodes en flux s'est traduite par une simplification des montages, des changements dans les réactifs et une augmentation des cadences analytiques. Les méthodes sont devenues plus sensibles et ces adaptations ont permis de mesurer les fortes valeurs rencontrées dans les estuaires. Les blancs optique sont quasi négligeables avec la nouvelle optique Haute Résolution des colorimètres AA3 SEAL/AXFLOW AAHR.

Perspectives :

Les colorimètres HR pouvaient laisser croire à une plus grande sensibilité de mesure concernant le dosage des PO_4 dans la gamme nanomolaire. Malheureusement, le signal obtenu est instable et malgré les essais de modifications des débits ou de changements de cuves (la cuve 1cm est finalement la plus adaptée), il est difficile de descendre de manière fiable en deçà de 0.020 μM .

* Aminot A., Kérouel R., 2007. *Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines : méthodes en flux continu*. Ed. Ifremer, *Méthodes d'analyse en milieu marin* 188p.

IX - Qualité

Afin d'homogénéiser la collecte et l'analyse des échantillons sels nutritifs, le protocole « Prélèvements en mer » détaille le type de flacons à utiliser, la manière de prélever proprement les échantillons, comment les conserver jusqu'à l'arrivée au laboratoire.

Concernant les analyses, les laboratoires SOMLIT sont, à une exception près, équipés du même autoanalyseur (AA3 AXFLOW/SEAL AAHR). Les matériaux de référence dans les laboratoires sont uniformes : Standards certifiés OSIL et/ou CERTIPUR MERCK.

Tous les laboratoires participent aux essais d'inter-laboratoires :

- Internationaux (Aoyama 2003, 2012 annulé, 2014)
- Nationaux (EIL Ifremer depuis 2006 et intercomparaisons entre laboratoires SOMLIT sur échantillons naturels et dopés depuis 1999).

X - Bibliographie

- Aminot A., Kérouel R., 2004. Hydrologie des écosystèmes marins. Paramètres et analyses Ed. Ifremer, 336 p
- Aminot A., Kérouel R., 2007. Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines : méthodes en flux continu. Ed. Ifremer, Méthodes d'analyse en milieu marin 188p.
- Kirkwood D.S, 1992. Stability of solutions of nutrient salts during storage. Marine Chemistry, 38: 151-164.
- Treguer P., Le Corre P., 1974. Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer. Utilisation de l'autoanalyseur II Technicon. Lab. Océano. Chim. Univ. Bretagne Occidentale 110p.

XI - Annexes

Matériaux de référence



1- OSIL

Les standards OSIL se présentent en solutions concentrées :

- NO₂ et PO₄ : 100µM
- NO₃ et Si(OH)₄ : 1000µM.

-

Lien du site :

<http://www.osil.co.uk/Products/SeawaterStandards/tabid/113/agentType/View/PropertyID/58/Default.aspx>

Seawater Standards

[Seawater Products](#) » [Nutrient Standards](#) » [Product Details](#)

Nutrient Standard Solutions

Concentrated solutions of phosphate, nitrite, nitrate, silicate and ammonia are available for the preparation of standards.



[Data Sheet](#)

Nutrient Standard Solutions should be diluted with Low Nutrient Seawater to prepare working standards for the measurement of nutrients in seawater samples, in order to eliminate salt effects.

For more information about this product please call +44 (0) 2392 488 240 or email us using the web form below:

Name:

Phone:

Email:

Standards OSIL

SEL	Concentration μM	Dilution	Concentration obtenue μM
NO ₂	100	1ml dans fiole 100ml	1
PO ₄	100	1ml dans fiole 100ml	1
NO ₃	1000	1ml dans fiole 100ml	10
SiOH ₄	1000	1ml dans fiole 100ml	10



Les standards Merck Certipur sont très concentrés : NO₂, PO₄, NO₃ et Si(OH)₄ : 1000 mg/l. On peut les trouver chez VWR (<https://fr.vwr.com/app/Home>).

NO₂ :

<https://fr.vwr.com/app/search/Search?keywords=1198990500&submit.x=0&submit.y=0&search.x=foo&searchOp=and>

NO₃ :

<https://fr.vwr.com/app/search/Search?keywords=1198110500&submit.x=0&submit.y=0&search.x=foo&searchOp=and>

Si :

<https://fr.vwr.com/app/search/Search?keywords=1123100500&submit.x=0&submit.y=0&search.x=foo&searchOp=and>

PO4 :

<https://fr.vwr.com/app/search/Search?keywords=1198980500&submit.x=0&submit.y=0&search.x=foo&searchOp=and>

Les tableaux suivants proposent des dilutions en fioles jaugées de classe A afin d'obtenir des solutions standards compatibles avec les concentrations des échantillons analysés dans le SOMLIT.

CALCUL SOLUTIONS MERCK

NITRATE NO3

1 Mole = 62 g
 Concentration Sol MERCK = 1000 mg/l
 Concentration Sol MERCK = 16129 μM
 Concentration Sol MERCK = 1,619 $\mu\text{mole}/100\mu\text{l}$

NO3	100 μl Sol Merck dans fiole jaugée 100ml ----> standard de	16,13 μM
-----	---	---------------------

NITRITE NO2

1 Mole = 46 g
 Concentration Sol MERCK = 1000 mg/l
 Concentration Sol MERCK = 21739 μM
 Concentration Sol MERCK = 2,173 $\mu\text{mole}/100\mu\text{l}$

NO2	100 μl Sol Merck dans fiole jaugée 100ml ----> standard de	21,73 μM
-----	---	---------------------

PHOSPHATE PO4

1 Mole = 95 g
 Concentration Sol MERCK = 1000 mg/l
 Concentration Sol MERCK = 10526 μ M
 Concentration Sol MERCK = 1,0526 μ mole/100 μ l

PO4 100 μ l Sol Merck dans fiole jaugée 100ml ----> standard de 10,53 μ M

SILICATE SiOH4

1 Mole = 28 g
 Concentration Sol MERCK = 1000 mg/l
 Concentration Sol MERCK = 35714 μ M
 Concentration Sol MERCK = 3,5714 μ mole/100 μ l

Si 100 μ l Sol Merck dans fiole jaugée 100ml ----> standard de 35,71 μ M

AMMONIUM NH4

1 Mole = 18 g
 Concentration Sol MERCK = 1000 mg/l
 Concentration Sol MERCK = 55556 μ M
 Concentration Sol MERCK = 5,5556 μ mole/100 μ l

NH4 100 μ l Sol Merck dans fiole jaugée 100ml ----> standard de 55,55 μ M

Solutions CERTIPUR/Merck - VWR

SEL	REFERENCES MERCK	CONCENTRATION mg/l	<i>M</i> (1 μ M) mg/l	CONCENTRATION mM	Dilution pour SOMLIT	CONCENTRATIONS OBTENUES
NO2	1.19899.0500	1000 +/- 5	0,046	21,739	25 μ l/500 ml 100 μ l/100ml	1,08 μ M 21,73 μ M
PO4	1.19898.0500	999 +/- 2	0,095	10,526	25 μ l/250 ml 100 μ l/100ml	1,05 μ M 10,53 μ M
NO3	1.19811.0500	1003 +/- 5	0,062	16,177	100 μ l/250 ml 100 μ l/100ml	6,48 μ M 16,13 μ M
Si(OH)4	1.12310.0500	1002 +/- 2	0,0281	35,658	50 μ l/250 ml 100 μ l/100ml	7,02 μ M 35,71 μ M