

Détermination de la concentration en
Carbone et Azote Organiques Particulaires
(COP et NOP)

Rédigé par :
Sabrina Bichon
Nicolas Savoye

Evolutions/Corrections :
Philippe Pineau
Nicole Garcia

Visé par :
Nicole Garcia, responsable
qualité national
Le : 31 Janvier 2020



I - Introduction

La concentration en carbone et azote organiques particulaires permet de quantifier la matière organique particulaire. Cette dernière représente l'ensemble de la matière particulaire vivante ou d'origine vivante. Par ailleurs, les rapports COP/NOP et COP/chlorophylle *a* permettent de caractériser la qualité (origine, composition, état de fraîcheur ou de dégradation) de la matière organique particulaire

Les COP et NOP sont déterminés par combustion du matériel particulaire récupéré par filtration. La combustion de la matière organique produit des oxydes volatils, CO_2 , CO (si la combustion est incomplète) et NO_x , qui sont ensuite convertis en CO_2 et N_2 . Ces derniers sont séparés par chromatographie en phase gazeuse et quantifiés par un détecteur de type TCD (Thermal Conductivity Detector).

Le cas échéant, les COP et NOP peuvent être analysés sur le même filtre que les MES ou les isotopes stables ($\delta^{13}C$ et $\delta^{15}N$).

Les concentrations en COP et NOP sont exprimées en $\mu g\ l^{-1}$.

Précision requise (répétabilité) : selon les appareils utilisés. Limite de détection : selon les appareils utilisés

II - Précautions particulières

Les principaux biais analytiques sont liés à la dégradation de la matière (en particulier sous atmosphère humide ou lors de l'homogénéisation de l'eau) et à la contamination par le matériel particulaire (e.g. poussières), dissous (matière organique dissoute) ou même volatil (ammoniac, ammonium), ainsi que par le carbone inorganique (particulaire et dissous).

Le manipulateur (à bord, lors des filtrations et lors de la préparation des échantillons) devra éviter de porter des tissus pelucheux (laine par exemple) : les fibres de ces tissus se retrouvent très rapidement sur l'échantillon. De même, la poussière pouvant apporter des contaminations, l'échantillon (eau puis filtre) doit être laissé à l'abri de la poussière lors de chacune des étapes du protocole (en particulier lors de la filtration, de la décarbonatation et des étuvages).

Le matériel utilisé lors des filtrations et du stockage des filtres sera de préférence en verre, nettoyé à l'acide et, dans ce cas, calciné au four 4h à $450^\circ C$.

Par ailleurs, les précautions nécessaires devront être prises pour éviter toute contamination par l'ammoniac ou l'ammonium. En particulier, les filtres COP-NOP seront filtrés dans une pièce, sur du matériel et séchés dans une étuve n'ayant pas été en contact (sous forme liquide comme gazeuse) avec de l'ammoniac ou de l'ammonium (par exemple, formiate d'ammonium utilisé pour le rinçage des filtres MES, préparation des solutions étalon d'ammonium, etc.)

Comme pour tout paramètre particulaire, veiller à manipuler l'eau délicatement afin de ne pas endommager les cellules phytoplanctoniques éventuellement présentes.

Dans les cas où la matière organique dissoute (MOD) s'adsorbe fortement sur la matrice des filtres, il convient de la corriger de façon spécifique (Moran *et al.*, 1999 ; voir section VI).

Il a été reporté que la congélation des filtres suivie d'une décarbonatation par HCl fumant pouvait biaiser les mesures de NOP (Lorrain *et al.*, 2003). Le présent protocole recommande donc un séchage des filtres aussitôt après filtration et un stockage en dessiccateur à température ambiante.

La décarbonatation de l'échantillon est faite par HCl fumant ou H₂SO₄ dilué. Lors de cette étape, le port d'une blouse, de gants et de lunettes de protection est impératif.

III - Matériel et appareillage utilisés

- ✓ Four à calcination (500°C)
- ✓ Bouteille Niskin
- ✓ Flacon de prélèvement de préférence opaque.
- ✓ Rampe de filtration
- ✓ Fiole à vide
- ✓ Pompe à vide munie d'un manomètre
- ✓ Support de filtration 25 mm en verre
- ✓ Filtre GF/F de diamètre 25 mm
- ✓ Eprouvettes graduées
- ✓ Pinces à bout plat
- ✓ Piluliers en verre avec bouchons plastique ou boîtes de pétri en verre.
- ✓ Etuve. **NE PAS UTILISER L'ETUVE OU LES FILTRES TRAITES AU FORMIATE D'AMMONIUM SECHENT → CONTAMINATION.**
- ✓ Dessiccateur de stockage
- ✓ Dessiccateur pour décarbonatation muni d'un support de filtration en ligne
- ✓ Trompe à eau
- ✓ Hotte
- ✓ Nacelles en étain 9x5mm (référence : selon l'appareil utilisé). Elles peuvent être calcinées à 175°C durant 4H.
- ✓ Balance de précision à 10 microgrammes
- ✓ Analyseur élémentaire (e.g. ThermoFinnigan Flash EA1112) et son petit matériel associé

IV - Produits chimiques et réactifs utilisés

- ✓ HCl fumant 37%.
- ✓ H₂SO₄ 95-97%.
- ✓ Calibrants pour le contrôle qualité selon l'appareil utilisé (ex Acide aspartique certifié, glycine).
- ✓ Calibrants pour contrôle de dérive temporelle selon l'appareil utilisé (ex : Acétanilide certifiée, glycine)
- ✓ Réactifs pour analyseur élémentaire.

Pour les fiches de sécurité, consulter le site de l'Institut National de Recherche et de Sécurité :

<http://www.inrs.fr>

V - Préparation des piluliers et des filtres

1- Les piluliers. Avant utilisation, les piluliers sont nettoyés durant une nuit (i.e. plusieurs heures) dans un bain d'acide chlorhydrique 1,2N, rincés trois fois à l'eau déminéralisée puis séchés à l'étuve (ils peuvent être placés ouverture en bas en cas de risque de contamination par des poussières). Ils sont ensuite calcinés pendant 4h à 450°C (pour éviter les chocs thermiques, placer les piluliers dans le four et les ôter quand le four est à température ambiante ou quand la température n'est pas trop

élevée). Les bouchons des piluliers subissent juste un nettoyage à l'eau déionisée suivi d'un séchage à l'étuve.

On peut également utiliser des boîtes de pétri en verre qui seront prétraitées de la même manière.

Conservation et stockage : les piluliers peuvent être conservés bouchés et à l'abri de la poussière pendant une année ou plus.

2- Les filtres : Les filtres (GF/F 25mm) sont placés par petites séries (e.g. 10-20 = un batch) dans du papier aluminium et calcinés pendant 4h (± 15 min) à 500°C (± 10 °C). Attention : les filtres doivent être placés dans le four et ôtés de celui-ci quand la température est de 500°C. Une température ou un temps de calcination plus important pourrait endommager la texture du filtre, et ainsi modifier ses propriétés de filtration.

Conservation et stockage : les filtres doivent être conservés à l'abri de la poussière. Cette conservation peut durer 3 à 6 mois selon l'environnement du laboratoire si le papier aluminium les contenant n'est pas ouvert (au-delà, les blancs commencent à évoluer). Quand un batch est en cours d'utilisation, veiller à ce que celui-ci ne le soit pas plus de deux mois, les filtres se contaminant au cours du temps quand ils sont mis au contact répété avec l'atmosphère. Au moins trois filtres vierges sont extraits de chaque batch (un le premier jour d'utilisation du batch, un au milieu et un le dernier jour d'utilisation du batch) pour mesure du blanc, sauf pour les eaux à forte matière organique dissoute (voir sections VI et X)

VI - Prélèvement, conditionnement et conservation des échantillons

Les prélèvements d'eau de mer sont réalisés à l'aide d'une bouteille Niskin. Ces prélèvements doivent être fait de préférence sur la même bouteille que les autres paramètres particuliers (MES, chlorophylle *a*, isotopes), sinon sur une bouteille prélevée immédiatement avant ou après.

L'eau est versée dans des flacons (de préférence opaques) rincés au moins une fois avec l'eau prélevée ; éviter les turbulences afin de ne pas endommager les cellules phytoplanctoniques éventuellement présentes. Les échantillons d'eau sont conservés au frais (e.g. lieu aéré à l'ombre) et à l'abri de la lumière jusqu'à la filtration.

La filtration est faite dans les plus brefs délais. La rampe de filtration est reliée à une pompe à vide munie d'un manomètre. Le vide ne doit pas dépasser 0,2-0,3 bar de dépression.

Placer le filtre sur la base de filtration à l'aide d'une pince de préférence à bout plat. Placer la tulipe. Homogénéiser le flacon contenant l'eau échantillonnée par plusieurs retournements doux. Attention à ne pas agiter trop brutalement le flacon afin de ne pas endommager les cellules phytoplanctoniques éventuellement présentes.

Prélever 100 à 2000 ml (selon les sites de prélèvement et la période de l'année) d'eau de mer dans une éprouvette graduée (sans turbulences afin de ne pas endommager les cellules phytoplanctoniques éventuellement présentes), verser l'eau dans la tulipe de filtration. Couvrir la tulipe de filtration et l'éprouvette (par ex. de papier aluminium) pendant la filtration.

Après filtration, rincer minutieusement la tulipe et le filtre à l'eau du prélèvement filtrée (éventuellement à l'eau déionisée pour les échantillons d'eau douce et d'estuaire) afin de récupérer sur le filtre toutes les particules restées sur les bords de la tulipe. Placer le filtre ouvert (ne pas le plier) dans un pilulier ou la boîte de pétri.

Placer le pilulier ou la boîte de pétri dans une étuve à 50°C pendant une nuit. Afin d'éviter la contamination par des poussières, les piluliers peuvent être grossièrement couverts d'une feuille d'aluminium ou placés couchés. Le bouchon peut de même être placé dans l'étuve. Retirer le pilulier ou la boîte de pétri de l'étuve et le boucher. Placer le pilulier ou la boîte de pétri contenant le filtre dans un dessiccateur, si possible à l'abri de la lumière.

Blanc : déposer un filtre sur la base de filtration, rincer ce filtre avec quelques ml d'eau de l'échantillon filtrée puis procéder comme pour un échantillon.

Pour les eaux à fort rapport matière organique dissoute / matière organique particulaire (e.g. Wimereux) : La matière organique dissoute s'adsorbe sur la matrice du filtre GF/F et peut contribuer de façon importante au signal COP ou NOP. Dans les cas où la matière organique dissoute s'adsorbe fortement, le meilleur moyen de corriger cette interférence est de filtrer, pour chaque prélèvement, trois volumes d'eau croissants (Moran et al., 1999). Le calcul de la correction est détaillé en section X.

Il convient de tester l'importance de cette interférence à chaque station de prélèvement et à chaque saison. Les résultats sont reportés en annexe de ce protocole.

VII - Préparation des échantillons

Décarbonatation :

a) HCl fumant : Vérifier que le dessiccateur est propre. S'il ne l'est pas, le nettoyer à l'eau déionisée. Vérifier que l'HCl fumant est toujours fumant. Placer un cristalliseur contenant de l'HCl fumant dans le fond d'un dessiccateur en verre. Disposer les piluliers ouverts sur la grille du dessiccateur.

Faire un vide grossier dans le dessiccateur (e.g. à l'aide d'une trompe à eau). Fermer le dessiccateur. Débrancher le tuyau reliant le dessiccateur à la trompe à eau. Fermer la trompe à eau.

Attention : une inversion des trois étapes précédentes peut conduire à l'entrée d'eau dans le dessiccateur et ainsi à la contamination des échantillons.

Attendre 4h pour les échantillons peu ou moyennement chargés en particules et 8h pour les autres (Luc/mer, estuaire de la Gironde). Placer un filtre GF/F dans un support de filtre 'en ligne' et raccorder ce dernier à la prise d'air du dessiccateur. Casser le vide en douceur en ouvrant délicatement le robinet de la prise d'air.

Sortir les piluliers du dessiccateur, les placer sous hotte aspirante et les recouvrir grossièrement de papier aluminium (cette couverture permet d'éviter la contamination des échantillons par des poussières tout en laissant l'acide s'évaporer). Attendre environ 3h sous hotte pour évaporer le maximum d'HCl. Mettre les piluliers à l'étuve à 50°C pendant une nuit pour poursuivre l'évaporation d'HCl.

Retirer les piluliers de l'étuve et replacer les bouchons. Placer les piluliers contenant les filtres dans un dessiccateur, si possible à l'abri de la lumière (cf. VI). Analyser les filtres le plus rapidement possible (e.g. dans la semaine).

b) H₂SO₄ dilué 0.5N : Une petite quantité d'H₂SO₄ 0.5N est préparée régulièrement : 1.5ml d'H₂SO₄ 95-97% dans 100ml d'eau déionisée. Les boîtes de pétri en verre contenant les filtres sont ouvertes. Sur chaque filtre, 100µl d'acide dilué sont répartis afin de bien imbiber le filtre. Les couvercles sont remis et les boîtes de pétri mises à l'étuve entre 4 et 24H. Analyser les filtres le plus rapidement possible (e.g. dans la semaine).

Mise en nacelles :

A l'aide de pinces (de préférence à bout plat), plier le filtre et l'insérer dans une nacelle en étain (9x5mm) en s'assurant que les pinces n'entrent pas en contact avec les particules retenues sur le filtre. Refermer la nacelle en s'assurant que le filtre y est bien emprisonné.

On peut également utiliser des presses spécifiques qui permettent de bien compresser le filtre dans la nacelle (voir station de Marseille).

VIII - Préparation et étalonnage de l'analyseur élémentaire

Préparation de l'analyseur : se référer au protocole de l'appareil.

Étalonnage :

La gamme d'étalonnage, faite de 6 points, est préparée par pesée d'acétanilide dans des nacelles en étain préalablement tarées. Les standards de quantité minimale et maximale doivent encadrer l'ensemble des valeurs des échantillons. L'étalonnage peut également se faire avec de la glycine.

Contrôle qualité :

Un matériel de référence, l'acide aspartique, est analysé pour vérifier la justesse de l'étalonnage.

Un échantillon d'acétanilide est analysé tous les 10 échantillons en tant qu'inconnu pour vérifier et quantifier la dérive de l'analyseur au cours de la journée d'analyse. Là aussi le contrôle qualité peut se faire avec de la glycine.

IX - Mesure

Se référer au protocole de l'appareil.

X - Calcul

Correction de la dérive temporelle :

La dérive temporelle, si elle est constatée, doit être corrigée à l'aide des échantillons d'acide aspartique.

Correction du blanc :

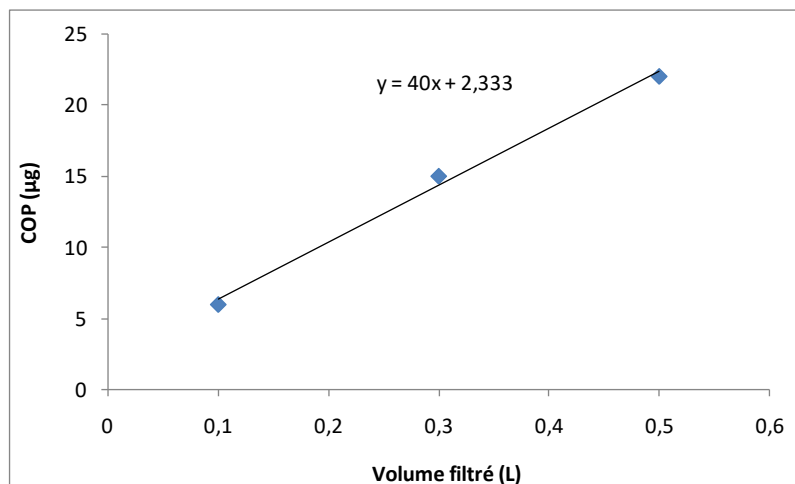
Le blanc doit être systématiquement pris en compte dans le calcul. Ceci est effectué par soustraction du blanc à la quantité de COP ou NOP mesuré sur chaque filtre :

$$[\text{COP}]_{\text{échantillon}} = (\text{COP}_{\text{mesuré}} - \text{COP}_{\text{blanc}}) / V_{\text{filtré}}$$

[COP] est exprimé en $\mu\text{g l}^{-1}$, COP est exprimé en μg et V en litre.

Pour les eaux peu chargées en matière organique dissoutes, $\text{COP}_{\text{blanc}}$ est la moyenne de plusieurs filtres préparés comme indiqué en section VI.

Pour les eaux chargées en matière organique dissoute, $\text{COP}_{\text{blanc}}$ est l'ordonnée à l'origine de la droite $\text{COP}_{\text{mesuré}} = f(V_{\text{filtré}})$ (voir figure ci-dessous).



La concentration en NOP est calculée de façon similaire.

XI - Erreur Maximale Tolérée

Ce paragraphe est en cours de rédaction.

XII - Entretien du matériel

Rincer le système de filtration (rampe + tulipe de filtration), l'éprouvette et la bouteille de prélèvement à l'eau douce puis à l'eau déionisée ou plusieurs fois à l'eau déionisée.

Les piluliers et bouchons ou les boites de pétri en verre sont reconditionnés comme expliqué en section V.

Une à deux fois par an, nettoyer la tulipe de filtration et le fritté comme suit : le fritté est placé 30 minutes en bain ultra-son ; placer le fritté et l'entonnoir une nuit dans un bain d'HCl 10% (1,2N) ; rincer à l'eau déionisée puis MilliQ ; placer la tulipe (mais surtout pas le fritté qui pourrait être endommagé) au four à 450°C de la même façon que les piluliers (cf. section V)

En cas d'encrassement rapide du fritté (e.g. estuaire de la Gironde), le placer en bain ultrason (30 minutes), en bain acide puis le rincer à l'eau déionisée et MilliQ après chaque utilisation.

XIII - Conservation et entretien de l'appareillage

Se référer au protocole de l'appareil.

XIV - Evacuation des essais et des déchets

L'HCl fumant doit être utilisé de façon unique pour la décarbonatation. Il peut ensuite être utilisé comme acide de lavage après dilution au dixième.

L'acide de lavage peut être utilisé plusieurs fois. Quand il est jugé devoir être remplacé, l'évacuer selon les règles Hygiène et Sécurité en vigueur dans chaque établissement.

XV - Bibliographie

Aminot A., Kérouel R., 2004. Hydrologie des écosystèmes marins. Paramètres et analyses. Méthodes d'analyse en milieu marin, Ed. Ifremer, 336p.

Lorrain A., N. Savoye, L. Chauvaud, Y-M. Paulet and N. Naulet, 2003. Decarbonation and preservation method for the analysis of organic C and N contents and stable isotope ratios of low-carbonated suspended particulate material. *Analytica Chimica Acta*, 491, 125-133.

Moran S.B., M.A. Charette, S.M. Pike, C.A. Wicklund, 1999. Differences in seawater particulate organic carbon concentration in samples collected using small- and large-volume methods: the importance of DOC adsorption to the filter blank. *Marine Chemistry*, 67, 33-42.

Protocole JGOFS: Preparation of sediment trap material for organic carbon and nitrogen analyses by J. C. Weber and M. H. Conte, BIOS/MBL Updated: 25Aug08