

Détermination des $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ de la matière organique particulaire

Rédigé par :

Sabrina Bichon
Nicolas Savoye
Patrick Rimbault

Corrections/Annotations :

Cédric Leroux
Nicole Garcia

Visé par :

Philippe PINEAU,
responsable qualité national
Le : 31 janvier 2023



I - Introduction

Dans les écosystèmes côtiers dont la matière organique particulaire (MOP) est issue de nombreux réservoirs et de nombreuses sources, les isotopes stables du carbone et de l'azote organique particulaire ($\delta^{13}\text{C}_{\text{COP}}$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{NOP}}$), associés à d'autres paramètres tels que les rapports COP/NOP et COP/chlorophylle *a*, permettent de déterminer l'origine de la matière organique particulaire. Par exemple, le $\delta^{13}\text{C}_{\text{COP}}$ du matériel continental est typiquement de l'ordre de -26/-30‰, celui du phytoplancton marin de -20‰, et celui des phanérogames aquatiques (zostères, posidonies, spartines) et du microphytobenthos de -16/-11‰. Dans les milieux dont la MOP est dominée par le phytoplancton, $\delta^{13}\text{C}_{\text{COP}}$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{NOP}}$ fournissent des informations essentielles concernant sa productivité et l'utilisation des nutriments azotés.

La mesure des isotopes stables de la MOP se fait par spectrométrie de masse à rapports isotopiques couplée à l'analyse élémentaire à partir d'un filtre d'eau de mer. Les isotopes sont reportés selon la notation 'delta' dans l'unité pour mille (unité relative). Cette notation est définie comme suit :

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \left(\frac{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{échantillon}}}{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{référence}}} - 1 \right)$$

$$\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = \left(\frac{\left(\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \right)_{\text{échantillon}}}{\left(\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \right)_{\text{référence}}} - 1 \right)$$

Pour le carbone, la référence est le PDB (Pee Dee Belemnite, roche calcaire du Crétacée) ; celle de l'azote est l'azote atmosphérique global moyen. Ainsi par définition, le $\delta^{15}\text{N}$ de l'azote atmosphérique est de 0‰. La précision souhaitée est $\leq \pm 0,2\text{‰}$.

Il n'y a pas à proprement parler de limite de détection pour les spectromètres de masse. Par contre, il existe une quantité de matière (C ou N) en dessous de laquelle la valeur fournie par le spectromètre n'a pas de sens. Cette valeur est variable en fonction des constructeurs, des modèles, des réglages. Par exemple, dans des conditions classiques, le spectromètre de masse Micromass Isoprime du laboratoire EPOC (Bordeaux), nécessite une quantité minimale de 20-30 μg de carbone ou d'azote pour fournir une valeur isotopique fiable. **A Marseille, le spectromètre utilisé (SERCON Integra CN) nécessite une quantité minimale de 50 μg de C et 30 μg de N.** De même, une valeur maximale ne doit pas être dépassée. Ces deux valeurs définissent la 'zone de linéarité', zone dans laquelle la valeur isotopique fournie par le spectromètre est indépendante de la quantité de matière injectée.

Du fait de la très faible concentration en particules des stations méditerranéennes comparativement aux stations Manche-Atlantique et consécutivement aux grands volumes d'eau nécessaires pour avoir un signal correct, la partie filtration du protocole est adaptée en fonction des volumes de filtration nécessaires pour ces deux façades.

II - Précautions particulières

Les filtres sont séchés dans une étuve différente de celle dans laquelle sèchent les filtres MES rincés au formiate d'ammonium. **Il existe un risque important de contamination en azote lors de l'évaporation du formiate d'ammonium.** De même, éviter toute manipulation de formiate d'ammonium ou de tout composé azoté volatil (ammonium, ammoniac, etc.) dans la pièce dans laquelle les filtrations sont effectuées. Afin d'éviter que des particules de plastique n'atteignent l'échantillon, les tulipes de filtration utilisées doivent être en verre.

Tous les six mois (ou plus souvent si nécessaire), les tulipes et leurs frittés sont placés une nuit dans un bac d'HCl 1,2N, rincés à l'eau déionisée, séchés à l'étuve puis passés au four à 450°C pendant 4h

(pour éviter les chocs thermiques, placer le matériel dans le four et les ôter quand le four est redevenu à température ambiante ou quand la température n'est pas trop élevée).

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).

Les objets utilisés lors de la manipulation du filtre (pincés, spatules/scapels) doivent être nettoyés à l'éthanol avant utilisation et entre chaque échantillon.

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

Enfin, il est déconseillé d'utiliser certains rubans adhésifs pour inscrire le nom de l'échantillon sur les piluliers, ceux-ci pouvant apporter des contaminations lors de la décarbonatation sous HCl fumant. Privilégier le feutre 'indélébile' ou même graver les piluliers.

La décarbonatation est faite sous hotte aspirante. Le port d'une blouse, de gants et de lunettes de protection est obligatoire.

III - Matériel utilisé

Toutes stations :

- Bouteille Niskin
- Rampe de filtration
- Fiole à vide (éventuellement)
- Pompe à vide
- Filtre GF/F de diamètre 47 mm calciné
- Pincés à bout plat
- Piluliers ou boîtes de pétri en verre
- Four à calcination
- Une étuve pour sécher les filtres après filtration (différente de celle utilisée pour le séchage des MES si utilisation du formiate d'ammonium).
- Une étuve pour sécher le filtre après acidification (cette étuve peut être la même que la précédente).
- Un dessiccateur de stockage (éventuellement)
- Nacelles en étain (0,5 x 0,9 mm)
- Microspatule métallique, lame de scalpel, pour gratter le filtre
- Balance de précision à 10 μ g
- Colonnes de combustion et de réduction (analyseur élémentaire)
- Creuset récupérateur de cendres en quartz
- Analyseur élémentaire couplé à un spectromètre de masse à rapports isotopiques

Stations Manche-Atlantique :

- Flacon de prélèvement de préférence opaque
- Eprouvette graduée de préférence en verre
- Support de filtration 47mm de préférence en verre
- Un dessiccateur muni d'un bécher ou d'un cristalliseur pour décarbonatation

Stations méditerranéennes :

- Jerrican 5 litres Nalgène avec robinet dédié aux isotopes
- Support de filtre *on line* 47mm avec robinet de purge

IV - Produits chimiques utilisés

Tout dépend de l'appareil utilisé. Voici la liste des principaux produits chimiques utilisés dans les stations d'Arcachon et de Marseille, stations références pour l'analyse isotopique en 2016.

HCl fumant 37%
HCl 1,2N
H₂SO₄ 95-97%
H₂SO₄ 0.25N
Standards isotopiques certifiés
Standards isotopiques calibrés localement (éventuellement)
Cuivre oxydé
Cuivre réduit
Oxyde de cobalt argenté
Laine de quartz
Ethanol
Perchlorate de magnésium
Carbosorb
Fil d'Argent
Oxyde de chrome

V - Préparation des filtres et de leur contenant

Avant utilisation, les piluliers et leurs bouchons ou les boîtes de pétri sont nettoyés une nuit (i.e. plusieurs heures) dans un bain d'acide chlorhydrique 1,2N, rincés à l'eau déionisée puis séchés à l'étuve (ils peuvent être placés ouverture en bas en cas de risque de contamination par des poussières). Les piluliers (sans les bouchons) ou les boîtes de pétri 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 redescendu à température ambiante ou quand la température n'est pas trop élevée).

Conservation et stockage : les piluliers peuvent être conservés bouchés et à l'abri de la poussière (e.g. dans un sac zip-lock) pendant une année.

Les filtres (GF/F 47mm) sont placés par petites séries (e.g. 10-20 = un batch) dans du papier aluminium et calcinés pendant 4h (\pm 15 min) à 500°C (\pm 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 peuvent être conservés plusieurs mois (e.g. 6 mois) à l'abri de l'humidité (e.g. dans un sac zip-lock ; un dessiccateur n'est pas nécessaire) si le papier aluminium les contenant n'est pas ouvert. Quand un batch est en cours d'utilisation, veiller à ce que celle-ci ne dure pas plus de quelques mois (e.g. 2-3 mois), les filtres se contaminant au cours du temps quand ils sont mis au contact répété de l'atmosphère.

VI - Prélèvement, conditionnement et conservation des échantillons

Les prélèvements d'eau de mer sont réalisés un mètre sous la surface à l'aide d'une bouteille Niskin. Ces prélèvements doivent être faits sur la même bouteille que les autres paramètres particuliers (MES, chlorophylle *a*, COP, NOP) ou sur une bouteille prélevée immédiatement après.

L'eau est versée dans des flacons (éventuellement opaques) ou dans le jerrican isotopes 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 de mer 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 (ou le filtreur on line) est reliée à une pompe à vide munie d'un manomètre. Le vide ne doit pas dépasser 0,2-0,3 bar de dépression.

Manche-Atlantique : Placer le filtre sur le support de filtre à l'aide d'une pince de préférence à bout plat. Placer la tulipe. Homogénéiser le flacon contenant l'eau échantillonnée par plusieurs retournements. Attention à ne pas agiter trop brutalement le flacon afin de ne pas endommager les cellules phytoplanctoniques éventuellement présentes. Verser l'eau dans une éprouvette graduée (sans turbulences afin de ne pas endommager les cellules phytoplanctoniques éventuellement présentes), noter le volume, verser l'eau dans la tulipe de filtration. Le volume filtré doit être ajusté afin que la filtration dure environ trente minutes. 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 de mer filtrée afin de récupérer sur le filtre toutes les particules restées sur les bords de la tulipe.

Méditerranée : Placer le filtre dans le support de filtre on line à l'aide d'une pince de préférence à bout plat. Homogénéiser le jerrican isotopes contenant l'eau échantillonnée par plusieurs retournements. Attention à ne pas agiter trop brutalement le jerrican isotopes afin de ne pas endommager les cellules phytoplanctoniques éventuellement présentes. Relier le support de filtre au robinet du jerrican ; ouvrir le robinet de purge du filtreur afin d'évacuer l'air. Le volume filtré est de 5 à 8 litres selon la charge en particules (voir annexe 3 pour les références du matériel).

Après la filtration, 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.

Retirer de l'étuve le pilulier ou la boîte de pétri et le/la fermer (placer le cas échéant un carré d'aluminium entre le pilulier et son bouchon).

Placer le pilulier contenant le filtre dans un dessiccateur, si possible à l'abri de la lumière.

Rincer le système de filtration, l'éprouvette et la bouteille de prélèvement à l'eau déminéralisée.

Blanc : Pour les filtres 'grattés' (voir VII - Préparation des échantillons), il est inutile de prélever des filtres vierges pour une analyse du blanc. Pour les filtres analysés en entier, des filtres vierges issus des mêmes batches que les filtres utilisés pour les filtrations sont également placés dans des piluliers ou des boîtes de pétri, mis à l'étuve puis au dessiccateur de la même façon que les échantillons.

VII - Préparation des échantillons

Dans la mesure du possible, la décarbonatation a lieu quelques jours avant l'analyse.

Décarbonatation par HCl fumant :

Les filtres sont sortis du dessiccateur de stockage, ouverts et placés dans un dessiccateur contenant un bécher ou un cristalliseur contenant de l'HCl fumant. Un vide léger est effectué afin d'augmenter la tension de vapeur de l'HCl dans le dessiccateur. Après 4h, les filtres sont laissés sous hotte aspirante (dans une boîte couverte d'aluminium afin que les poussières ne puissent tomber dans les piluliers) pendant 3h afin que la majorité des vapeurs d'acides (qui pourraient endommager le détecteur de l'analyseur élémentaire) soient évacuées. Les filtres sont ensuite placés à l'étuve à 50°C pendant une nuit afin d'accentuer l'évacuation de l'acide.

Décarbonatation par H₂SO₄ 0,25N :

Une petite quantité d'H₂SO₄ 0,25N est préparée régulièrement : 750µl d'H₂SO₄ 95-97% dans 100ml d'eau déionisée. Les boîtes de pétri en verre contenant les filtres sont ouvertes. Sur chaque filtre 200µl 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 nacelle - filtres 'entiers' :

Quelques jours avant l'analyse, le filtre est placé directement dans une nacelle d'étain. Cette dernière est pliée et compactée.

Mise en nacelle - filtres 'grattés' :

Quelques jours avant l'analyse, tout ou une partie des particules retenues sur le filtre est gratté(e) à l'aide d'une (micro)spatule, d'un scalpel ou d'un outil équivalent puis placé dans une nacelle d'étain. Cette dernière est pliée et compactée.

VIII - Préparation de l'appareil et étalonnage

Les appareils étant spécifiques, leur préparation ne peut être décrite de façon générale dans le protocole national mais elle sera précisée dans les protocoles locaux.

Il convient toutefois de vérifier *a minima* avant chaque série d'analyse et/ou à chaque fois qu'une pièce ou une colonne est changée

- qu'il n'existe pas de fuite dans l'analyseur élémentaire (test de fuite),
- que le spectromètre possède une reproductibilité correcte (injections répétées de gaz de référence, passage de répliqués de standards).
- que la sensibilité de l'appareil est correcte ou suffisante (réglage des paramètres de source si nécessaire)

L'évolution des signaux isotopiques en fonction de l'intensité de la mesure (et donc de la quantité d'échantillon analysé) doit être connue pour chaque spectromètre. Il peut s'avérer nécessaire de vérifier cette évolution au début de chaque journée d'analyse, l'intensité de certains échantillons pouvant se situer en deçà de la gamme de stabilité.

La calibration de l'appareil doit être effectuée avec des matériaux de référence et/ou des standards internes eux-mêmes calibrés à partir de matériaux de référence. Autant que possible, les valeurs

isotopiques des standards doivent encadrer les valeurs des échantillons, sinon en être proches. Les standards seront placés en début, en cours et en fin de série d'analyses.

Lors de l'intercomparaison annuelle une « intercomparaison spectromètres de masse » est réalisée : un ou plusieurs lots de 5 échantillons (poudre) est distribué aux 4 stations effectuant les analyses isotopes du réseau : Arcachon, Marseille, La Rochelle et Roscoff. La préparation de ces échantillons est faite par un des référents Isotopes du réseau. Le produit choisi doit contenir environ 200 μ g de carbone et 30 μ g d'azote. Il faudra entre 10 et 30 mg de produit. Son delta ^{13}C devra être compris entre -30 et -18, celui du ^{15}N entre 0 et 10 pour un CN entre 5 et 12.

IX - Mesures

Les mesures et les calculs des résultats bruts sont effectués automatiquement par l'appareil.

X - Calculs

Les données isotopiques brutes fournies par le spectromètre de masse doivent subir au minimum une correction de justesse, et si nécessaire une correction de dérive temporelle et d'intensité. Cette correction peut être effectuée automatiquement par le logiciel du spectromètre ou manuellement *a posteriori*. Une correction de blanc est nécessaire dans le cas de l'analyse du filtre 'entier'.

Pour les filtres grattés, les données élémentaires ne peuvent être utilisées pour calculer la concentration en COP et NOP. Elles peuvent cependant être utilisées pour calculer le rapport élémentaire COP/NOP.

XI - Nettoyage du matériel

Après la filtration, l'ensemble du matériel de filtration (tulipe, fritté, rampe, fiole à vide, éprouvette, pinces) ainsi que le bidon de stockage de l'eau de mer sont rincés à l'eau déionisée.

Régulièrement (fréquence à définir localement), la tulipe, le fritté et le bidon sont également nettoyés à l'HCl 1,2N puis rincés à l'eau déionisée. Il peut arriver que le fritté se bouche petit à petit et que la filtration devienne de plus en plus difficile. Dans ce cas, le fritté peut être placé 30 minutes dans un bain à ultra-son avant nettoyage acide.

Les piluliers et leur bouchon ou les boîtes de pétri sont également rincés à l'eau déionisée puis reconditionnés comme indiqué au paragraphe V.

XII - Envoi des échantillons et des données

L'analyse des filtres de Wimereux, Dinard et Brest étant faite à Arcachon, les filtres y seront expédiés ou transmis accompagnés d'une liste en janvier, juin et lors de l'intercomparaison.

Concernant la Méditerranée, la station de Marseille effectue les analyses de Banyuls sur mer, Villefranche sur mer et Sète. Les filtres sont envoyés au minimum tous les quatre mois pour analyse et envoi des résultats dans le mois qui suit. Cette procédure prévoit une mise en base des données au plus tard six mois après l'échantillonnage.

XIII - Evacuation des essais et déchets

Si le filtre est analysé entièrement, jeter dans une poubelle normale le reste du filtre (ne contenant pas de particules). Si le filtre est analysé partiellement, le reste du filtre contenant les

particules peut être conservé comme indiqué au paragraphe VI pour une analyse (isotopique ou autre) ultérieure. Il peut notamment servir pour une seconde analyse en cas de problème analytique ou de doute quant au premier résultat.

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 remplacé, l'évacuer selon les règles Hygiène et Sécurité en vigueur dans chaque établissement.

XIV - Bibliographie

- Coplen, 2011. Guidelines and recommended terms for expression of stable isotope-ratio and gas-ratio measurement results. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25, 2538-2560.
- Lorrain A., Savoye N., Chauvaud L., Paulet Y-M., Naulet N., 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.
- Verardo D.J., Froelich P.N., McIntyre A., 1990. Determination of organic carbon and nitrogen in sediments using the CarloErba NA-1500 analyser. *Deep Sea Res.* 37, 157-165.
- 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

Annexes

Annexe 1

Procédure d'envoi des échantillons aux laboratoires d'analyse et des données correspondantes aux stations

Cycle de vie des échantillons et données ISOTOPES du prélèvement à la mise en base

- | | |
|---|-----------------------------|
| 1- Prélèvement | Voir protocoles spécifiques |
| 2- Conditionnement (filtration/ajout réactif) | |
| 3- Stockage | |
- 4- **A.** Envoi des échantillons et de la liste d'échantillons vers le labo d'analyse (envoi postal)
- B. parallèlement : envoi électronique du fichier SOMLIT. Ce fichier comprend les métadonnées (incluant les problèmes éventuels lors du prélèvement et du stockage) et la place pour porter les résultats et leur code qualité (= saisie des données analytiques par le labo d'analyse)
- 5- Analyse des échantillons par le labo d'analyse
- 6- Saisie des données d'analyse par le labo d'analyse dans le fichier SOMLIT (données + avis sur la réception des échantillons, leur stockage et l'analyse + éventuels détails concernant l'analyse)
- 7- Envoi du fichier SOMLIT complété vers les stations
- 8- Validation des données par le responsable scientifique / et ou le correspondant pour l'analyse dans la Station
- 9- Envoi des fichiers de données à la base de données.
- 10- Mise en base des données

Annexe 2

Fiches sécurité des produits chimiques

Consulter le site de l'Institut National de Recherche et de Sécurité

<http://www.inrs.fr>

HCl 37%: <http://www.inrs.fr/accueil/produits/bdd/doc/fichetox.html?refINRS=FT%2013>

H₂SO₄ 95-97%: <http://www.inrs.fr/accueil/produits/bdd/doc/fichetox.html?refINRS=FT%2030>

Oxyde de cuivre : <http://www.inrs.fr/accueil/produits/bdd/doc/fichetox.html?refINRS=FT%20294>

Cuivre réduit : <http://www.inrs.fr/accueil/produits/bdd/doc/fichetox.html?refINRS=FT%20294>

Oxyde de cobalt : <http://www.inrs.fr/accueil/produits/bdd/doc/fichetox.html?refINRS=FT%20128>

Laine de quartz : <http://www.inrs.fr/accueil/produits/bdd/doc/fichetox.html?refINRS=FT%20232>

Ethanol: <http://www.inrs.fr/accueil/produits/bdd/doc/fichetox.html?refINRS=FT%2048>

Oxyde de chrome : <http://www.inrs.fr/accueil/produits/bdd/doc/fichetox.html?refINRS=FT%201>

Annexe 3



REUNION QUALITE SOMLIT - 26 Avril 2016

REFERENCES VWR



Supports pour filtres d'analyse de l'air

Fournisseur: Pall Laboratory

REF 300-002 p1276 CATALOGUE

https://fr.vwr.com/store/catalog/product.jsp?catalog_number=300-0002



Jerricans compacts avec bouchon à visser

Fournisseur: Bürkle

REF 216-0897 p617 CATALOGUE

https://fr.vwr.com/store/catalog/product.jsp?catalog_number=216-0897

Référence du matériel utilisé dans les stations de Méditerranée permettant des filtrations de grand volume sans intervention ni pollution.