



NOTES TECHNIQUES
SCIENCES DE LA MER

BIOLOGIE MARINE

N°6

2004

MANUEL D'ANALYSES CHIMIQUES DANS L'EAU DE MER



CHIFFLET Sandrine
GERARD Philippe
FICHEZ Renaud



SOMMAIRE

INTRODUCTION	3
--------------	---

CHAPITRE I : AMMONIUM

1. Principe	4
2. Matériel employé	5
2.1 Appareillage	5
2.2 Réactifs chimiques	5
3. Modalité du dosage	5
3.1 Réactifs	6
3.2 Flaconnage / Echantillonnage / Conservation	7
3.3 Mesures	9
3.4 Etalonnage	9
3.5 Détermination du blanc	10
3.6 Domaine d'application	11
4. Etalonnage & Calculs	12

CHAPITRE II : NITRATES

1. Principe	13
2. Matériel employé	14
2.1 Appareillage	14
2.2 Réactifs chimiques	15
3. Modalité du dosage	15
3.1 Préparation de la colonne	15
3.2 Flaconnage / Echantillonnage / Conservation	19
3.3 Analyse des concentrations nanomolaires (0 à 0,2 $\mu\text{mol/l}$)	19
3.4 Analyse des concentrations submicromolaires (0,2 à 1 $\mu\text{mol/l}$)	21
4. Etalonnage & Calculs	24

CHAPITRE III : PHOSPHATES

1. Principe	25
2. Matériel employé	26
2.1 Appareillage	26
2.2 Réactifs chimiques	26
3. Modalité du dosage	27
3.1 Préparation des réactifs	27
3.2 Flaconnage / Echantillonnage / Conservation	29
3.3 Montage	29
3.4 Mesures	30
3.5 Domaine d'application	30
4. Etalonnage & Calculs	30

CHAPITRE IV : SILICATES

1. Principe	31
2. Matériel employé	32
2.1 Appareillage	32
2.2 Réactifs chimiques	32
3. Modalité du dosage	33
3.1 Préparation des réactifs	33
3.2 Flaconnage / Echantillonnage / Conservation	35
3.3 Montage	36
3.4 Mesures	36
3.5 Domaine d'application	37
4. Etalonnage & Calculs	37

CHAPITRE V : AZOTE & PHOSPHORE ORGANIQUE

1. Oxydation par voie humide.....	38
1.1 Principe.....	38
1.2 Matériel employé.....	39
1.3 Flacônage / Echantillonnage / Conservation.....	40
1.4 Modalité de l'attaque.....	40
2. Azote organique dissous et particulaire.....	41
2.1 Principe.....	41
2.2 Matériel employé.....	42
2.3 Préparation de la colonne.....	43
2.4 Analyses de concentrations micromolaires.....	47
3. Phosphore organique dissous et particulaire.....	48
3.1 Principe.....	48
3.2 Matériel employé.....	49
3.3 Modalité du dosage.....	50
4. Etalonnage & Calculs.....	53

CHAPITRE VI : CARBONE & AZOTE ORGANIQUE PARTICULAIRE

1. Principe.....	55
2. Matériel employé.....	56
2.1 Appareillage.....	56
2.2 Réactifs chimiques.....	56
3. Modalité du dosage.....	57
3.1 Collecte du matériel particulaire.....	57
3.2 Préparation du matériel.....	57
3.3 Modalité du dosage.....	58
4. Etalonnage & Calculs.....	59

CHAPITRE VII : CHLOROPIGMENTS

1. Principe.....	61
2. Matériel employé.....	61
2.1 Appareillage.....	61
2.2 Réactifs chimiques.....	62
3. Modalité du dosage.....	62
3.1 Réactifs.....	62
3.2 Flaconnage / Echantillonnage / Conservation.....	64
3.3 Extraction des pigments / Mesures.....	64
3.4 Etalonnage.....	65
3.5 Domaine d'application.....	66
4. Etalonnage & Calculs.....	67

CHAPITRE VIII : OXYGENE DISSOUS

1. Principe.....	68
2. Matériel employé.....	70
2.1 Appareillage.....	70
2.2 Réactifs chimiques.....	70
3. Modalité du dosage.....	71
3.1 Préparation des réactifs.....	71
3.2 Flaconnage / Echantillonnage / Conservation.....	73
3.3 Mesures.....	75
3.4 Domaine d'application.....	77
4. Etalonnage & Calculs.....	77
4.1 Concentrations en oxygène dissous.....	77
4.2 Solubilité de l'oxygène dans l'eau, pourcentage d'oxygène dissous.....	79

BIBLIOGRAPHIE

80

INTRODUCTION

L'objectif de ce manuel est de faire une synthèse des techniques d'analyse actuellement utilisées au Laboratoire de Chimie Marine, IRD - Nouméa. La plupart des méthodes ont été développées à partir de techniques proposées par Strickland et Parsons (1972), Grashoff et al. (1983), Aminot et Chaussepied (1983). Elles ont été adaptées pour répondre au mieux aux spécificités du milieu étudié : l'environnement côtier tropical. Ces méthodes ont beaucoup évoluées depuis leurs publications ; elles évolueront encore beaucoup car nos connaissances s'améliorent sans cesse.

Une bonne analyse ne se limite pas au suivi *sensu stricto* des protocoles. Il est aussi nécessaire de respecter l'environnement de travail par une bonne hygiène des locaux et de veiller à la sécurité des biens et du personnel. Il est donc important pour tout nouveau venu de s'informer des modes de fonctionnement du laboratoire pour pouvoir s'y conformer.

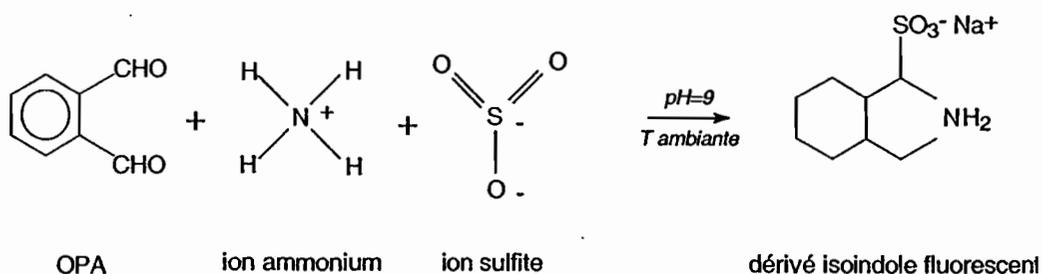
I. AMMONIUM

L'azote ammoniacal est présent sous deux formes en solution : l'ammoniac NH_3 et l'ion ammonium NH_4^+ dont les proportions relatives dépendent du pH ($\text{pK}_a = 9,2$), de la température et de la salinité. Dans le milieu marin (pH voisin de 8), l'ammonium est prépondérant. Il provient généralement des excréments animaux et de la décomposition bactérienne des composés organiques azotés. Les concentrations sont variables d'un écosystème à l'autre. Dans les régions tropicales, les teneurs sont généralement très faibles de l'ordre de quelques dizaines de nanomoles.

La méthode de Koroleff (1969), couramment employée en océanographie, donne dans ce cas des résultats souvent incohérents car les concentrations sont à la limite du seuil de détection. La méthode décrite par Holmes et al. (1999) est beaucoup plus sensible. Il s'agit d'une méthode manuelle basée sur le principe d'une mesure fluorométrique ; elle permet de définir avec exactitude des quantités sub micromolaires d'ammonium. Elle fait appel à un seul réactif, stable pendant plusieurs jours s'il est conservé à l'obscurité. Le réactif et l'échantillon peuvent être mélangés immédiatement après le prélèvement ; la réaction se développe à température ambiante. Les écarts dus aux effets de matrice et à la fluorescence de fond sont négligeables.

1. PRINCIPE

Le dosage est basé sur la réaction signalée par Roth (1971) :



En milieu basique (pH = 9), l'ammonium réagit chimiquement en présence d'ortho-phthalaldéhyde (OPA) pour former un dérivé iso indole fluorescent. L'ajout d'un agent réducteur comme le sulfite de sodium permet d'accroître la fluorescence naturelle du composé ainsi formé (Genfa et al., 1989). La méthode a été appliquée à l'eau de mer par Kérouel et Aminot (1997).

2. MATÉRIEL EMPLOYÉ

2.1 Appareillage

Au laboratoire de Chimie Marine, nous utilisons un fluorimètre Turner Designs TD700 équipé d'un kit optique n°10-303 comprenant :

- lampe à vapeur de mercure, lumière proche UV (réf : 10-049),
- filtre d'excitation $\lambda_{ex} = 365$ nm (réf : 10-126),
- filtre d'émission $\lambda_{em} = 410 - 600$ nm (réf : 10-059R),
- atténuateur 1:75 pour réduire l'intensité de la source lumineuse.

Pour avoir une lecture fiable, il est conseillé d'allumer l'appareil au moins une heure avant son utilisation. Tant que les filtres et la lampe n'ont pas été manipulés, l'étalonnage n'a pas besoin d'être refait systématiquement à chaque fois que l'appareil est éteint. Le dernier étalonnage est gardé en mémoire.

2.2 Réactifs chimiques

PRODUIT	FORMULE CHIMIQUE	FOURNISSEUR	REFERENCE
Sulfate d'ammonium suprapur	$(NH_4)_2SO_4$	Merck	101209
Sulfite de sodium	Na_2SO_3	Sigma	S0505
Tétraborate de sodium décahydraté	$Na_2B_4O_7, 10H_2O$	Sigma	B3545
Orthophtaldialdéhyde 97%	$C_6H_4(CHO)_2$	Sigma	P1378
Ethanol absolu Normapur	CH_3CH_2OH	Prolabo, PA	20 821.296

3. MODALITÉ DU DOSAGE

La difficulté principale du dosage réside dans le risque permanent de pollution (atmosphère polluée du laboratoire, fumée de tabac, contact avec les mains, etc...). Il est impératif que toute la vaisselle utilisée soit lavée dans un bain d'HCl (10%, 4heures minimum) puis soigneusement rincée avec de l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) juste avant usage. Il est également recommandé de ne jamais laisser les flacons propres débouchés pendant longtemps. Les bouchons à joint amovible sont à éviter car ils sont toujours difficiles à nettoyer. De même, la bakélite et le caoutchouc ne doivent pas être utilisés pour le bouchage.

3.1 Réactifs

SOLUTION DE SULFITE		
Sulfite de sodium	→	2g
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	Compléter à 250ml
SOLUTION DE BORATE DE SOUDE		
Borax	→	20g
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	Compléter à 500ml
SOLUTION ORTHOPHTALDIALDEHYDE (OPA)		
OPA	→	1g
Ethanol absolu	→	Compléter à 25ml
REACTIF (WR), PREPARATION POUR 500ML		
Solution de borate de soude	→	500ml
Solution Orthophtaldialdéhyde	→	25ml
Solution de sulfite	→	2,5ml

Tous les réactifs sont préparés dans de l'eau fraîchement déionisé (eau milliQ ; R = 17,8 MΩ.cm⁻¹).

- Sulfite de sodium

Dissoudre 2g de sulfite de sodium dans 250ml d'eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm⁻¹). La solution est stable pendant un mois si elle est conservée à température ambiante dans un flacon en verre, à l'obscurité.

- Borate de soude

Dissoudre 20g de borax dans 500ml d'eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm⁻¹). Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution totale du produit. La solution est stable pendant plusieurs mois si elle est conservée à température ambiante dans un flacon en polyéthylène.

- Orthophtaldialdéhyde (OPA)

Dissoudre 1g d'OPA dans 25ml d'éthanol absolu. L'OPA est un produit photodégradable. Il doit être protégé au maximum de la lumière pendant toute la durée de sa mise en solution. Ainsi préparé, il est stable pendant au moins deux mois s'il est conservé à l'obscurité et à 4°C.



Réactif de travail (WR) : préparation pour 500ml

Dans une bouteille en verre borosilicaté, mélanger 500ml de tampon borate, 2,5ml de sulfite de sodium et 25ml d'OPA ; agiter. Le mélange réactionnel peut être conservé pendant une durée maximale de deux semaines s'il est stocké à température ambiante et à l'abri de la lumière.

3.2 Flaconnage / Echantillonnage / Conservation

Les flacons d'analyse sont réservés à l'usage exclusif des mesures d'ammonium. Nous utilisons des flacons en verre borosilicaté (Schott 60ml), marqués par un repérage au niveau des 40ml. Ils sont munis de bouchons en polypropylène PP et bagues anti gouttes. Avant chaque utilisation, les flacons et bouchons ont subi un prétraitement à l'acide (HCl 10%, 4heures minimum).

Une fois la bouteille de prélèvement remontée à bord, l'échantillonnage doit se faire très rapidement. Le flacon et le bouchon sont rincés 3 fois par l'eau de prélèvement puis 40ml d'eau de mer sont directement introduit dans le flacon. A l'aide d'une dispensette, 2ml de réactif sont ajoutés à l'échantillon. Le flacon est ensuite bouché, agité et placé à l'obscurité.

Il faut absolument éviter tous contacts avec le pas de vis et l'intérieur du col des flacons. Il est par ailleurs fortement conseillé de porter des gants en latex sans poudre et/ou essuyer systématiquement les parois extérieures du flacon avec un chiffon sec pour éviter les risques de pollution.

A température ambiante, la réaction est totale au bout de 6 heures ; le dérivé iso indole formé est stable pendant 18 heures (Fig. 1).

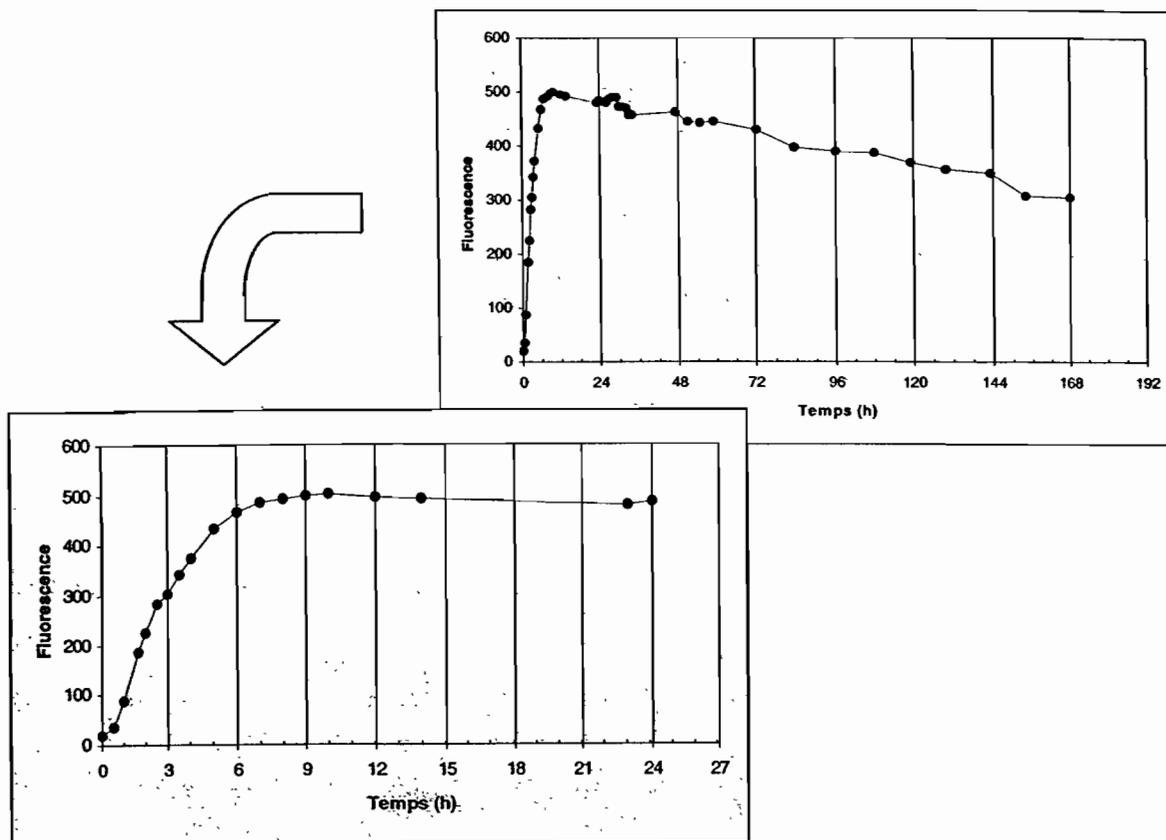


Fig. 1 : Cinétique de dégradation du dérivé isoindole en fonction du temps (stockage à l'obscurité, 25°C, [NH4] = 0,5μM).

Si la mesure ne peut être faite dans les 24 heures, il est possible de conserver plus longtemps l'échantillon en favorisant le développement de la réaction à température ambiante, à l'obscurité pendant 4 heures puis à 4°C. De cette façon, le dérivé est stable pendant deux semaines (Fig. 2).

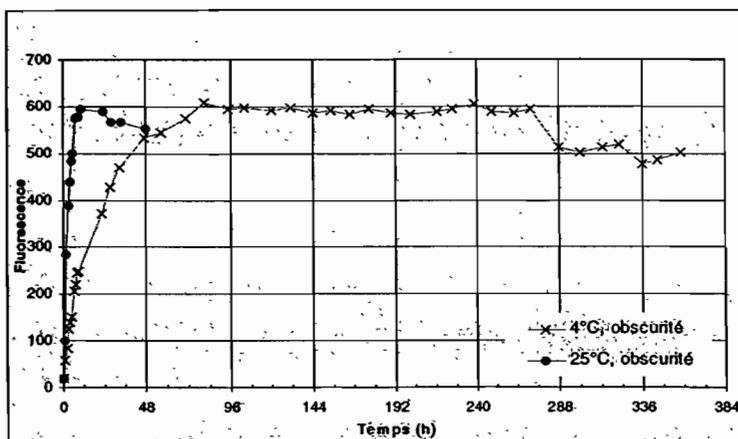


Fig. 2 : Influence de la température sur la stabilité du dérivé isoindole ([NH4] = 0,5μM)

3.3 Mesures

Les échantillons sont introduits manuellement dans un tube à essais (verre pyrex) de 7ml. Si les tubes sont propres, ils n'ont pas besoin de prétraitements supplémentaires. La mesure de fluorescence est immédiate ; toute pollution intervenant pendant cette étape n'aurait pas le temps de perturber le signal. Le même tube à essais est utilisé pour toute la série d'analyse ; entre chaque échantillon il est soigneusement rincé 3 fois à l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$) puis 2 fois avec un peu d'échantillon à analyser. Juste avant chaque lecture, les parois extérieures du tube sont soigneusement nettoyées avec de l'éthanol afin d'éliminer toutes traces de doigts éventuelles.

3.4 Etalonnage

- Préparation de la solution mère

Sécher pendant 1h à 110°C du sulfate d'ammonium suprapur. Dissoudre exactement 0,06607g dans 1000ml d'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$). La solution ainsi préparée a une concentration de 1mmol/l. Elle est stable indéfiniment si elle est conservée à 4°C dans un flacon en polyéthylène haute densité.

- Préparation des standards

Au laboratoire de Chimie Marine (IRD - Nouméa), nous travaillons généralement sur deux gammes de concentrations : de 0 à 0,5 $\mu\text{mol/l}$ d'ammonium pour les échantillons du lagon de Nouvelle Calédonie et de 0 à 1,5 $\mu\text{mol/l}$ d'ammonium pour les échantillons du lagon de Fidji. A partir d'une solution mère de 1mmol/l de NH_4^+ , préparer dans des fioles jaugées de 500ml les solutions filles suivantes :

	NOUVELLE CALEDONIE					FIDJI				
$[\text{NH}_4^+]$ ($\mu\text{mol/l}$)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,5	0,1	0,2	0,5	1	1,5
V (μl)	25	50	100	150	250	50	100	250	500	750

Les standards sont ajustés avec de l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$) pour "limiter" au maximum les impuretés.

Selon les besoins, il est possible de préparer des standards dont la concentration maximale peut atteindre 3 $\mu\text{mol/l}$ NH_4^+ . Pour l'analyse d'échantillons plus concentrés, il faudra alors prévoir, soit de diluer l'échantillon avant l'ajout de réactif, soit de modifier les quantités de réactif pour que la réaction ne soit pas limitée par un manque d'OPA.

3.5 Détermination du blanc

Pour la mesure des faibles concentrations, la détermination rigoureuse des blancs d'analyse est une nécessité. Le "blanc" est une fluorescence parasite qui ne provient pas de l'espèce analysée contenue dans l'échantillon.

- Blanc de cuve (B_c) ou fluorescence de la cuve.

Elle est mesurée en mettant de l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) dans le tube à essais servant à l'analyse. Il est généralement admis de régler le blanc de cuve sur la valeur 0.

- Blanc de réactif (B_r).

Il correspond à la fluorescence propre des réactifs ou à l'accroissement de fluorescence qui résulterait du processus normal d'analyse d'un échantillon d'eau absolument exempt de toutes traces d'ammonium. Le blanc de réactif est généralement non négligeable surtout lorsque la concentration de l'échantillon mesurée est proche de la limite de détection. Pour obtenir une eau de mer extrêmement pauvre en éléments nutritifs, il faut stocker de l'eau non filtrée et la laisser stagner pendant plusieurs semaines à température ambiante. Cependant, il n'est pas toujours possible ou facile de disposer d'eau de mer épuisée en éléments nutritifs. Le blanc de réactif est alors réalisé avec de l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$). Cette pratique n'est pas absolument rigoureuse dans le sens où elle ne tient pas compte de la turbidité de l'eau de mer. Dans les milieux côtiers tropicaux où les eaux sont souvent très claires, la légère erreur systématique ainsi introduite est généralement négligeable. L'utilisation de l'eau de mer artificielle ne convient pas pour déterminer les blancs en raison des impuretés contenues dans les sels commerciaux même garantis de qualités "pour analyse" ou "suprapur".

Pour chaque série d'analyse ou à chaque fois qu'un nouveau réactif est préparé, il convient donc de prévoir une dizaine de "Blanc réactif" mesurée sur de l'eau milli Q ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) pour corriger la fluorescence parasite liée à l'analyse.

- Blanc de turbidité (B_t) ou fluorescence naturelle des particules en suspension dans l'eau de mer.

Le blanc de turbidité est déterminé par une mesure directe de fluorescence sur un échantillon d'eau de mer brut. Si dans des milieux oligotrophes le blanc de turbidité est négligeable, il est conseillé de vérifier cette mesure pour des échantillons prélevés dans des milieux estuariens ou côtiers où les eaux sont plus chargées en particules. Le blanc de turbidité sera calculé par la valeur moyenne d'une.

Pour mesurer ce blanc, il est nécessaire de travailler sur deux échantillons prélevés à la même station. Sur le premier échantillon, on procède à une analyse classique d'ammonium ; soit F_{ech1} la fluorescence de cette réaction. Sur le deuxième échantillon, on ajoute $15\mu\text{l}$ de solution mère ($[\text{NH}_4] = 1\text{mmol/l}$) puis on procède à une nouvelle analyse classique d'ammonium ; soit F_{ech2} la fluorescence de cette deuxième réaction. Ces deux opérations sont répétées sur le standard $[\text{NH}_4] = 0,1\mu\text{mol/l}$; soit F_{std1} la fluorescence correspondant à la concentration en ammonium du standard et F_{std2} la

fluorescence de la réaction après ajout des 15 μ l de solution mère. Le blanc de turbidité (exprimé en %) pour cette station se calcule alors de la façon suivante :

$$B_t = \left[\frac{(F_{std2} - F_{std1}) - (F_{ech2} - F_{ech1})}{(F_{std2} - F_{std1})} \right] \times 100$$

Selon la nature et la qualité des eaux, le blanc de turbidité peu varier d'un échantillon à l'autre. On vérifiera donc l'homogénéité de cette valeur sur une zone donnée en faisant une analyse d'une dizaine de points. Si les résultats ne présentent pas de variations significatives, la valeur du blanc de turbidité sera calculée par la moyenne de ces mesures. La fluorescence corrigée se calcule alors de la façon suivante :

$$F_{cor} = F_{NH4} + \left[F_{NH4} \times \left(\frac{B_t}{100} \right) \right]$$

3.6 Domaine d'application

Les proportions du mélange réactionnel ont été déterminées pour des concentrations maximales d'ammonium de 3 μ mol/l. La limite de détection de la méthode est de 1.5nmol/l. La reproductibilité des analyses pour des concentrations variants de 0,5 à 3 μ mol/l est de 10nmol/l.

Les inférences d'un ou plusieurs composés peuvent être déterminées de façon sélective ou globale par le même protocole que le Blanc de turbidité où l'échantillon d'eau de mer a été remplacé par le standard [NH₄] = 0,1 μ mol/l auquel on aura ajouté une quantité connue d'élément interférent. Dans les milieux côtiers tropicaux non fortement anthropisés, les interférences de la réaction sont généralement négligeables. Toutefois, s'il apparaît une diminution du signal, il est nécessaire de faire la correction suivante :

$$F_{cor} = F_{NH4} + \left[F_{NH4} \times \left(\frac{I}{100} \right) \right]$$

Kérouel et Aminot (1997) ont déterminé ces interférences sur des échantillons d'ammonium plus concentrés ([NH₄] = 4 μ mol/l). Les interférences dues à l'azote organique dissous (sous forme d'urée et d'acides aminés) sont négligeables ; elles ne dépassent jamais 0,5%. Quelques composés inorganiques du cuivre (CuSO₄), du fer (FeCl₃), du mercure (HgCl₂) et du soufre (Na₂S) peuvent également provoquer des interférences. Pour le cuivre, des interférences sont tout juste décelables à

partir de $50\mu\text{g/l}$; elles atteignent 6% à $300\mu\text{g/l}$. Une altération de moins de 0,5% peut être mesurée pour des concentrations en fer variant de 1 à 3mg/l . Les interférences dues au mercure sont beaucoup plus importantes ; elles varient entre 5 et 80% pour des concentrations comprises entre 10mg/l et 40mg/l respectivement. Le soufre interfère de 2,3% à $10\mu\text{mol/l}$. La salinité peut avoir également une influence sur la mesure du fait que le pH de la réaction se trouve modifié par l'effet tampon de l'eau de mer. Toutefois, dans les zones côtières où la salinité est supérieure à 25‰, l'effet de sel est négligeable (<0,8%).

4. ETALONNAGE & CALCULS

La mesure d'ammonium dans un échantillon d'eau de mer (F_{ech}) est généralement sous estimée du fait de la présence d'éléments interférents. D'où la correction :

$$F_{\text{ech cor}} = (F_{\text{ech}} - F_{\text{Bc}}) + \left[(F_{\text{ech}} - F_{\text{Bc}}) \times \left(\frac{\text{Bt}}{100} \right) \right]$$

Les variations de fluorescence en fonction de la concentration en ammonium peuvent être décrite par une relation linéaire de type :

$$F = F_{\text{lu}} - F_{\text{Bc}} = a.[\text{NH}_4] + b$$

a, la pente de la droite qui caractérise l'activité de la réaction

b, l'ordonnée à l'origine qui caractérise l'ensemble des blancs de cette réaction (voir 3.5 Détermination du blanc).

La mesure des échantillons s'effectuant directement dans le prélèvement d'eau de mer, seul le blanc de réactif nous intéresse. La concentration en ammonium dans le réactif est déterminé de la façon suivante :

$$[\text{NH}_4]_{\text{Br}} = \frac{(F_{\text{Br}} - F_{\text{Bc}}) - b}{a}$$

La concentration d'ammonium contenu dans l'échantillon est alors calculée de la façon suivante :

$$[\text{NH}_4]_{\text{ech}} = \frac{F_{\text{ech cor}}}{a} - [\text{NH}_4]_{\text{Br}}$$

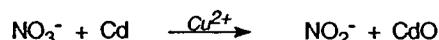
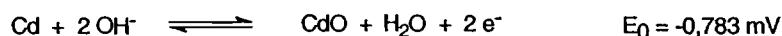
II. NITRATES

L'ion nitrate est la forme oxydée stable de l'azote en solution aqueuse. Cet ion ne présente pas de faculté particulière de complexation ou d'absorption. Il entre dans le cycle de l'azote comme support principal de la croissance du phytoplancton. La matière organique ainsi produite est ensuite dégradée par les bactéries et l'azote se retrouve de nouveau sous forme minérale. Lorsque la vitesse de régénération devient inférieure à la vitesse d'utilisation, les ions nitrates sont un facteur limitant de la croissance des algues et leur concentration reste souvent inférieure aux limites de détection de l'analyse.

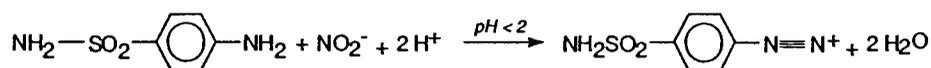
1. PRINCIPE

Plusieurs méthodes de dosage ont été appliquées à l'eau de mer mais compte tenu des faibles concentrations océaniques et des interférences possibles, la méthode retenue quasi universellement est celle fondée sur le dosage des ions nitrites obtenu par réduction des ions nitrates. On mesure donc en réalité la somme des concentrations nitrites+nitrates. L'analyse des nitrites est effectuée directement sans réduction. Par déduction de la concentration en nitrites, on obtient donc la concentration en nitrates.

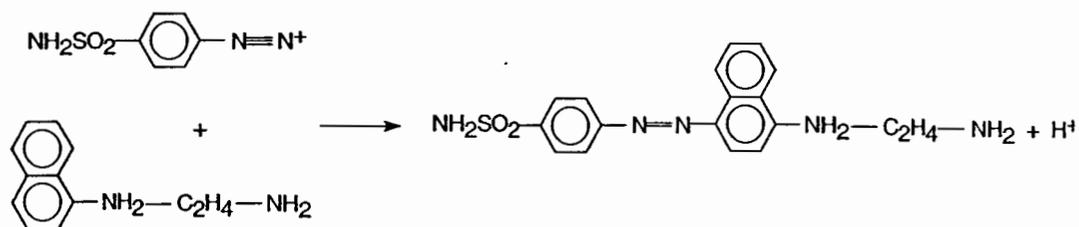
Les ions nitrates dissous dans l'eau de mer sont réduits en nitrites presque quantitativement (>95%) par passage sur une colonne de cadmium traité au cuivre (Wood et al., 1967).



Le dosage des ions nitrites est fondé sur la réaction de Griess ; la méthode a été ensuite appliquée aux analyses en milieu marin par Bendschneider et Robinson (1952). Les ions nitrites forment un diazoïque avec la sulfanilamide (para-aminobenzènesulfamide) en milieu acide selon la réaction :



Le diazoïque ainsi formé réagit ensuite avec l'EDTA "N-(Naphthyl-1)-éthylène diamine" pour former un colorant azoïque rose qui absorbe à une longueur d'onde de 543nm.



2. MATÉRIEL EMPLOYÉ

2.1 Appareillage

Au laboratoire de Chimie Marine, nous utilisons un Autoanalyser III (Bran+Luebbe). La chaîne d'analyse est équipée des modules suivants :

- échantillonneur XYZ, dont les plateaux ont été modifiés pour recevoir des flacons de 60 ml (38x86 mm) ;
- pompe péristaltique ;
- plateau manifold ;
- colorimètre numérique deux voies (longueur de cuve : 10mm)
 - . filtre optique $\lambda = 540\text{nm}$; ref : 112+0001-54 (sans support) ou 165+B044-54 (avec support)
 - . détecteur ; ref : 169+B141-01
- PC + logiciel acquisition de donnée "AACE".

Pour avoir un signal stable et reproductif, il est conseillé d'allumer tous les appareils de la chaîne analytique au moins une heure avant utilisation afin de laisser le temps aux lampes et composants électroniques de chauffer.

2.2 Réactifs chimiques

PRODUIT	FORMULE CHIMIQUE	FOURNISSEUR	REFERENCE
Cadmium 99,9%	Cd	Merck	2001
Chlorure d'ammonium	NH ₄ Cl	Prolabo, P.A.	21 236.291
Ammoniac 28%, d=0,895	NH ₃	Prolabo, PA	21 190.292
Acide chlorhydrique 36%, d=1,18	HCl	Prolabo, P.A.	20 252.290
Acide nitrique 60%, d=1,37	HNO ₃	Prolabo, P.A.	20 423.291
Nitrate de potassium	KNO ₃	Merck, Suprapur	105065
Sulfate de cuivre pentahydraté	CuSO ₄ , 5H ₂ O	Prolabo, PA	23 174.290
Sulfanilamide (amino-4-benzènesulfonamide)	C ₆ H ₅ (NH) ₂ SO(OH)	Sigma, P.A.	S9251
EDTA (N-naphtyléthylènediamine)	(NH ₂ CH ₂ C ₆ H ₃) ₂ , 2HCl	Sigma, P.A.	N 5889
Chloroforme	CHCl ₃	Prolabo, P.A.	22 711.290
Réactif de Brij 35, 30% w/v (ester de polyoxyéthylène)		Sigma, P.A.	430AG-6

3. MODALITÉ DU DOSAGE

3.1 Préparation de la colonne

SOLUTION DE SULLFATE DE CUIVRE, 2%		
Sulfate de cuivre	→	20g
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	Compléter à 1000ml
SOLUTION DE RINCAGE NH ₄ CL, 10G/L :		
Chlorure d'ammonium	→	10g
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	Compléter à 1000ml
ACIDE CHLORHYDRIQUE, 2N		
HCl (d=1,18)	→	172ml
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	Compléter à 1000ml
ACIDE NITRIQUE, 0,3N		
HNO ₃ (d=1,38)	→	23ml
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	Compléter à 1000ml

- Réactifs

CADMIUM en poudre 0,5-0,9mm.

SULFATE DE CUIVRE A 2% :

La solution est préparée par dissolution de 20g de CuSO_4 dans 1l d'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$).

CHLORURE D'AMMONIUM 10G/L :

Pour la solution de NH_4Cl de rinçage, dissoudre 10g dans 1l d'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$).

ACIDE CHLORHYDRIQUE 2N :

La solution est préparée de la façon suivante : verser lentement 172ml d' HCl ($d=1,18$; 36%) dans 828ml d'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$).

ACIDE NITRIQUE 0,3N :

La solution d' HNO_3 à 0,3mol/l est préparée de la façon suivante : verser lentement 23ml d' HNO_3 ($d=1,38$; 61%) dans 977ml d'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$).

Remarque importante 1 : Les acides concentrés sont des produits fortement corrosifs, il est indispensable de les manipuler avec la plus grande précaution. Toute manipulation doit se faire sous une hotte ; le manipulateur doit impérativement porter blouse et lunette. En cas de brûlure sur n'importe quelle partie du corps, il faut immédiatement rincer la zone atteinte à grande eau pendant ¼ d'heure même si la sensation d'échauffement disparaît rapidement. Les acides ont la capacité de pénétrer profondément dans les tissus ce qui peut alors induire de sérieuses lésions internes. Si l'accident semble important, il faut consulter un médecin.

Remarque importante 2 : Les acides sont des produits exothermiques c'est à dire que lorsqu'ils sont en contact avec un autre composé, la réaction qui se produit libère une forte chaleur. Pour toute dilution, il faut impérativement la faire en *versant lentement l'acide dans l'eau et non le contraire*. Ainsi la goutte d'acide qui tombera dans de l'eau sera automatiquement diluée et l'effet d'échauffement sera moindre. Si la température du milieu dilué devient trop importante, il faut arrêter l'addition d'acide et le faire refroidir par un bain d'eau et/ou de glace. L'addition d'acide supplémentaire pourrait conduire à un échauffement excessif et produire des projections de réactif autour de la zone de travail.

Remarque 3 : Dans le commerce, les acides concentrés sont tous appelés acides "purs" ou "fumants". Mais, selon la densité (d) et l'indice de pureté (%) du produit donnés par le fabricant, la concentration molaire peut varier même au sein d'acides "fumants" d'une même famille. Aussi si les caractéristiques (d et %) des acides chlorhydriques et acides nitriques ne sont pas rigoureusement les mêmes que celles utilisées au laboratoire de Chimie Marine, il est nécessaire de faire des corrections pour les volumes à mettre en œuvre.

A partir d'une solution commerciale, le calcul se fait de la façon suivante :

Soit d la densité de l'acide concentré,

% le degré de pureté du produit,

C_0 la concentration de l'acide commercial (mol/l),

C' la concentration de l'acide dilué (mol/l),

M la masse molaire de l'acide (g/mol),

E le volume d'acide concentré à diluer (unité de volume : l, ml ou autre),

U le volume total d'acide dilué (même unité de volume que E : l ml ou autre).

On a

$$C_0 = \frac{d \times \%}{M} \times 1000$$

$$C' = C_0 \times \frac{E}{U}$$

D'où E , le volume d'acide à diluer :

$$E = \frac{C'}{U} \times \frac{M}{d \times \% \times 1000}$$

Pour connaître le volume V de solvant (eau milliQ ; $R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) :

$$V = U - E$$

NITRATE DE POTASSIUM :

Diluer 1500 μl de la solution mère à 10mmol/l (voir plus loin) dans une fiole de 500ml ; compléter avec de l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$)

- Préparation ou cupérisation du cadmium

Tamiser le cadmium en grains pour garder la fraction comprise entre 0,9mm et 0,56mm de diamètre. Le tamisage peut se faire soit manuellement soit mécaniquement à l'aide d'un vibreur électrique du type Analysette FRISCH (modèle 03.502). Eliminer la fraction fine (<0,56mm) et la fraction grossière (>0,9mm).

Mettre environ 50g de cadmium en grains dans un erlenmeyer à col rodé (flacon en verre de 100ml utilisé pour les dosages d'oxygène) et ajouter 90ml d'HCl (2mol/l). Attendre la disparition du dégagement gazeux puis boucher et agiter. Rincer plusieurs fois à l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$).

Laver rapidement le cadmium en grains avec 90ml d' HNO_3 (0,3mol/l) puis rincer abondamment à l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$).

Relaver le cadmium avec 90ml d'HCl (2mol/l) pour chasser les ions nitrates restant puis rincer à l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$). Renouveler une fois l'opération.

Traiter le cadmium en grains avec 100ml de la solution de sulfate de cuivre à 2% puis boucher hermétiquement l'erien. Agiter vigoureusement jusqu'à ce que la solution du cuivre vire du bleu au noir. *Après cette étape, ne jamais mettre en contact direct avec l'air le cadmium traité.*

Laver abondamment le cadmium en grain à l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) par débordement de l'erien, boucher et agiter vigoureusement. Renouveler l'opération autant de fois que nécessaire, jusqu'à disparition totale des particules fines en suspension.

Conserver le cadmium ainsi traité dans une solution de chlorure d'ammonium à 10g/l à 4°C.

- Remplissage et traitement de la colonne

Couper un tube plastique (Tygon ; calibré 2mm diamètre intérieur) de 19 cm de long.

A l'aide d'une seringue de 10ml, remplir la totalité de la colonne de NH_4Cl à 10g/l sans laisser de bulles d'air. Boucher à 1cm d'une extrémité avec de la laine de verre et tenir fermement le tube avec une pince de Mohr. Mettre un petit entonnoir à l'autre extrémité et suspendre la colonne sur un statif ; remplir l'entonnoir de la solution de NH_4Cl (Figure 3). Transférer avec une spatule remplie d'une solution de NH_4Cl (10g/l), le cadmium en grain dans la colonne jusqu'à ce qu'elle soit remplie sur une hauteur de 16cm. Pour faire descendre plus facilement les grains de Cd, pincer la colonne et la faire rouler entre les doigts. Boucher le sommet de la colonne avec de la laine de verre. Replier les deux extrémités et fermer par un "nipple". Les colonnes se conservent ainsi si elles sont stockées dans une solution de NH_4Cl sans contact avec l'air.

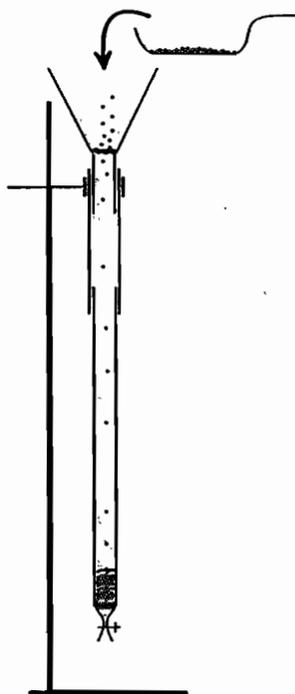


Fig. 3 : Réalisation d'une colonne réductrice Cd-Cu.

- Utilisation et entretien

Définir sur la colonne un sens d'orientation du flux symbolisé par une flèche. Avant d'effectuer les premières analyses, il est nécessaire de stabiliser le rendement de la colonne. Pour cela, brancher la colonne dans le circuit analytique et faire passer une solution de nitrates à $30\mu\text{M}$ pendant une demi-heure puis rincer avec de l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$) pendant au moins $\frac{1}{4}$ d'heure. Avant de brancher la colonne, vérifier que le flux circule bien dans le circuit analytique. Après chaque série d'analyse, rincer la colonne avec la solution de chlorure d'ammonium pendant au moins $\frac{1}{4}$ d'heure. Lors du débranchement, sous un flux d' NH_4Cl constant, déconnecter en premier la sortie de la colonne puis mettre le "nipple" et fermer sur l'entrée.

La colonne réductrice permet l'analyse de 500 échantillons environ. Utiliser une colonne différente pour chaque gamme de dosage (voir plus loin).

3.2 Flaconnage / Echantillonnage / Conservation

Les flacons utilisés pour l'analyse des éléments nutritifs sont réservés à cet usage exclusif. Il s'agit de flacons en polypropylène (Nalgène, 60ml, col large). Avant chaque utilisation, les flacons et bouchons ont subi un prétraitement à l'acide (HCl 10%, 4heures min).

Une fois la bouteille de prélèvement remontée à bord, l'échantillonnage se fait rapidement. La bouteille est mise sur un portoir en position verticale. Le flacon et le bouchon sont rincés 3 fois par l'eau de prélèvement puis le flacon est rempli jusqu'à la base de l'encolure. Si l'analyse ne peut pas être effectuée de suite, les échantillons sont conservés par congélation à -40°C .

3.3 Analyse des concentrations nanomolaires (0 à $0,2\mu\text{mol/l}$)

La méthode de Rimbault et al. (1990) est généralement utilisée pour l'analyse des nitrates en milieu oligotrophe.

- Réactif

REACTIF 1 (R1), PREPARATION POUR 500 ML

Sulfanilamide	→	2,5g
HCl (d=1,18)	→	25ml
Eau milliQ (R = $17,8\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$)	→	Compléter à 500ml
Brij 35	→	0,5ml

REACTIF 2 (R2), PREPARATION POUR 500ML

N-naphtyléthylène diamine	→	0,25g
Eau milliQ (R = $17,8\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$)	→	Compléter à 500ml

REACTIF 3 (R3), PREPARATION POUR 1000ML

Chlorure d'ammonium	→	10g
Eau milliQ (R = $17,8\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$)	→	Compléter à 1000ml
Ajuster à pH = 8,5 avec NH_3 28%	→	$V_{\text{NH}_3} \pm 3,5\text{ ml}$

SOLUTION MERE (SM), 10MMOL/L

Nitrate de potassium	→	1,0112g
Eau milliQ (R = $17,8\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$)	→	Compléter à 1000ml

SOLUTION FILLE (SF), $100\mu\text{MOL/L}$

Solution mère (SM)	→	1ml
Eau milliQ (R = $17,8\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$)	→	Compléter à 100ml

Tous les produits chimiques utilisés ici sont de qualité dit "analytique" sauf indication contraire. Une fois préparés, tous les réactifs sont stockés dans des flacons plastique opaque (Nalgène) et conservés à 4°C lorsqu'ils ne sont pas utilisés.

REACTIF 1 (R1) :

Dans une fiole de 500ml, dissoudre 2,5g de sulfanilamide dans 300ml d'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$). Ajouter avec précaution 25ml d'HCl fumant puis ajuster avec de l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) jusqu'au trait de jauge. Agiter jusqu'à dissolution totale. Ajouter 0,5ml de réactif de Brij (tensio actif ou agent mouillant permettant un meilleur mélange entre les réactifs et l'eau de mer). La solution est stable une dizaine de jours.

REACTIF 2 (R2) :

Dans une fiole de 500 ml, mettre 0,25g de N-naphtyléthylène diamine. Ajuster jusqu'au trait de jauge avec de l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) et agiter jusqu'à dissolution. Le réactif peut être conservé une dizaine de jours.

REACTIF 3 (R3) :

Peser 10g de chlorure d'ammonium à dissoudre dans 1000ml d'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$). La solution est stable un mois. Tamponner à $\text{pH} = 8,5$ avec de l'ammoniac à 28% ($V_{\text{NH}_3} \pm 3,5 \text{ ml}$).

EAU DE REFERENCE (REF) :

Eau de mer naturelle appauvrie en sels nutritifs ou, à défaut, de l'eau de mer synthétique (solution de NH_4Cl , 35g/l).

SOLUTION ETALON A 10MMOL/L :

Peser précisément 1,0112g de nitrate de potassium à dissoudre dans 1l d'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$). Pour une conservation longue durée, ajouter à cette solution 1ml de chloroforme et la stocker dans un flacon en Nalgène à 4°C .

- Montage

Le circuit analytique pour le dosage des nitrates à des concentrations nanomolaires est schématisé à la figure 4. Les débits des tubes de pompes sont donnés en ml/min.

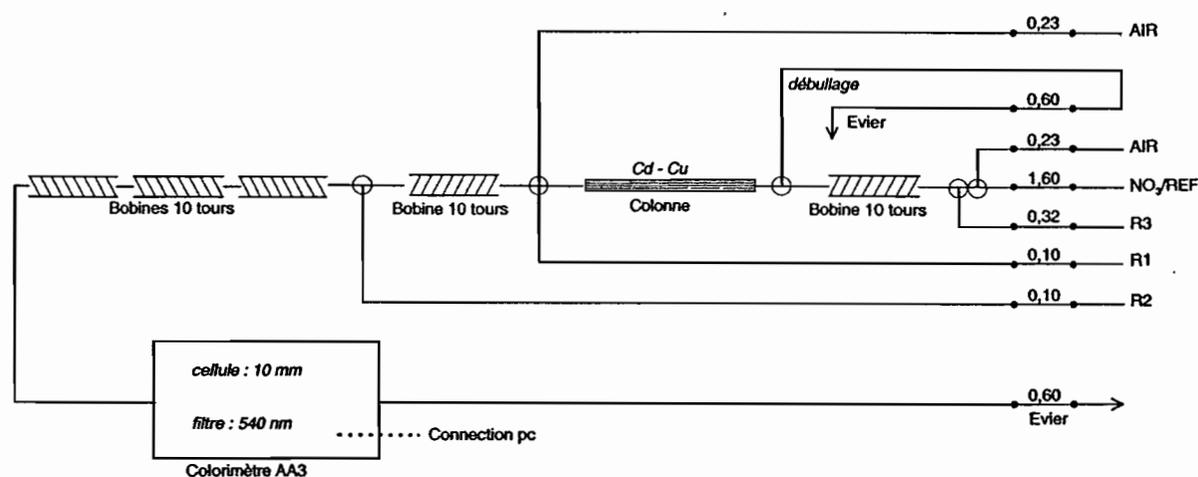


Fig. 4 : Manifold pour dosage des nitrates en concentration nanomolaires.

- Mesures

Les standards sont préparés à partir d'une solution fille (SF) de nitrate de potassium à $100\mu\text{mol/l}$ (10ml de SM dans 1l d'eau de mer appauvrie). Au laboratoire de Chimie Marine (IRD - Nouméa), nous travaillons généralement sur deux gammes de concentrations : de 0 à $0,15\mu\text{mol/l}$ N-NO₃ pour les échantillons du lagon de Nouvelle Calédonie et de 0 à $0,2\mu\text{mol/l}$ N-NO₃ pour les échantillons du lagon de Fidji.

	NOUVELLE CALEDONIE					FIDJI				
[NO ₃] ($\mu\text{mol/l}$)	0,005	0,01	0,05	0,1	0,15	0,01	0,02	0,08	0,15	0,2
V _{SF} (μl)	25	50	250	500	250	50	100	400	750	1000

Les standards sont tous préparés dans des fioles de 500ml et ajustés avec de l'eau de mer appauvrie.

Taux d'acquisition : 1 échantillon toutes les 3 minutes (90s pour l'analyse sur l'échantillon et 90s pour le rinçage du circuit sur l'eau de référence).

L'analyse nécessite en théorie un minimum de 5ml d'échantillon mais compte tenu des problèmes de pollution, il est conseillé de travailler sur des quantités au moins 10 fois plus grandes. La meilleure solution reste le prélèvement direct dans le flacon qui a servi à l'échantillonnage.

- Domaine d'application

La méthode de dosage proposée par Raimbault et al. (1990) doit être utilisée pour la mesure de concentrations variant de 0 à 100nmol/l . Elle peut être étendue jusqu'à 500nmol/l si par un réglage optique l'atténuation de la lampe peut être effectuée. Sur une gamme de concentration de 0 à 10nmol/l , l'incertitude de la mesure est de $\pm 0,48\text{nmol/l}$ avec un intervalle de confiance de 95%. Pour un étalonnage de 10 à 100nmol/l , l'incertitude est de $\pm 2,87\text{nmol/l}$ avec un intervalle de confiance de 95%. Sur une gamme plus étendue (0- 500nmol/l), l'incertitude est de $1,24\text{nmol/l}$ avec un intervalle de confiance de 95%. La limite de détection est de 2nmol/l .

3.4 Analyses de concentrations submicromolaires (0,2 à $1\mu\text{mol/l}$)

Pour certains échantillons côtiers tropicaux, les concentrations en éléments nutritifs peuvent être relativement importantes. L'utilisation de la méthode de Raimbault et al. (1990) nécessiterait une dilution des échantillons ce qui est toujours préjudiciable. Nous conseillons donc l'utilisation de la méthode d'Oudot et al. (1988) qui permet d'étendre la gamme d'analyse à $1\mu\text{mol/l}$ N-NO₃.

- Réactif

REACTIF 1 (R1), PREPARATION POUR 500 ML

Sulfanilamide	→	10g
HCl (d=1,18)	→	100ml
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	Compléter à 500ml
Brij 35	→	0,5ml

REACTIF 2 (R2), PREPARATION POUR 500ML

N-naphtyléthylène diamine	→	2g
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	Compléter à 500ml

REACTIF 3 (R3), PREPARATION POUR 500ML

Chlorure d'ammonium	→	100g
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	Compléter à 500ml

SOLUTION MERE (SM), 10MMOL/L

Nitrate de potassium	→	1,0112g
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	Compléter à 1000ml

SOLUTION FILLE (SF), 100μMOL/L

Solution mère (SM)	→	1ml
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	Compléter à 100ml

Tous les produits chimiques utilisés ici sont de qualité dit "analytique" sauf indication contraire. Une fois préparé, tous les réactifs sont stockés dans des flacons plastique opaque (Nalgène) et conservé à 4°C lorsqu'ils ne sont pas utilisés.

REACTIF 1 (R1) :

Dans une fiole de 500ml, dissoudre 10g de sulfanilamide dans 300ml d'eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm⁻¹). Ajouter *avec précaution* 100ml d'HCl fumant puis ajuster avec de l'eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm⁻¹) jusqu'au trait de jauge. Agiter jusqu'à dissolution totale. Ajouter 0,5ml de réactif de Brij (tensio actif ou agent mouillant permettant un meilleur mélange entre les réactifs et l'eau de mer). La solution peut être conservée un mois.

REACTIF 2 (R2) :

Dans une fiole de 500 ml, mettre 2g de N-naphtyléthylène diamine. Ajuster jusqu'au trait de jauge avec de l'eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm⁻¹) et agiter jusqu'à dissolution. Le réactif peut être conservé 3 à 4 semaines.

REACTIF 3 (R3) :

Peser 100g de chlorure d'ammonium à dissoudre dans 500ml d'eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm⁻¹). La solution est stable un mois.

EAU DE REFERENCE (REF) :

Eau de mer naturelle appauvrie en sels nutritifs ou à défaut de l'eau de mer synthétique (solution de NH_4Cl , 35g/l).

SOLUTION ETALON A 10MMOL/L :

Peser précisément 1,0112g de nitrate de potassium à dissoudre dans 1l d'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$). Pour une conservation longue durée, ajouter à cette solution 1ml de chloroforme et la stocker dans un flacon en Nalgène à 4°C.

• Montage

Le circuit analytique pour le dosage des nitrates à des concentrations submicromolaires est schématisé à la figure 5. Les débits des tubes de pompes sont donnés en ml/min.

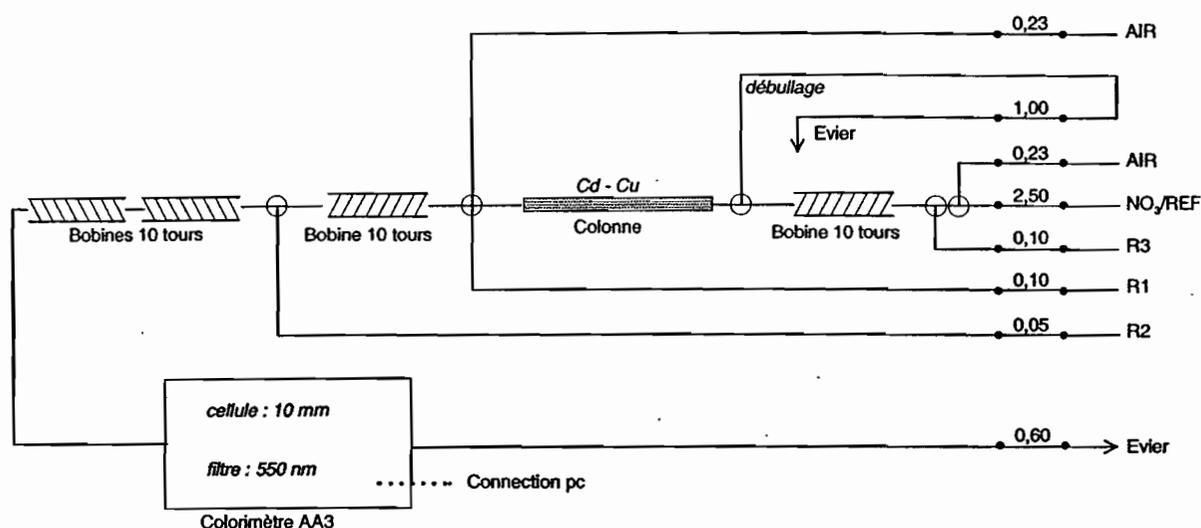


Fig. 5 : Manifold pour dosage des nitrates en concentration submicromolaires.

• Mesures

Les standards sont préparés à partir d'une solution fille (SF) de nitrate de potassium à $100 \mu\text{mol/l}$ (1ml de SM dans 1l d'eau de mer appauvrie).

$[\text{NO}_3]$ (NMOL/L)	0,2	0,3	0,5	0,75	1
V PIPETE (μL)	200	300	500	750	1000

Les standards sont tous préparés dans des fioles de 100ml et ajustés avec de l'eau de mer appauvrie.

Taux d'acquisition : 1 échantillon toutes les 3 minutes (90s pour l'analyse sur l'échantillon et 90s pour le rinçage du circuit sur l'eau de référence).

L'analyse nécessite en théorie un minimum de 5ml d'échantillon mais compte tenu des problèmes de pollution, il est conseillé de travailler sur des quantités au moins 10 fois plus grandes. La meilleure solution reste le prélèvement direct dans le flacon qui a servi à l'échantillonnage.

- **Domaine d'application**

Au laboratoire de Chimie Marine, la méthode de dosage proposée par Oudot et al. (1988) est utilisée pour la mesure de concentrations variant de 100nmol/l à 1 μ mol/l. Sur cette gamme de concentration, l'incertitude de la mesure est de ± 2 nmol/l avec un intervalle de confiance de 95%. La limite de détection est fixée à 5nmol/l.

4. ETALONNAGE & CALCULS

L'étalonnage (intensité du signal I en fonction de la concentration C) montre qu'il existe une relation linéaire de type :

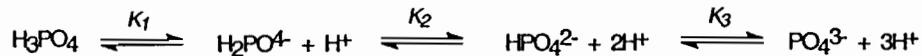
$$I = a \times C + b \text{ où } a \text{ est la pente de la droite et } b \text{ l'ordonnée à l'origine}$$

Pour un échantillon donné λ , l'intensité du signal sera I_λ . Sa concentration pourra alors être calculée de la façon suivante :

$$C_\lambda = \frac{I_\lambda - b}{a}$$

III. PHOSPHATES

Le phosphore minéral dissous dans l'eau de mer est essentiellement présent sous formes d'ions orthophosphates correspondant à la dissociation de l'acide orthophosphorique :



Compte tenu des valeurs du pH (8,2) et des différentes constantes d'acidité dans l'eau de mer ($\text{p}K_1=1,58$; $\text{p}K_2=5,98$; $\text{p}K_3=8,71$), les formes prépondérantes sont HPO_4^{2-} et PO_4^{3-} (Millero et al., 1992).

La concentration en orthophosphates dépend de phénomènes physiques (mélange, advection, diffusion) et biologiques (consommation par le phytoplancton, excrétion par le zooplancton) ou chimique (régénération par oxydation de la matière organique). Ainsi en milieu océanique les teneurs sont généralement très faibles en surface et augmentent avec la profondeur au-dessous de la zone euphotique. A l'approche des milieux côtiers ou estuariens, les concentrations augmentent très fortement. Elles sont le signe d'un enrichissement d'origine domestique et agricole. Dans les eaux saumâtres et turbides, les teneurs dépendent de la nature des particules en suspension.

1. PRINCIPE

La méthode utilisée pour le dosage des orthophosphates été mise au point par Murphy et Riley (1962). En milieu acide ($\text{pH}<1$), les ions phosphates réagissent avec le molybdate d'ammonium pour former un complexe jaune : le phosphomolybdate d'ammonium. Cette réaction décrite par Deniges (1920) reste encore mal connue ; l'hétéropolyanion ainsi formé aurait probablement pour formule chimique $(\text{NH}_4)_3\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4$. Ce complexe chimique est ensuite réduit par l'acide ascorbique. L'addition d'antimoine comme catalyseur réduit le temps de développement de la réaction de 24 heures à quelques minutes. Le composé bleu ainsi formé contient le phosphore, le molybdène et l'antimoine dans les proportions atomiques P/Mo/Sb : 1/12/1. La densité optique, indépendante de la salinité, suit la loi de Lambert-Beer. Le maximum d'absorption est mesuré à 885nm.

Parmi les anions susceptibles de former des complexes avec le molybdène, les arsénates donnent l'interférence la plus prononcée. Mais, compte tenu des très faibles concentrations rencontrées et de la lente cinétique, ces interférences sont négligeables (Murphy et Riley, 1962). Les nitrites en grandes concentrations peuvent également intervenir. Parmi les éléments métalliques, le cuivre en

concentration supérieure à 500 μ g/l peut également perturber la méthode. Enfin, une réaction avec les polyphosphates peut être envisagée si la température du milieu réactionnel est supérieure à 30°C (Souchay, 1969).

2. MATÉRIEL EMPLOYÉ

2.1 Appareillage

Au laboratoire de Chimie Marine, nous utilisons un Autoanalyzer III (Bran+Luebbe). La chaîne d'analyse est équipée des modules suivants :

- échantillonneur XYZ, dont les plateaux ont été modifiés pour recevoir des flacons de 60 ml (38x86 mm) ;
- pompe péristaltique ;
- plateau manifold ;
- colorimètre numérique deux voies (longueur de cuve : 10mm)
 - . filtre optique $\lambda = 880\text{nm}$; ref : 112+0001-88 (sans support) ou 165+B044-88 (avec support)
 - . détecteur ; ref : 169+B141-01
- PC + logiciel acquisition de donnée "AACE".

Pour avoir un signal stable et reproductif, il est conseillé d'allumer tous les appareils de la chaîne analytique au moins une heure avant utilisation afin de laisser le temps aux lampes et composants électroniques de chauffer.

2.2 Réactifs chimiques

PRODUIT	FORMULE CHIMIQUE	Fournisseur	REFERENCE
Oxytartrate d'antimoine et de potassium	$K(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6, 1/2\text{H}_2\text{O}$	Merck, P.A.	8092
L-Acide ascorbique	$(\text{HOOCCH}_2)_2\text{CH}(\text{COOH})$	Sigma, Ultra	A-5960
Acide sulfurique 95% (d=1,83)	H_2SO_4	Prolabo, P.A.	20 700.298
Heptamolybdate d'ammonium	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}, 4\text{H}_2\text{O}$	Merck, P.A.	1182.1000
Dihydrogénophosphate de potassium	KH_2PO_4	Merck, suprapur	1.05108.0050
Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) – Lauryl	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{SNa}$	Sigma	L-4509
Acétone	$(\text{CH}_3)_2\text{O}$	Prolabo, P.A.	20 066.296

3. MODALITÉ DU DOSAGE

3.1 Préparation des réactifs

SOLUTION D'ANTIMOINE, PREPARATION POUR 100ML

Oxytartrate d'antimoine et de potassium	→	2,3g
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	compléter à 100ml

REACTIF 1 (R1), PREPARATION POUR 1000ML

L-acide ascorbique	→	8g
Lauryl (SDS)	→	8g
Acétone	→	45ml
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	compléter à 1000ml

REACTIF 2 (R2), PREPARATION POUR 1000ML

Heptamolybdate d'ammonium	→	6g
Acide sulfurique (d=1,83)	→	64ml
Solution d'antimoine	→	22ml
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	compléter à 1000ml

SOLUTION MERE (SM), 1MMOL/L

Dihydrogénophosphate de potassium	→	0,1362g
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	compléter à 100ml
Chloroforme	→	1ml

- Solution d'antimoine

Dissoudre 2,3g d'oxytartrate d'antimoine et de potassium dans 100ml d'eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm⁻¹). Agiter énergiquement. Cette solution est stable pendant plusieurs mois.

- Réactif 1 (R1) :

Dans une fiole de 1l, dissoudre 8g de L-acide ascorbique avec 600ml d'eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm⁻¹). Ajouter 45ml d'acétone et 8g de SDS. Compléter la fiole jusqu'au trait de jauge avec de l'eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm⁻¹) puis agiter vigoureusement. La solution doit être transférée dans un flacon en polypropylène noir ; en dehors de son utilisation au technicon, elle est stockée à 4°C. Ainsi conditionnée, elle peut être conservée pendant une semaine.

- Réactif 2 (R2) :

Dans une fiole de 1l, diluer avec une extrême précaution 64ml d'acide sulfurique dans 500ml d'eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm⁻¹). Ajouter 6g d'heptamolybdate d'ammonium, mélanger puis ajouter 22ml de la solution d'antimoine. Compléter à 1l avec de l'eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm⁻¹) puis agiter. Le réactif ainsi préparé doit être totalement incolore. Pour cela, l'heptamolybdate d'ammonium utilisé doit être parfaitement blanc sans aucune teinte verdâtres. La solution ainsi préparée est transférée dans un flacon en polypropylène noir ; en dehors de son utilisation au technicon, elle est stockée à 4°C. Elle peut être conservée pendant une semaine.

Remarque importante 1 : Les acides concentrés sont des produits fortement corrosifs, il est indispensable de les manipuler avec la plus grande précaution. Toute manipulation doit se faire sous une hotte ; le manipulateur doit impérativement porter blouse et lunette. En cas de brûlure sur n'importe quelle partie du corps, il faut immédiatement rincer la zone atteinte à grande eau pendant ¼ d'heure même si la sensation d'échauffement disparaît rapidement. Les acides ont la capacité de pénétrer profondément dans les tissus ce qui peut alors induire de sérieuses lésions internes. Si l'accident semble important, il faut consulter un médecin.

Remarque importante 2 : Les acides sont des produits exothermiques c'est à dire que lorsqu'ils sont en contact avec un autre composé, la réaction qui se produit libère une forte chaleur. Pour toute dilution, il faut impérativement la faire en *versant lentement l'acide dans l'eau et non le contraire*. Ainsi la goutte d'acide qui tombera dans de l'eau sera automatiquement diluée et l'effet d'échauffement sera moindre. Si la température du milieu dilué devient trop importante, il faut arrêter l'addition d'acide et le faire refroidir par un bain d'eau et/ou de glace. L'addition d'acide supplémentaire pourrait conduire à un échauffement excessif et produire des projections de réactif autour de la zone de travail.

Remarque 3 : Dans le commerce, les acides concentrés sont tous appelés acides "purs" ou "fumants". Mais, selon la densité (d) et l'indice de pureté (%) du produit donnés par le fabricant, la concentration molaire peut varier même au sein d'acides "fumants" d'une même famille. Aussi si les caractéristiques (d et %) des acides ne sont pas rigoureusement les mêmes que celles utilisées au laboratoire de Chimie Marine, il est nécessaire de faire des corrections pour les volumes à mettre en œuvre.

A partir d'une solution commerciale, le calcul se fait de la façon suivante :

Soit d la densité de l'acide concentré,

% le degré de pureté du produit,

C_0 la concentration de l'acide commercial (mol/l),

C' la concentration de l'acide dilué (mol/l),

M la masse molaire de l'acide (g/mol),

E le volume d'acide concentré à diluer (unité de volume : l, ml ou autre),

U le volume total d'acide dilué (même unité de volume que E : l ml ou autre).

On a

$$C_0 = \frac{d \times \%}{M} \times 1000$$

$$C' = C_0 \times \frac{E}{U}$$

D'où E, le volume d'acide à diluer :

$$E = \frac{C'}{U} \times \frac{M}{d \times \% \times 1000}$$

- Eau de référence (REF) :

Eau de mer naturelle appauvrie en sels nutritifs ou, à défaut, de l'eau de mer synthétique (solution de NH_4Cl , 35g/l).

- Solution étalon à 1mmol/l :

Peser précisément 0,1362g de dihydrogénophosphate de potassium et dissoudre dans 1l d'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$). Pour une conservation longue durée, ajouter à cette solution 1ml de chloroforme et la stocker dans un flacon en polypropylène (Nalgène) à 4°C.

3.2 Flaconnage / Echantillonnage / Conservation

Les flacons utilisés pour l'analyse des éléments nutritifs sont réservés à cet usage exclusif. Il s'agit de flacons en polypropylène (Nalgène, 60ml, col large). Avant chaque utilisation, les flacons et bouchons ont subi un prétraitement à l'acide (HCl 10%, 4heures min).

Une fois la bouteille de prélèvement remontée à bord, l'échantillonnage se fait rapidement. La bouteille est mise sur un portoir en position verticale. Le flacon et le bouchon sont rincés 3 fois par l'eau de prélèvement puis le flacon est rempli jusqu'à la base de l'encolure. Si l'analyse ne peut pas être effectuée de suite, les échantillons sont conservés par congélation à -40°C .

3.3 Montage

Le circuit analytique pour le dosage des phosphates est représenté à la figure 6. Les débits des tubes de pompes sont donnés en ml/min.

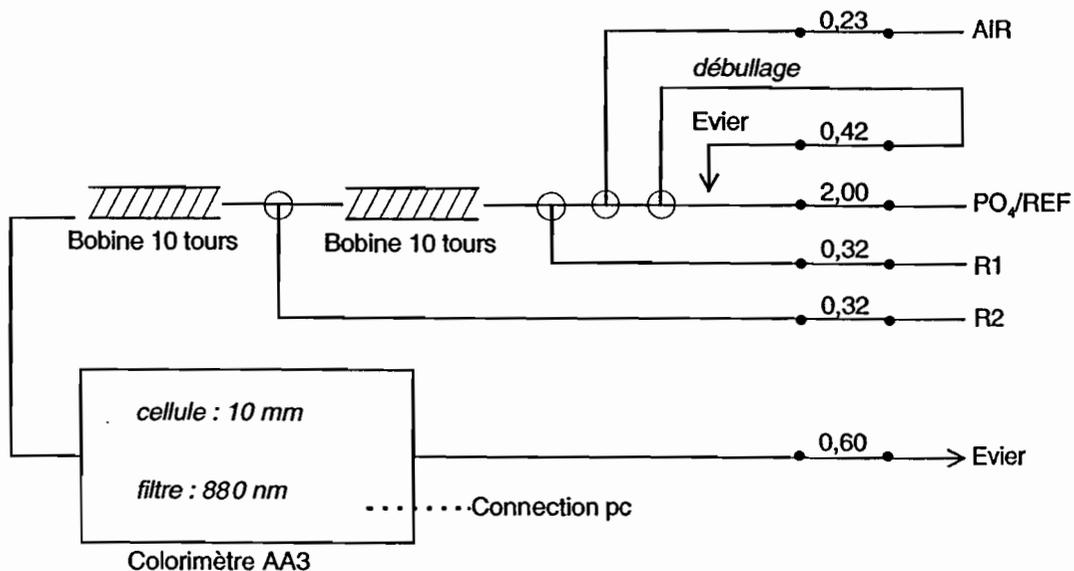


Fig. 6 : Manifold pour dosage des phosphates.

3.4 Mesures

Au laboratoire de Chimie Marine (IRD - Nouméa), nous travaillons généralement sur deux gammes de concentrations : de 0 à $1\mu\text{mol/l}$ P- PO_4 pour les échantillons des lagons de Nouvelle Calédonie et Fidji.

NOUVELLE CALEDONIE / FIDJI				
[PO_4] ($\mu\text{mol/l}$)	0,1	0,2	0,5	1
VSM (μl)	50	100	250	500

Les standards sont tous préparés dans des fioles de 500ml et ajustés avec de l'eau de mer appauvrie.

Taux d'acquisition : 1 échantillon toutes les 3 minutes (90s pour l'analyse sur l'échantillon et 90s pour le rinçage du circuit sur l'eau de référence).

L'analyse nécessite en théorie un minimum de 5ml d'échantillon mais compte tenu des problèmes de pollution, il est conseillé de travailler sur des quantités au moins 10 fois plus grandes. La meilleure solution reste le prélèvement direct dans le flacon qui a servi à l'échantillonnage.

3.5 Domaine d'application

Le domaine de concentrations mesurable est très étendu. : de 0 à $28\mu\text{mol/l}$ (Koroleff, 1976). Selon Riley et al. (1972), la relation de Lambert-Beer serait même linéaire jusqu'à $70\mu\text{mol/l}$. La limite de détection est de $0,01\mu\text{mol/l}$ avec un intervalle de confiance de 95% sur la gamme de 0 à $3\mu\text{mol/l}$.

4. ETALONNAGE & CALCULS

L'étalonnage (intensité du signal I en fonction de la concentration C) montre qu'il existe une relation linéaire de type :

$$I = a \times C + b \text{ où } a \text{ est la pente de la droite et } b \text{ l'ordonnée à l'origine}$$

Pour un échantillon donné λ , l'intensité du signal sera I_λ . Sa concentration pourra alors être calculée de la façon suivante :

$$C_\lambda = \frac{I_\lambda - b}{a}$$

IV. Silicates

Le silicium n'est pas un composant de la matière vivante proprement dite mais il constitue l'essentiel des squelettes de divers organismes marins comme les algues siliceuses, certains radiolaires, les diatomés. Bien que cet élément soit l'un des plus abondants de l'écorce terrestre, sa concentration dans l'eau de mer peut devenir insuffisante par suite de sa très faible solubilité dans l'eau. Au pH habituel de l'eau de mer ($\approx 8,2$), le silicium dissous se trouve à 95% sous la forme d'acide orthosilicique Si(OH)_4 et 5% sous forme ionisée SiO(OH)_3^- . En plus du silicium à l'état dissous, les eaux de mer contiennent du silicium à l'état particulaire de nature biogénique (frustules de diatomées), terrigène ou cosmique. Mais ce silicium n'est pas directement assimilable par les organismes vivants ; il ne constitue pas un élément nutritif et n'entre pas en compte dans les études.

Les concentrations en silicium dissous varient en fonction de l'origine et la nature des eaux. Ainsi les concentrations de surface sont généralement très faibles ($<1\mu\text{mol/l}$). Les concentrations augmentent progressivement lorsqu'on se rapproche des côtes ou des estuaires. De même, en milieu océanique profond elles peuvent atteindre $150\mu\text{mol/l}$.

On notera également que par analogie avec les autres éléments nutritifs : nitrates, phosphates, le terme "silicates" continue à être utilisé improprement.

1. PRINCIPE

La méthode qui sert de référence est celle de Mullin et Riley (1965), modifiée par Fanning et Pilson (1973). Le dosage colorimétrique est fondé sur la formation d'un complexe silicomolybdique qui, après réduction donne une coloration bleue intense.

Les silicates dissous dans l'eau de mer réagissent en milieu acide ($1 < \text{pH} < 2$) avec les ions molybdates pour former un hétéropolyacide : l'acide silicomolybdique ($\text{H}_8[\text{Si}(\text{Mo}_2\text{O}_7)_6]$, $28\text{H}_2\text{O}$). Ce complexe jaune est réduit par un mélange de "métol" (sulfate de méthyl-amino-4-phénol) et de sulfite de sodium pour former le bleu de molybdène. La densité optique du complexe est mesurée à 810nm .

La réaction est relativement libre d'interférences. Celles qui pourraient y avoir avec les phosphates et les arsénates dissous dans l'eau de mer sont éliminées en opérant à pH convenable et en ajoutant de l'acide oxalique qui décompose les phospho- et arséniomolybdates éventuellement formés. L'acide orthosilicique a tendance à former des polymères dont seules les formes mono et dimères réagissent avec les ions molybdates mais dans les conditions de réaction, les silicates colloïdaux sont mesurés avec les silicates dissous (Koroleff, 1976).

2. MATÉRIEL EMPLOYÉ

2.1 Appareillage

Au laboratoire de Chimie Marine, nous utilisons un Autoanalyzer III (Bran+Luebbe). La chaîne d'analyse est équipée des modules suivants :

- échantillonneur XYZ, dont les plateaux ont été modifiés pour recevoir des flacons de 60 ml (38x86 mm) ;
- pompe péristaltique ;
- plateau manifold ;
- colorimètre numérique deux voies (longueur de cuve : 10mm)
 - . filtre optique $\lambda = 880\text{nm}$; ref : 112+0001-88 (sans support) ou 165+B044-88 (avec support)
 - . détecteur ; ref : 169+B141-01
- PC + logiciel acquisition de donnée "AACE".

Pour avoir un signal stable et reproductif, il est conseillé d'allumer tous les appareils de la chaîne analytique au moins une heure avant utilisation afin de laisser le temps aux lampes et composants électroniques de chauffer.

2.2 Réactifs chimiques

PRODUIT	FORMULE CHIMIQUE	Fournisseur	REFERENCE
Acide oxalique	$(\text{COOH})_2, 2\text{H}_2\text{O}$	Merck	495
Sulfite de sodium	Na_2SO_3	Sigma	S-0505
Acide sulfurique 95% (d=1,83)	H_2SO_4	Prolabo, P.A.	20 700.298
Heptamolybdate d'ammonium	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}, 4\text{H}_2\text{O}$	Merck, P.A.	1182.1000
Sulfate de méthyl amino 4 phénol (Photo rex)	$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$	Merck, P.A.	7299.0250
Silico fluorure de sodium	Na_2SiF_6	Fisher	S416
Aérosol 22		Sigma	A9753

3. MODALITÉ DU DOSAGE

3.1 Préparation des réactifs

Pour les analyses de silicium, on ne doit absolument pas stocker l'eau déminéralisée dans du flaconnage en verre mais dans des récipients en plastique. Il est également préférable de préparer les réactifs dans des fioles en polypropylène (Nalgène).

SOLUTION D'ACIDE SULFURIQUE, 4,9N		
Acide sulfurique, d=1,83	→	136ml
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	compléter à 1000ml
REACTIF 1 (R1), PREPARATION POUR 1000ML		
Heptamolybdate d'ammonium	→	10g
Solution d'acide sulfurique (4,9N)	→	41ml
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	Compléter à 1000ml
REACTIF 2 (R2), PREPARATION POUR 1000ML		
Acide oxalique	→	7g
Acide sulfurique (d=1,83)	→	50ml
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	compléter à 1000ml
Aérosol 22	→	1ml
REACTIF 3 (R3), PREPARATION POUR 1000ML		
Sulfite de sodium	→	12g
Sulfate de méthyl amino-4-phénol	→	10g
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	Compléter à 1000ml
SOLUTION MERE (SM), 5MMOL/L		
Silico fluorure de sodium	→	0,940g
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	compléter à 100ml
Chloroforme	→	1ml

- Solution d'acide sulfurique (4,9N)

Dans une fiole de 1l, diluer avec une extrême précaution 136ml d'acide sulfurique (d=1,83) dans 500ml d'eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm⁻¹). Compléter ensuite avec de l'eau milliQ jusqu'au trait de jauge.

Remarque importante 1 : Les acides concentrés sont des produits fortement corrosifs, il est indispensable de les manipuler avec la plus grande précaution. Toute manipulation doit se faire sous une hotte ; le manipulateur doit impérativement porter blouse et lunette. En cas de brûlure sur n'importe quelle partie du corps, il faut immédiatement rincer la zone atteinte à grande eau pendant ¼ d'heure même si la sensation d'échauffement disparaît rapidement. Les acides ont la capacité de pénétrer profondément dans les tissus ce qui peut alors induire de sérieuses lésions internes. Si l'accident semble important, il faut consulter un médecin.

Remarque importante 2 : Les acides sont des produits exothermiques c'est à dire que lorsqu'ils sont en contact avec un autre composé, la réaction qui se produit libère une forte chaleur. Pour toute dilution, il faut impérativement la faire en *versant lentement l'acide dans l'eau et non le contraire*. Ainsi la goutte d'acide qui tombera dans de l'eau sera automatiquement diluée et l'effet d'échauffement sera moindre. Si la température du milieu dilué devient trop importante, il faut arrêter l'addition d'acide et le faire refroidir par un bain d'eau et/ou de glace. L'addition d'acide supplémentaire pourrait conduire à un échauffement excessif et produire des projections de réactif autour de la zone de travail.

Remarque 3 : Dans le commerce, les acides concentrés sont tous appelés acides "purs" ou "fumants". Mais, selon la densité (d) et l'indice de pureté (%) du produit donnés par le fabricant, la concentration molaire peut varier même au sein d'acides "fumants" d'une même famille. Aussi si les caractéristiques (d et %) des acides ne sont pas rigoureusement les mêmes que celles utilisées au laboratoire de Chimie Marine, il est nécessaire de faire des corrections pour les volumes à mettre en œuvre.

A partir d'une solution commerciale, le calcul se fait de la façon suivante :

Soit d la densité de l'acide concentré,

% le degré de pureté du produit,

C_0 la concentration de l'acide commercial (mol/l),

C' la concentration de l'acide dilué (mol/l),

M la masse molaire de l'acide (g/mol),

E le volume d'acide concentré à diluer (unité de volume : l, ml ou autre),

U le volume total d'acide dilué (même unité de volume que E : l ml ou autre).

On a

$$C_0 = \frac{d \times \%}{M} \times 1000$$

$$C' = C_0 \times \frac{E}{U}$$

D'où E, le volume d'acide à diluer :

$$E = \frac{C'}{U} \times \frac{M}{d \times \% \times 1000}$$

- Réactif 1 (R1) :

Dans une fiole d'un litre, dissoudre 10g d'heptamolybdate d'ammonium avec 500ml d'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) environ. Ajouter lentement 41ml de la solution d'acide sulfurique à 4,9N. Mélanger et laisser refroidir puis compléter le volume à 1000ml avec de l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$). La solution doit ensuite être immédiatement transférée dans un flacon en polypropylène noir. En dehors de son utilisation au technicon, elle est stockée à 4°C. Ainsi conditionnée, elle peut être conservée pendant plusieurs mois. Un fin précipité peut se former sur les parois et décanter au fond du flacon. Il est alors nécessaire de faire une filtration sur un filtre en polycarbonate de type Millipore à 0,45 μ . Avant renouvellement du réactif, le dépôt peut être éliminé par une solution basique.

- Réactif 2 (R2) :

Dans une fiole d'un litre, verser avec une extrême précaution 50ml d'acide sulfurique dans 500ml d'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$) environ. Agiter souvent et laisser refroidir si nécessaire. Ajouter ensuite 7g d'acide oxalique puis compléter jusqu'au trait de jauge par de l'eau. Pour finir, ajouter 1ml d'aérosol 22. La solution doit ensuite être immédiatement transférée dans un flacon en polypropylène noir. En dehors de son utilisation au technicon. Cette solution se dégrade rapidement et doit être renouvelée toutes les deux à trois semaines ou si elle prend une couleur sombre.

- Réactif 3 (R3) :

Dans une fiole d'un litre, dissoudre successivement 10g de photo-rex et 12g de sulfite de sodium dans 500ml d'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$) environ. Agiter énergiquement : la dissolution est lente et difficile. Compléter ensuite jusqu'au trait de jauge par de l'eau milliQ. La solution ainsi préparée est immédiatement transférée dans un flacon en polypropylène noir. En dehors de son utilisation au technicon, elle est stockée à 4°C. Cette solution se dégrade rapidement et doit être renouvelée toutes les deux à trois semaines ou si elle prend une couleur sombre.

- Eau de référence (REF) :

Eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$) fraîchement déminéralisée.

- Solution étalon à 1mmol/l :

Peser précisément 0,940g de silico fluorure de sodium et dissoudre dans 1l d'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$). Pour une conservation longue durée, ajouter à cette solution 1ml de chloroforme et la stocker dans un flacon en polypropylène (Nalgène) à 4°C.

3.2 Flaconnage / Echantillonnage / Conservation

Les flacons utilisés pour l'analyse des éléments nutritifs sont réservés à cet usage exclusif. Il s'agit de flacons en polypropylène (Nalgène, 60ml, col large). Avant chaque utilisation, les flacons et bouchons ont subi un prétraitement à l'acide (HCl 10%, 4heures min).

Une fois la bouteille de prélèvement remontée à bord, l'échantillonnage se fait rapidement. La bouteille est mise sur un portoir en position verticale. Le flacon et le bouchon sont rincés 3 fois par l'eau de prélèvement puis le flacon est rempli jusqu'à la base de l'encolure. Si l'analyse ne peut pas être effectuée de suite, les échantillons sont conservés par congélation à -40°C.

3.3 Montage

Le circuit analytique pour le dosage des silicates est représenté à la figure 7.

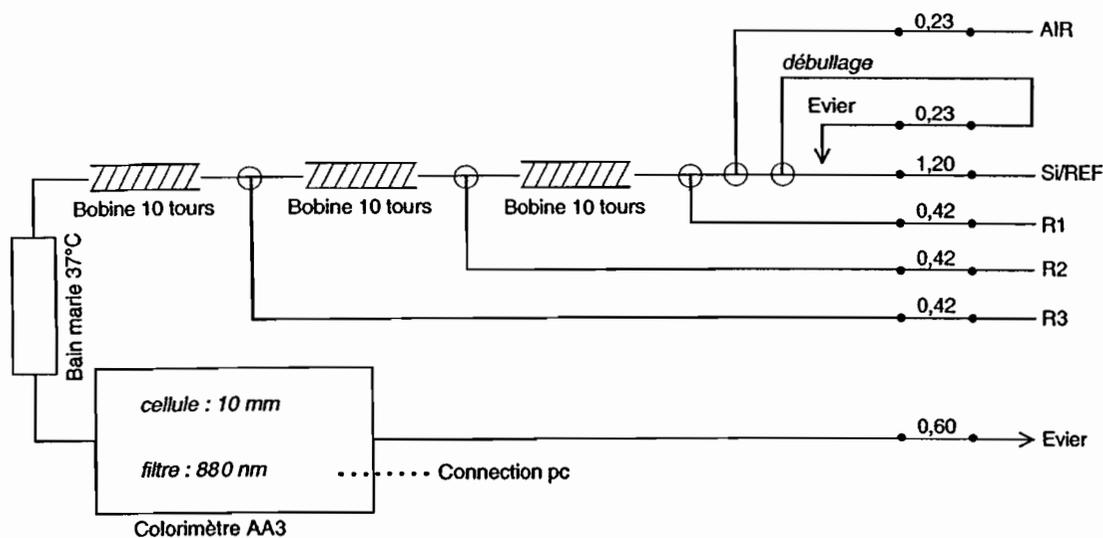


Fig. 7 : Manifold pour dosage des silicates

3.4 Mesures

Au laboratoire de Chimie Marine (IRD - Nouméa), nous travaillons généralement sur deux gammes de concentrations : de 0 à $20 \mu\text{mol/l}$ Si pour les échantillons des lagons de Nouvelle Calédonie et Fidji.

	NOUVELLE CALEDONIE / FIDJI				
$[\text{Si}(\text{OH})_4]$ ($\mu\text{mol/l}$)	1	2,5	5	10	20
VSM (μl)	20	50	100	200	400

Les standards sont tous préparés dans des fioles en polypropylène (Nalgène) de 100ml et ajustés avec de l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$).

Taux d'acquisition : 1 échantillon toutes les 3 minutes (90s pour l'analyse sur l'échantillon et 90s pour le rinçage du circuit sur l'eau de référence).

L'analyse nécessite en théorie un minimum de 5ml d'échantillon mais compte tenu des problèmes de pollution, il est conseillé de travailler sur des quantités au moins 10 fois plus grandes. La meilleure solution reste le prélèvement direct dans le flacon qui a servi à l'échantillonnage.

Pour ce type d'analyse, l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$) est utilisée comme matrice de référence. Lorsque l'échantillon d'eau de mer circule dans le manifold puis arrive au détecteur, il peut y avoir des différences d'absorption importantes entre ces deux milieux dues :

- à la turbidité propre de l'eau de mer,
- aux réglages optiques de l'appareil,
- à la nature des réactifs.

Une correction de "l'effet de sel" est donc nécessaire. Pour cela, à la fin de la série d'analyse, remplacer le réactif 1 (R1) par de l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$) ; les réactifs 2 et 3 (R2 et R3) restent inchangés. En laissant l'aiguille de prélèvement dans la cuve de lavage, une nouvelle ligne de base est obtenue. On notera Δ la valeur absolue de l'écart entre les deux lignes de base.

3.5 Domaine d'application

Le domaine de concentrations mesurables est très étendu. La loi de Lambert-Beer est vérifiée sur la gamme de 0 à $140 \mu\text{mol/l}$. La limite de détection est de $0,05 \mu\text{mol/l}$ et l'intervalle de confiance de 98,5% sur une gamme de 0 à $10 \mu\text{mol/l}$ de Si.

4. ETALONNAGE & CALCULS

L'étalonnage (intensité du signal I en fonction de la concentration C) montre qu'il existe une relation linéaire de type :

$$I = a \times C + b \text{ où } a \text{ est la pente de la droite et } b \text{ l'ordonnée à l'origine}$$

Pour un échantillon donné λ , l'intensité du signal sera I_λ . Soit I_λ^c , l'intensité du signal corrigé de "l'effet de sel" :

$$I_\lambda^c = I_\lambda + \Delta$$

Sa concentration pourra alors être calculé de la façon suivante :

$$C_\lambda = \frac{I_\lambda^c - b}{a}$$

V. AZOTE & PHOSPHORE ORGANIQUE

“En plus des substances dissoutes, les eaux de mer contiennent des matières en suspension de toutes tailles et de toutes formes, minérales ou organiques, vivantes ou détritiques, de nature soit biogénique (bactéries, phytoplancton, zooplancton, poissons), soit terrigène (apports fluviaux, produits de l'érosion des côtes, débris déversés par l'homme), soit éolienne (particules transportées par les courants atmosphériques et tombant dans la mer), soit enfin météorologique“ (Ivanoff, 1972). Dans cette définition très large, la matière en suspension représente passivement la fraction entraînée par les courants. En pratique, les déterminations effectuées sont celles qui concernent la matière particulaire excluant les grosses particules au mouvement propres (gros zooplancton, poissons...). Il est courant d'opposer le matériel particulaire aux substances dissoutes. En fait, il y a un passage continu de l'un à l'autre. La distinction est arbitraire et elle dépend des filtres utilisés. En océanographie, on admet généralement que la limite de taille pour séparer les particules des substances dissoutes se situe aux environs de $0,5\mu\text{m}$ (Strickland et Parsons, 1972).

Pour l'étude de la matière particulaire, on utilise habituellement un assemblage permettant d'effectuer les filtrations sur disques filtrant de 47 ou 25mm de diamètre. Il est parfois nécessaire de filtrer de très grandes quantités lorsque les eaux sont particulièrement pauvres. La différence de pression entre les deux faces du filtre ne doit pas excéder 0,7bar lors de filtration sous vide (Banse et al., 1963). Cette précaution évitera l'éclatement des cellules biologiques les plus fragiles, donc des pertes de masses sur le filtre ou des contaminations de filtrats. Le choix des membranes filtrantes dépend de différents critères : taille des particules à retenir, paramètres analysés et parfois méthode d'analyse employée. Des membranes de matériaux très différents sont disponibles. Les plus couramment utilisées sont les filtres en esters de cellulose et en fibre de verre. Ces derniers présentent plusieurs avantages : résistants aux agents chimiques et à la température (500°C), non hygroscopique, à débit élevé.

1. OXYDATION PAR VOIE HUMIDE

1.1 Principe

Contrairement à l'analyse des éléments nutritifs, le dosage de la matière organique n'est pas direct. La matière organique est d'abord dégradée en substances minérales puis, les composés inorganiques sont ensuite mesurés par colorimétrie sur un autoanalyser de type Bran-Luebbe III. Il existe plusieurs

méthodes d'oxydation ; parmi les plus connues citons la combustion à haute température, l'oxydation par ultra violet ou l'oxydation par voie humide...

La méthode de Raimbault et al. (1999) d'oxydation par voie humide est celle utilisée au laboratoire de Chimie Marine. Elle présente l'avantage d'être simple et rapide à mettre en œuvre et ne nécessite pas d'appareillage lourd ou sophistiqué. Elle permet, en outre, de traiter un grand nombre d'échantillon simultanément. Selon ce procédé, la matière organique est dégradée par un oxydant puissant : le persulfate de sodium sous des conditions faiblement alcalines (pH ≈ 9) à 120°C et 1atm. Le carbone, l'azote et le phosphore organique (dissous ou particulaire) sont alors transformés en substances minérales sous les formes respectives de dioxyde de carbone, nitrate et phosphate.

1.2 Matériel employé

- Appareillage

Au laboratoire de Chimie Marine, nous utilisons le matériel suivant :

- autoclave de paillasse de 20l à contrôle manuel ; ref : B81520, Bioblock ;
- flacons en verre borosilicaté Schott de 50ml DURAN avec un col à vis ; ref : 09 926.043, Prolabo ;
- bouchon en polyester thermoplastique rouge ; ref : 09 930.402, Prolabo ;
- bague anti goutte en polyester thermoplastique rouge ; ref : 090931.336, Prolabo.

Remarque : il est également possible d'utiliser des bouchons et bagues anti goutte en polypropylène bleu (ref. respective : 09 928.905 et 09 929.908, Prolabo). Tout comme les bouchons et bagues en polyester thermoplastique, ils sont autoclavables sous pression mais ont une résistance à la température de 140°C contre une résistance à la température de 200°C pour le polyester thermoplastique. Ce dernier pourra alors subir un nombre de "cuisson" plus important avant de présenter des signes de vieillissement.

- Réactifs chimiques

PRODUIT	FORMULE CHIMIQUE	FOURNISSEUR	REFERENCE
Persulfate de potassium	$K_2O_8S_2$	Sigma ACS	21,622-4
Acide borique	H_3BO_3	Sigma ACS	B 0394
Soude	NaOH	Sigma ACS	S 0899

1.3 Flaconnage / Échantillonnage / Conservation

- Azote et phosphore organique dissous

Les flacons utilisés pour l'échantillonnage de la matière organique dissoute sont réservés à cet usage exclusif. Il s'agit de flacons en polypropylène (Nalgène, 120ml, col étroit). Avant chaque utilisation, les flacons et bouchons ont subi un prétraitement à l'acide (HCl 10%, 4heures min).

Une fois la bouteille de prélèvement remontée à bord, l'échantillonnage se fait rapidement. La bouteille est mise sur un portoir en position verticale. Le flacon et le bouchon sont rincés 3 fois par l'eau de prélèvement puis le flacon est rempli jusqu'à la base de l'encolure. Si l'analyse ne peut pas être effectuée de suite, les échantillons sont conservés par congélation à -40°C .

- Azote et phosphore organique particulaire

Le matériel particulaire est récolté par filtration sur des filtres Whatman GF/F (diamètre 25mm, porosité $0,7\mu$). Avant utilisation, les filtres ont subi une pré-calcination à 450°C pendant 2 heures afin d'éliminer toute trace de matière organique. Les volumes d'eau de mer filtrés dépendent de la charge particulaire. En générale, dans les eaux de Nouvelle Calédonie, nous travaillons sur des volumes de 750ml et dans les eaux de Fidji, nous filtrons 500ml d'eau de mer. Après filtration, le filtre est stocké dans un microtube en polypropylène transparent de 1,5ml puis conservé par congélation à -40°C jusqu'à l'analyse.

1.4 Modalité de l'attaque

- Mélange réactionnel

SOLUTION D'HYDROXYDE DE SODIUM, 1,5M

Hydroxyde de sodium	→	60g
Eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$)	→	Compléter à 1000ml

REACTIF D'OXYDATION :

Persulfate de potassium	→	15g
Acide borique	→	7,5g
Soude, 1,5M	→	70ml
Eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$)	→	250ml

- Protocole

Dans un premier temps, laver au moins 2 fois le flacon et le bouchon avec une petite quantité d'échantillon. Ensuite, introduire 40ml d'eau de mer puis ajouter 5ml de réactif oxydant. Boucher et agiter le flacon. Mettre à l'autoclave à 120°C sous 1atm pendant 30min. Pour chaque série de "cuisson", prévoir 3 blancs (5ml de réactif à 120°C sous 1atm pendant 30 min puis addition de 40ml d'eau de mer appauvrie servant de référence au dosage). Laisser refroidir puis analyser les produits de dégradation (nitrates et phosphates) directement à l'auto-analyseur selon les besoins.

L'oxydation de la matière organique particulaire se fait de la façon suivante : dans un flacon Schott de 50ml, introduire le filtre en fibre de verre (Whatman GF/F) qui a servi à recueillir le matériel particulaire présent dans la colonne d'eau. Ajouter 40ml d'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) et 5ml de réactif oxydant. Boucher et agiter le flacon. Mettre à l'autoclave à 120°C et sous 1atm pendant 30min. Pour chaque série de "cuisson", prévoir 3 blancs (filtre Whatman GF/F 25mm+ 5ml de réactif à 120°C sous 1atm pendant 30 min puis ajouter 40ml d'eau de mer appauvrie utilisée comme référence pour le dosage). Laisser refroidir. Avant d'analyser les produits de dégradation (nitrates et phosphates) au Technicon, il est nécessaire de centrifuger l'échantillon à 3000tr/min pendant 5min afin d'éliminer toutes les particules de fibre de verre qui pourraient gêner le fonctionnement hydraulique de la chaîne d'analyse. La centrifugation se fait dans des tubes en polypropylène fermés par un bouchon à vis. L'échantillon est alors directement prélevé dans la partie sumageante.

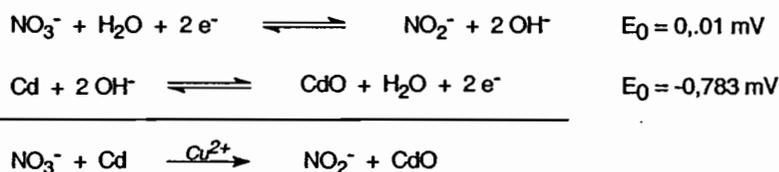
Remarque : lorsque le matériel est neuf (flacon, bague anti goutte et/ou bouchon), il est nécessaire de faire au préalable une "cuisson" à blanc pour assurer un nettoyage parfait. Pour cela, introduire dans le flacon Schott de 50ml, 40ml d'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) et 5ml de réactif. Mettre à l'autoclave à 120°C sous 1atm pendant 30min. Laisser refroidir, jeter l'échantillon puis rincer 3 fois avec de l'eau milliQ. Ensuite, entre chaque série, le flacon est lavé avec des petites quantité d'eau milliQ, 3 fois avant d'être stocké ou réutilisé.

2. AZOTE ORGANIQUE DISSOUS ET PARTICULAIRE

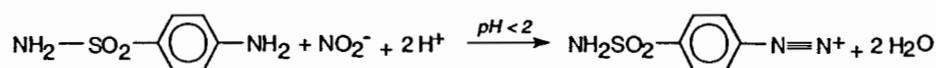
2.1 Principe

Plusieurs méthodes de dosage ont été appliquées à l'eau de mer mais compte tenu des faibles concentrations océaniques et des interférences possibles, la méthode retenue quasi universellement est celle fondée sur le dosage des ions nitrites obtenu par réduction des ions nitrates. On mesure donc en réalité la somme des concentrations nitrites+nitrates. L'analyse des nitrites est effectuée directement sans réduction. Par déduction de la concentration en nitrites, on obtient donc la concentration en nitrates.

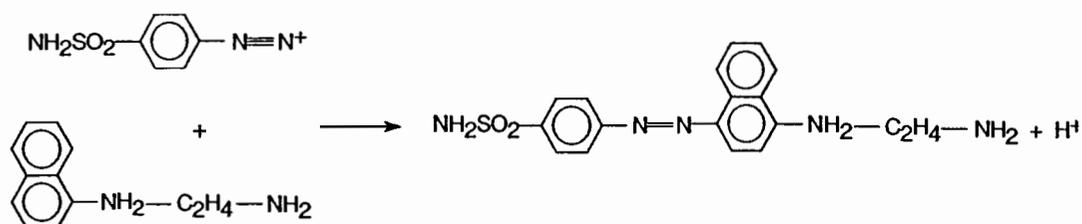
Les ions nitrates dissous dans l'eau de mer sont réduits en nitrites presque quantitativement (>95%) par passage sur une colonne de cadmium traité au cuivre (Wood et al., 1967).



Le dosage des ions nitrites est fondé sur la réaction de Griess ; la méthode a été ensuite appliquée aux analyses en milieu marin par Bendschneider et Robinson (1952). Les ions nitrites forment un diazoïque avec la sulfanilamide (para-aminobenzènesulfamide) en milieu acide selon la réaction :



Le diazoïque ainsi formé réagit ensuite avec l'EDTA "N-(Naphthyl-1)-éthylène diamine" pour former un colorant azoïque rose qui absorbe à une longueur d'onde de 543nm.



2.2 Matériel employé

• Appareillage

Au laboratoire de Chimie Marine, nous utilisons un Autoanalyzer III (Bran+Luebbe). La chaîne d'analyse est équipée des modules suivants :

- échantillonneur XYZ, dont les plateaux ont été modifiés pour recevoir des flacons de 60 ml (38x86 mm) ;
- pompe péristaltique ;
- plateau manifold ;
- colorimètre numérique deux voies (longueur de cuve : 10mm)
 - . filtre optique $\lambda = 550\text{nm}$; ref : 112+0001-55 (sans support) ou 165+B044-55 (avec support)
 - . détecteur ; ref : 169+B141-01
- PC + logiciel acquisition de donnée "AACE".

Pour avoir un signal stable et reproductif, il est conseillé d'allumer tous les appareils de la chaîne analytique au moins une heure avant utilisation afin de laisser le temps aux lampes et composants électroniques de chauffer.

- Réactifs chimiques

PRODUIT	FORMULE CHIMIQUE	FOURNISSEUR	REFERENCE
Cadmium 99,9%	Cd	Merck	2001
Chlorure d'ammonium	NH ₄ Cl	Prolabo, P.A.	21 236.291
Acide chlorhydrique 36%, d=1,18	HCl	Prolabo, P.A.	20 252.290
Acide nitrique 60%, d=1,37	HNO ₃	Prolabo, P.A.	20 423.291
Nitrate de potassium	KNO ₃	Merck, Suprapur	105065
Sulfate de cuivre pentahydraté	CuSO ₄ , 5H ₂ O	Prolabo, PA	23 174.290
Sulfanilamide (amino-4-benzènesulfonamide)	C ₆ H ₅ (NH) ₂ SO(OH)	Sigma, P.A.	S9251
EDTA (N-naphtyléthylènediamine)	(NH ₂ CH ₂ C ₆ H ₃) ₂ , 2HCl	Sigma, P.A.	N 5889
Chloroforme	CHCl ₃	Prolabo, P.A.	22 711.290
Réactif de Brij 35, 30% w/v (ester de polyoxyéthylène)		Sigma, P.A.	430AG-6

2.3 Préparation de la colonne

SOLUTION DE SULLFATE DE CUIVRE, 2%		
Sulfate de cuivre	→	20g
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	Compléter à 1000ml
SOLUTION DE RINCAGE NH ₄ CL, 10G/L :		
Chlorure d'ammonium	→	10g
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	Compléter à 1000ml
ACIDE CHLORHYDRIQUE, 2N		
HCl (d=1,18)	→	172ml
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	Compléter à 1000ml
ACIDE NITRIQUE, 0,3N		
HNO ₃ (d=1,38)	→	23ml
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	Compléter à 1000ml

- Réactifs

CADENCER en poudre 0,5-0,9mm.

SULFATE DE CUIVRE A 2% :

La solution est préparée par dissolution de 20g de CuSO₄ dans 1l d'eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm⁻¹).

CHLORURE D'AMMONIUM 10G/L :

Pour la solution de NH₄Cl de rinçage, dissoudre 10g dans 1l d'eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm⁻¹).

ACIDE CHLORHYDRIQUE 2N :

La solution est préparée de la façon suivante : verser lentement 172ml d'HCl ($d=1,18$; 36%) dans 828ml d'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$).

ACIDE NITRIQUE 0,3N :

La solution d' HNO_3 à 0,3mol/l est préparée de la façon suivante : verser lentement 23ml d' HNO_3 ($d=1,38$; 61%) dans 977ml d'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$).

Remarque importante 1 : Les acides concentrés sont des produits fortement corrosifs, il est indispensable de les manipuler avec la plus grande précaution. Toute manipulation doit se faire sous une hotte ; le manipulateur doit impérativement porter blouse et lunette. En cas de brûlure sur n'importe quelle partie du corps, il faut immédiatement rincer la zone atteinte à grande eau pendant $\frac{1}{4}$ d'heure même si la sensation d'échauffement disparaît rapidement. Les acides ont la capacité de pénétrer profondément dans les tissus ce qui peut alors induire de sérieuses lésions internes. Si l'accident semble important, il faut consulter un médecin.

Remarque importante 2 : Les acides sont des produits exothermiques c'est à dire que lorsqu'ils sont en contact avec un autre composé, la réaction qui se produit libère une forte chaleur. Pour toute dilution, il faut impérativement la faire en *versant lentement l'acide dans l'eau et non le contraire*. Ainsi la goutte d'acide qui tombera dans de l'eau sera automatiquement diluée et l'effet d'échauffement sera moindre. Si la température du milieu dilué devient trop importante, il faut arrêter l'addition d'acide et le faire refroidir par un bain d'eau et/ou de glace. L'addition d'acide supplémentaire pourrait conduire à un échauffement excessif et produire des projections de réactif autour de la zone de travail.

Remarque 3 : Dans le commerce, les acides concentrés sont tous appelés acides "purs" ou "fumants". Mais, selon la densité (d) et l'indice de pureté (%) du produit donnés par le fabricant, la concentration molaire peut varier même au sein d'acides "fumants" d'une même famille. Aussi si les caractéristiques (d et %) des acides chlorhydriques et acides nitriques ne sont pas rigoureusement les mêmes que celles utilisées au laboratoire de Chimie Marine, il est nécessaire de faire des corrections pour les volumes à mettre en œuvre.

A partir d'une solution commerciale, le calcul se fait de la façon suivante :

Soit d la densité de l'acide concentré,

% le degré de pureté du produit,

C_0 la concentration de l'acide commercial (mol/l),

C' la concentration de l'acide dilué (mol/l),

M la masse molaire de l'acide (g/mol),

E le volume d'acide concentré à diluer (unité de volume : l, ml ou autre),

U le volume total d'acide dilué (même unité de volume que E : l ml ou autre).

On a

$$C_0 = \frac{d \times \%}{M} \times 1000$$

$$C' = C_0 \times \frac{E}{U}$$

D'où E, le volume d'acide à diluer :

$$E = \frac{C'}{U} \times \frac{M}{d \times \% \times 1000}$$

Pour connaître le volume V de solvant (eau milliQ ; $R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) :

$$V = U - E$$

NITRATE DE POTASSIUM $30 \mu\text{M/L}$:

Diluer $1500 \mu\text{l}$ de la solution mère à 10 mmol/l (voir plus loin) dans une fiole de 500 ml ; compléter avec de l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$)

- Préparation ou cupérisation du cadmium

Tamiser le cadmium en grains pour garder la fraction comprise entre $0,9 \text{ mm}$ et $0,56 \text{ mm}$ de diamètre. La tamisage peut se faire soit manuellement soit mécaniquement à l'aide d'un vibreur électrique du type Analysette FRISCH (modèle 03.502). Eliminer la fraction fine ($< 0,56 \text{ mm}$) et la fraction grossière ($> 0,9 \text{ mm}$).

Mettre environ 50 g de cadmium en grains dans un erlenmeyer à col rodé (flacon en verre de 100 ml utilisé pour les dosages d'oxygène) et ajouter 90 ml d'HCl (2 mol/l). Attendre la disparition du dégagement gazeux puis boucher et agiter. Rincer plusieurs fois à l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$).

Laver rapidement le cadmium en grains avec 90 ml d' HNO_3 ($0,3 \text{ mol/l}$) puis rincer abondamment à l'eau milliQ.

Relaver le cadmium avec 90 ml d'HCl (2 mol/l) pour chasser les ions nitrates restant puis rincer à l'eau milliQ. Renouveler une fois l'opération.

Traiter le cadmium en grains avec 100 ml de la solution de sulfate de cuivre à 2% puis boucher hermétiquement l'eren. Agiter vigoureusement jusqu'à ce que la solution du cuivre vire du bleu au noir. *Après cette étape, ne jamais mettre en contact direct avec l'air le cadmium traité.*

Laver abondamment le cadmium en grain à l'eau milliQ par débordement de l'eren, boucher et agiter vigoureusement. Renouveler l'opération autant de fois que nécessaire, jusqu'à disparition totale des particules fines en suspension.

Conserver le cadmium ainsi traité dans une solution de chlorure d'ammonium à 10 g/l à 4°C .

- Remplissage et traitement de la colonne

Couper un tube plastique (Tygon ; calibré 2 mm diamètre intérieur) de 19 cm de long.

A l'aide d'une seringue de 10 ml , remplir la totalité de la colonne de NH_4Cl à 10 g/l sans laisser de bulles d'air. Boucher à 1 cm d'une extrémité avec de la laine de verre et tenir fermement le tube avec une pince de Mohr. Mettre un petit entonnoir à l'autre extrémité et suspendre la colonne sur un statif ; remplir l'entonnoir de la solution de NH_4Cl (Fig. 8). Transférer avec une spatule remplie d'une solution

de NH_4Cl (10g/l), le cadmium en grain dans la colonne jusqu'à ce qu'elle soit remplie sur une hauteur de 16cm. Pour faire descendre plus facilement les grains de Cd, pincer la colonne et la faire rouler entre les doigts. Boucher le sommet de la colonne avec de la laine de verre. Replier les deux extrémités et fermer par un "nipple"., Les colonnes se conservent ainsi si elles sont stockées dans une solution de NH_4Cl sans contact avec l'air.

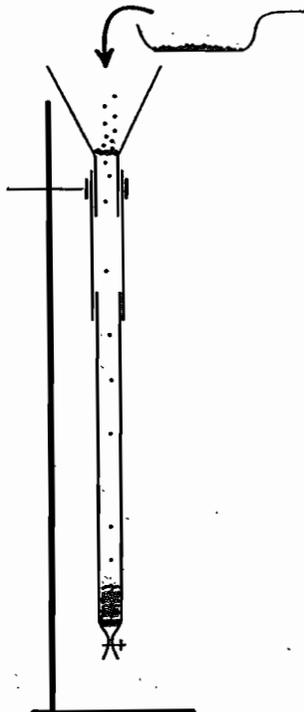


Fig. 8 : Réalisation d'une colonne réductrice Cd-Cu

- Utilisation et entretien

Définir sur la colonne un sens d'orientation du flux symbolisé par une flèche. Avant d'effectuer les premières analyses, il est nécessaire de stabiliser le rendement de la colonne. Pour cela, brancher la colonne dans le circuit analytique et faire passer une solution de nitrates à $30\mu\text{M}$ pendant une demi heure puis rincer avec de l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$) pendant au moins $\frac{1}{4}$ d'heure. Avant de brancher la colonne, vérifier que le flux circule bien dans le circuit analytique. Après chaque série d'analyse, rincer la colonne avec la solution de chlorure d'ammonium pendant au moins $\frac{1}{4}$ d'heure. Lors du débranchement, sous un flux d' NH_4Cl constant, déconnecter en premier la sortie de la colonne puis mettre le "nipple" et fermer sur l'entrée.

La colonne réductrice permet l'analyse de 500 échantillons environ. Utiliser une colonne différente pour chaque gamme de dosage (voir plus loin).

2.4 Analyses de concentrations micromolaires

- Domaine d'application

Au laboratoire de Chimie Marine, la méthode de dosage proposée par Tréguer et al. (1975) est utilisée pour la mesure de concentrations variant de 1 à $35\mu\text{mol/l}$. Pour une concentration moyenne de $10\mu\text{mol/l}$, l'incertitude de la mesure est de $\pm 0,02\mu\text{mol/l}$ avec un intervalle de confiance de 95%. La limite de détection est fixée à $0,05\mu\text{mol/l}$.

- Réactif

Tous les produits chimiques utilisés ici sont de qualité dit "analytique" sauf indication contraire. Une fois préparé, tous les réactifs sont stockés dans des flacons plastique opaque (Nalgène) et conservé à 4°C lorsqu'ils ne sont pas utilisés.

REACTIF 1 (R1) :

Dans une fiole de 500ml, dissoudre 10g de sulfanilamide dans 300ml d'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$). Ajouter *avec précaution* 100ml d'HCl fumant puis ajuster avec de l'eau milliQ jusqu'au trait de jauge. Agiter jusqu'à dissolution totale. Ajouter 0,5ml de réactif de Briard (tensio actif ou agent mouillant permettant un meilleur mélange entre les réactifs et l'eau de mer). La solution peut être conservée un mois.

REACTIF 2 (R2) :

Dans une fiole de 500 ml, mettre 2g de N-naphtyléthylène diamine. Ajuster jusqu'au trait de jauge avec de l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$) et agiter jusqu'à dissolution. Le réactif est stable un mois.

REACTIF 3 (R3) :

Peser 20g de chlorure d'ammonium à dissoudre dans 2l d'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$). Tamponner à pH 8,5 avec de l'ammoniac (environ 3,5ml). La solution peut être conservée un mois.

EAU DE REFERENCE (REF) :

Eau de mer naturelle appauvrie en sels nutritifs ou, à défaut, de l'eau de mer synthétique (solution de NaCl, 35g/l).

SOLUTION ETALON A 10MMOL/L :

Peser précisément 1,0112g de nitrate de potassium à dissoudre dans 1l d'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$). Pour une conservation longue durée, ajouter à cette solution 1ml de chloroforme et la stocker dans un flacon en Nalgène à 4°C .

- Montage

Le circuit analytique pour le dosage des nitrates à des concentrations micromolaires est schématisé à la figure 9. Les débits des tubes de pompes sont donnés en ml/min.

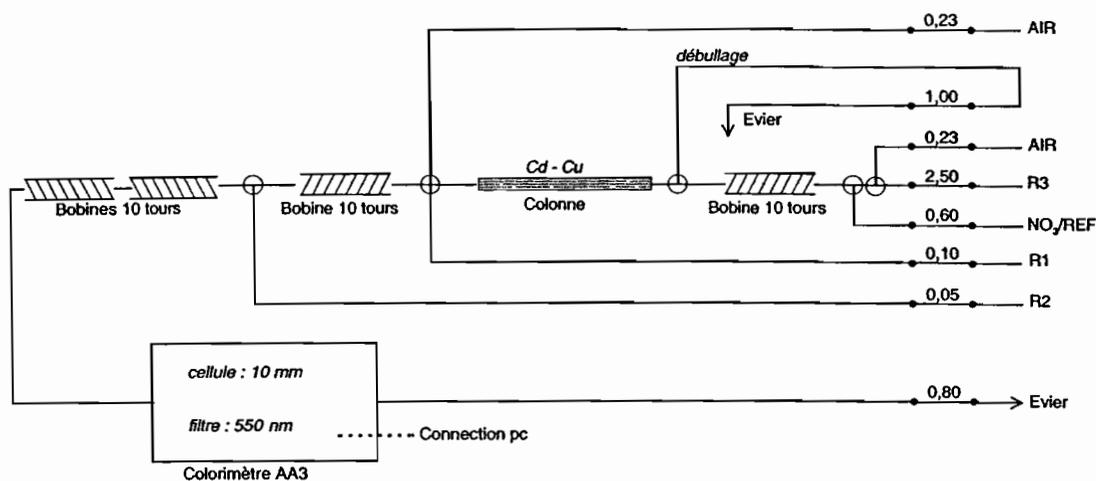


Fig. 9 : Manifold pour le dosage des nitrates en concentration micromolaires.

- Mesures

Les standards sont préparés à partir d'une solution mère de nitrate de potassium à 10mmol/l de la façon suivante :

[NO ₃] (μMOL/L)	5	10	20	25	30
V PIPETE (μL)	50	100	200	250	300
V FIOLE (ML)	100	100	100	100	100

Le volume des fioles est ajusté avec de l'eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm⁻¹) fraîchement déionisée.

Taux d'acquisition : 1 échantillon toutes les 3 minutes (90s pour l'analyse sur l'échantillon et 120s pour le rinçage du circuit par l'eau de référence).

L'analyse nécessite de 5ml d'échantillon et 3x5ml pour le rinçage soit un minimum de 20ml d'eau de mer. Cependant, dans la mesure du possible, il reste préférable de prélever directement dans le flacon d'échantillonnage (flacon HDPE, col large, 60ml, 38x86 mm, 60ml).

3. PHOSPHORE ORGANIQUE DISSOUS ET PARTICULAIRE

3.1 Principe

La méthode utilisée pour le dosage des orthophosphates a été mise au point par Murphy et Riley (1962). En milieu acide (pH<1), les ions phosphates réagissent avec le molybdate d'ammonium pour former un complexe jaune : le phosphomolybdate d'ammonium. Cette réaction décrite par Deniges (1920) reste encore mal connue ; l'hétéropolyanion ainsi formé aurait probablement pour formule chimique (NH₄)₃P(Mo₃O₁₀)₄. Ce complexe chimique est ensuite réduit par l'acide ascorbique. L'addition d'antimoine comme catalyseur réduit le temps de développement de la réaction de 24

heures à quelques minutes. Le composé bleu ainsi formé contient le phosphore, le molybdène et l'antimoine dans les proportions atomiques P/Mo/Sb : 1/12/1. La densité optique, indépendante de la salinité, suit la loi de Lambert-Beer. Le maximum d'absorption est mesuré à 885nm.

Parmi les anions susceptibles de former des complexes avec le molybdène, les arsénates donnent l'interférence la plus prononcée. Mais, compte tenu des très faibles concentrations rencontrées et de la lente cinétique, ces interférences sont négligeables (Murphy et Riley, 1962). Les nitrites en grandes concentrations peuvent également intervenir. Parmi les éléments métalliques, le cuivre en concentration supérieure à 500 μ g/l peut également perturber la méthode. Enfin, une réaction avec les polyphosphates peut être envisagée si la température du milieu réactionnel est supérieure à 30°C (Souhay, 1969).

3.2 Matériel employé

- Appareillage

Au laboratoire de Chimie Marine, nous utilisons un Autoanalyzer III (Bran+Luebbe). La chaîne d'analyse est équipée des modules suivants :

- échantillonneur XYZ, dont les plateaux ont été modifiés pour recevoir des flacons de 60 ml (38x86 mm) ;
- pompe péristaltique ;
- plateau manifold ;
- colorimètre numérique deux voies (longueur de cuve : 10mm)
 - . filtre optique $\lambda = 880\text{nm}$; ref : 112+0001-88 (sans support) ou 165+B044-88 (avec support)
 - . détecteur ; ref : 169+B141-01
- PC + logiciel acquisition de donnée "AACE".

Pour avoir un signal stable et reproductif, il est conseillé d'allumer tous les appareils de la chaîne analytique au moins une heure avant utilisation afin de laisser le temps aux lampes et composants électroniques de chauffer.

- Réactifs chimiques

PRODUIT	FORMULE CHIMIQUE	Fournisseur	REFERENCE
Oxytartrate d'antimoine et de potassium	$K(SbO)C_4H_4O_6, 1/2H_2O$	Merck, P.A.	8092
L-Acide ascorbique	$(HOOCCH_2)_2CH(COOH)$	Sigma, Ultra	A-5960
Acide sulfurique 95% (d=1,83)	H_2SO_4	Prolabo, P.A.	20 700.298
Heptamolybdate d'ammonium	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}, 4H_2O$	Merck, P.A.	1182.1000
Dihydrogénophosphate de potassium	KH_2PO_4	Merck, suprapur	1.05108.0050
Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) - Lauryl	$C_{12}H_{25}O_4SNa$	Sigma	L-4509
Acétone	$(CH_3)_2O$	Prolabo, P.A.	20 066.296

3.3 Modalité du dosage

- Préparation des réactifs

SOLUTION D'ANTIMOINE, PREPARATION POUR 100ML			
Oxytartrate d'antimoine et de potassium	→	2,3g	
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	compléter à 100ml	
REACTIF 1 (R1), PREPARATION POUR 1000ML			
L-acide ascorbique	→	8g	
Lauryl (SDS)	→	8g	
Acétone	→	45ml	
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	compléter à 1000ml	
REACTIF 2 (R2), PREPARATION POUR 1000ML			
Heptamolybdate d'ammonium	→	6g	
Acide sulfurique (d=1,83)	→	64ml	
Solution d'antimoine	→	22ml	
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	compléter à 1000ml	
SOLUTION MERE (SM), 1MMOL/L			
Dihydrogénophosphate de potassium	→	0,1362g	
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	compléter à 100ml	
Chloroforme	→	1ml	

SOLUTION D'ANTIMOINE

Dissoudre 2,3g d'oxytartrate d'antimoine et de potassium dans 100ml d'eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm⁻¹). Agiter énergiquement. Cette solution est stable pendant plusieurs mois.

REACTIF 1 (R1) :

Dans une fiole de 1l, dissoudre 8g de L-acide ascorbique avec 600ml d'eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm⁻¹). Ajouter 45ml d'acétone et 8g de SDS. Compléter la fiole jusqu'au trait de jauge avec de l'eau milliQ puis agiter vigoureusement. La solution doit être transférée dans un flacon en polypropylène noir ; en

dehors de son utilisation au technicon, elle est stockée à 4°C. Ainsi conditionnée, elle peut être conservée pendant une semaine.

REACTIF 2 (R2) :

Dans une fiole de 1l, diluer avec une extrême précaution 64ml d'acide sulfurique dans 500ml d'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$). Ajouter 6g d'heptamolybdate d'ammonium, mélanger puis ajouter 22ml de la solution d'antimoine. Compléter à 1l avec de l'eau milliQ puis agiter. Le réactif ainsi préparé doit être totalement incolore. Pour cela, l'heptamolybdate d'ammonium utilisé doit être parfaitement blanc sans aucune teinte verdâtre. La solution ainsi préparée est transférée dans un flacon en polypropylène noir ; en dehors de son utilisation au technicon, elle est stockée à 4°C. Elle peut être conservée un mois.

Remarque importante 1 : Les acides concentrés sont des produits fortement corrosifs, il est indispensable de les manipuler avec la plus grande précaution. Toute manipulation doit se faire sous une hotte ; le manipulateur doit impérativement porter blouse et lunette. En cas de brûlure sur n'importe quelle partie du corps, il faut immédiatement rincer la zone atteinte à grande eau pendant ¼ d'heure même si la sensation d'échauffement disparaît rapidement. Les acides ont la capacité de pénétrer profondément dans les tissus ce qui peut alors induire de sérieuses lésions internes. Si l'accident semble important, il faut consulter un médecin.

Remarque importante 2 : Les acides sont des produits exothermiques c'est à dire que lorsqu'ils sont en contact avec un autre composé, la réaction qui se produit libère une forte chaleur. Pour toute dilution, il faut impérativement la faire en *versant lentement l'acide dans l'eau et non le contraire*. Ainsi la goutte d'acide qui tombera dans de l'eau sera automatiquement diluée et l'effet d'échauffement sera moindre. Si la température du milieu dilué devient trop importante, il faut arrêter l'addition d'acide et le faire refroidir par un bain d'eau et/ou de glace. L'addition d'acide supplémentaire pourrait conduire à un échauffement excessif et produire des projections de réactif autour de la zone de travail.

Remarque 3 : Dans le commerce, les acides concentrés sont tous appelés acides "purs" ou "fumants". Mais, selon la densité (d) et l'indice de pureté (%) du produit donnés par le fabricant, la concentration molaire peut varier même au sein d'acides "fumants" d'une même famille. Aussi si les caractéristiques (d et %) des acides ne sont pas rigoureusement les mêmes que celles utilisées au laboratoire de Chimie Marine, il est nécessaire de faire des corrections pour les volumes à mettre en œuvre.

A partir d'une solution commerciale, le calcul se fait de la façon suivante :

Soit d la densité de l'acide concentré,

% le degré de pureté du produit,

C_0 la concentration de l'acide commercial (mol/l),

C' la concentration de l'acide dilué (mol/l),

M la masse molaire de l'acide (g/mol),

E le volume d'acide concentré à diluer (unité de volume : l, ml ou autre),

U le volume total d'acide dilué (même unité de volume que E : l ml ou autre).

$$C_0 = \frac{d \times \%}{M} \times 1000$$

$$C' = C_0 \times \frac{E}{U}$$

D'où E, le volume d'acide à diluer :

$$E = \frac{C'}{U} \times \frac{M}{d \times \% \times 1000}$$

EAU DE REFERENCE (REF) :

Eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$)

SOLUTION ETALON A 1MMOL/L :

Peser précisément 0,1362g de dihydrogénophosphate de potassium et dissoudre dans 1l d'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$). Pour une conservation longue durée, ajouter à cette solution 1ml de chloroforme et la stocker dans un flacon en polypropylène (Nalgène) à 4°C.

- Montage

Le circuit analytique pour le dosage des phosphates est représenté à la figure 10. Les débits des tubes de pompes sont donnés en ml/min

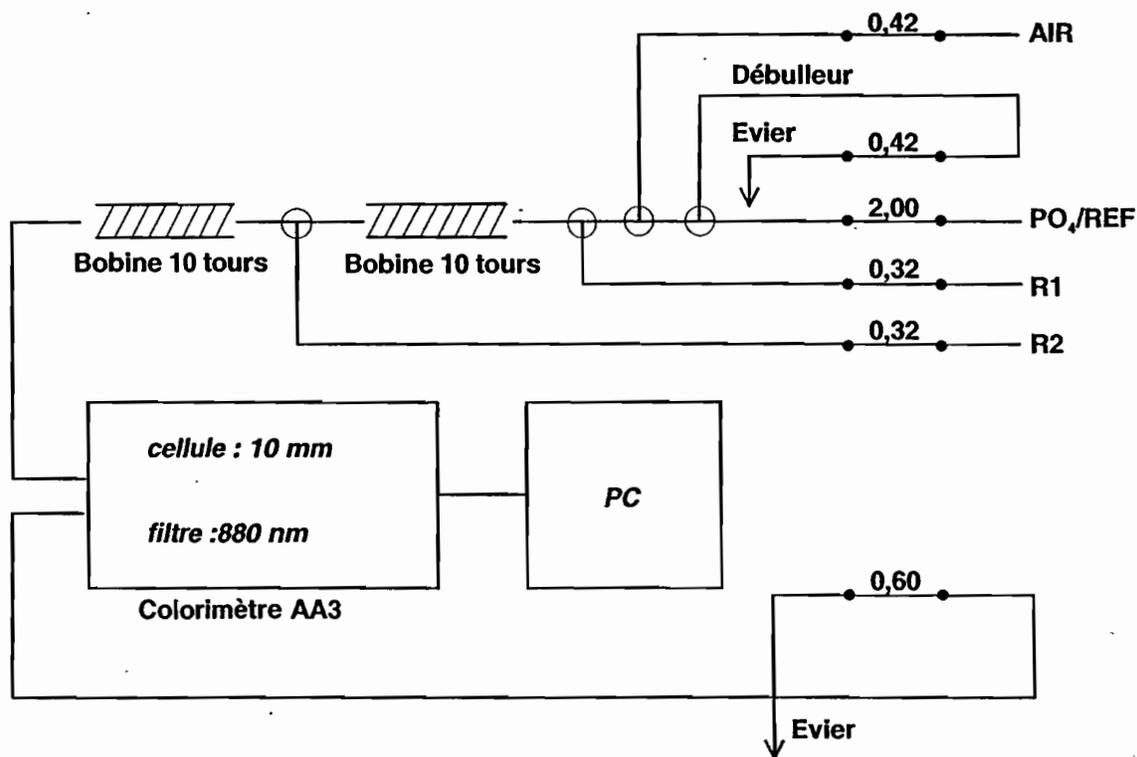


Fig. 10 : Manifold pour le dosage des phosphates.

- Mesures

Au laboratoire de Chimie Marine (IRD - Nouméa), nous travaillons généralement sur une gamme de concentrations de 0,5 à 5 $\mu\text{mol/l}$ P- PO_4 pour les échantillons des lagons de Nouvelle Calédonie et Fidji.

NOUVELLE CALEDONIE					
[PO_4] ($\mu\text{mol/l}$)	0,5	1	2	3	5
V _{SM} (μl)	50	100	200	300	500

Les standards sont tous préparés à partir de la solution mère dans des fioles de 100ml et ajustés avec de l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$).

Taux d'acquisition : 1 échantillon toutes les 3 minutes (90s pour l'analyse sur l'échantillon et 120s pour le rinçage du circuit par l'eau de référence).

L'analyse nécessite en théorie un minimum de 5ml d'échantillon mais compte tenu des problèmes de pollution, il est conseillé de travailler sur des quantités au moins 10 fois plus grandes. La meilleure solution reste le prélèvement direct dans le flacon qui a servi à l'échantillonnage.

- Domaine d'application

Le domaine de concentrations mesurable est très étendu. : de 0 à 28 $\mu\text{mol/l}$ (Koroleff, 1976). Selon Riley et al. (1972), la relation de Lambert-Beer serait même linéaire jusqu'à 70 $\mu\text{mol/l}$. La limite de détection est de 0,02 $\mu\text{mol/l}$ avec un intervalle de confiance de 95% sur la gamme de 0 à 3 $\mu\text{mol/l}$.

4. ETALONNAGE & CALCULS

L'étalonnage (intensité du signal I en fonction de la concentration C) montre qu'il existe une relation linéaire de type :

$$I = a \times C + b \text{ où } a \text{ est la pente de la droite et } b \text{ l'ordonnée à l'origine}$$

Pour un échantillon donné λ , l'intensité du signal sera I_λ . Sa concentration pourra alors être calculé de la façon suivante :

$$C_\lambda = \frac{I_\lambda - b}{a}$$

Soit [NOD] et [POD], les concentrations respectives en azote et phosphore organique dissous ;

[NO₃]_t et [PO₄]_t, les concentrations respectives en nitrates et phosphates mesurées après oxydation au persulfate ;

[NO₃]_i et [PO₄]_i, les concentrations respectives en nitrates et phosphates mesurées directement dans l'eau de mer.

$$[\text{NOD}] = [\text{NO}_3]_t - [\text{NO}_3]_i$$

$$[\text{POD}] = [\text{PO}_4]_t - [\text{PO}_4]_i$$

Soit [NOP] et [POP], les concentrations respectives en azote et phosphore particulaire ;

[NO₃]_t et [PO₄]_t, les concentrations respectives en nitrates et phosphates mesurées après oxydation au persulfate ;

V₁, le volume d'eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm⁻¹) utilisé lors de l'oxydation au persulfate (ml) ;

V₂, le volume d'eau de mer filtré (ml).

$$[\text{NOP}] = [\text{NO}_3]_t \times \frac{V_1}{V_2}$$

$$[\text{POP}] = [\text{PO}_4]_t \times \frac{V_1}{V_2}$$

VI. CARBONE & AZOTE ORGANIQUE PARTICULAIRE

Le phytoplancton se trouve à la base de la chaîne alimentaire marine et, conformément à la structure de la pyramide trophique, il constitue nécessairement l'essentiel de la biomasse vivante présente dans les océans. Les teneurs et la composition du matériel particulaire sont variables. En zone oligotrophe, la contribution du phytoplancton est faible (entre 20 et 50%). Elle peut atteindre 90% dans les zones à haute productivité où la fraction détritique est plus réduite. Mesurées en équivalent carbone, les teneurs de COP (carbone organique particulaire) varient de quelques dizaines à quelques centaines de microgrammes de carbone par litre dans les eaux plus riches. Là encore, il s'agit de doser la matière organique à l'état de traces. Il est nécessaire d'opérer avec soin et de manipuler à l'abri des contaminations.

1. PRINCIPE

Différentes méthodes d'analyses du carbone organique particulaire peuvent être choisies en fonctions des contraintes de travail (rapidité d'analyses, précision, moyens financiers...). Parmi les plus utilisées : le dosage du COP par voie humide (oxydation au persulfate) est une méthode simple, peu coûteuse et applicable à bord de navires océanographique ; la combustion de la matière organique par l'oxygène suivi d'un dosage de dioxyde de carbone par un analyseur de type CHN est beaucoup plus sensible mais nécessite un matériel plus perfectionné, plus lourd et plus onéreux. Pourtant, depuis une vingtaine d'année cette dernière technique c'est largement répandue.

Elle reprend le principe de la chromatographie en phase gazeuse. L'échantillon de matière organique particulaire subit une combustion à haute température (Fig. 11).

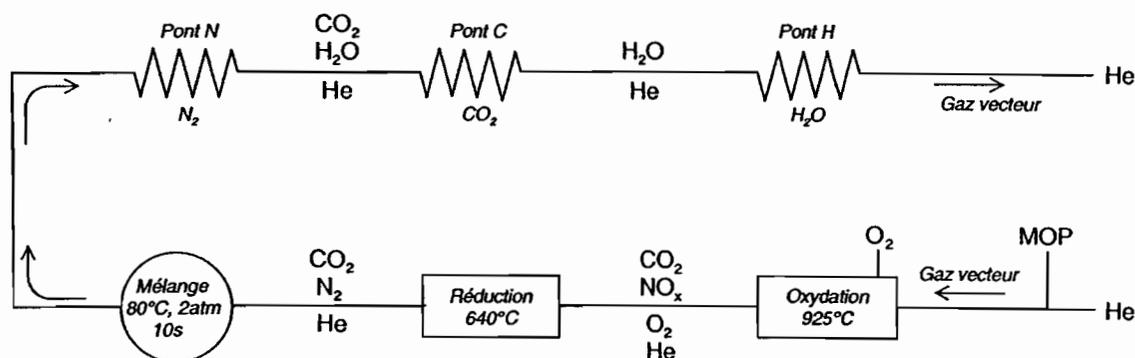


Fig 11: Fonctionnement général d'un analyseur CHN.

L'hélium est un gaz inerte qui est utilisé dans ce procédé comme gaz vecteur. L'échantillon est introduit par gravité dans une première colonne de combustion. A la sortie, les gaz formés sont entraînés vers une deuxième colonne pour être réduit sous forme élémentaire en dioxyde de carbone et azote. Après être passés dans une chambre de mélange pour permettre un certain refroidissement, ils sont entraînés vers 3 détecteurs conductimétriques montés en série : le premier captant l'azote, le second le dioxyde de carbone et le troisième l'hydrogène.

2. MATERIEL EMPLOYE

2.1 Appareillage

Au laboratoire de Chimie Marine, nous utilisons un CHN Perkin Elmer 2400. Pour plus d'information technique, se référer aux manuels de l'appareil.

2.2 Réactifs chimiques

PRODUIT	FOURNISSEUR	REFERENCE
EA-1000 Reagent	Perkin Elmer	N241-0092
Silver tungstate on magnesium oxide	Perkin Elmer	0240-1344
Silver Vanadate	Perkin Elmer	0240-1117
Quartz wool	Perkin Elmer	0240-1118
Silver gauze	Perkin Elmer	N241-0145
Copper plus	Perkin Elmer	0240-0117
Cuprox	Perkin Elmer	0240-1092

3. MODALITE DU DOSAGE

3.1 Collecte du matériel particulaire

Le matériel particulaire est collecté par filtration sur des filtres Whatman GF/F (porosité $0,7\mu$, diamètre 25mm) préalablement traités par calcination à 450°C pendant 2 heures. Le filtre est plié en deux puis déposé sur une feuille de papier d'aluminium épaisse (150 X 200mm) préalablement calcinées à 450°C pendant 2 heures. L'ensemble est placé dans une étuve à 50°C . Une fois sèches, la feuille de papier d'aluminium est pliée ; l'échantillon est ainsi stocké dans un dessiccateur jusqu'à l'analyse.

Les quantités d'eau de mer filtrées dépendant de la concentration en matière en suspension. Dans les eaux de Nouvelle Calédonie, nous filtrons généralement 1l d'eau de mer ; dans le lagon fidjien, nous filtrons entre 0,5 et 0,75l d'eau de mer.

3.2 Préparation du matériel

L'échantillon ainsi récolté est susceptible de contenir des traces de carbone minéral sous formes de carbonates. Afin d'éviter tous risques de contamination, il est nécessaire de faire un pré traitement des filtres avant analyse. Les filtres sont placés dans une enceinte fermée, sous légère dépression, autour d'une coupelle de laboratoire contenant une vingtaine de milli litre d'acide chlorhydrique fumant pendant 2 heures. Les carbonates sont alors volatilisés sous forme de dioxyde de carbone. Selon sa qualité, la feuille d'aluminium peut également être attaquée par les vapeurs d'acide ; il sera donc nécessaire de la changer.

Le matériel utilisé doit être exempt de traces organiques. Comme la préparation requiert un travail manuel, la décontamination du matériel se fait soit par calcination à 450°C pendant deux heures soit par un nettoyage à l'alcool. L'espace de travail doit être parfaitement propre ; il est couvert d'une feuille de papier d'aluminium prétraité à 450°C pendant 2 heures. Celle-ci est changée plusieurs fois par jours.

- Nacelles de pesée : Découper à l'emporte pièce, sur du papier aluminium ordinaire (qualité alimentaire), des cercles de 26 mm de diamètre. Plier chaque pièce à l'extrémité d'une baguette (diamètre 3 à 4 mm) de façon à former une petite nacelle. Mettre ces nacelles dans une barquette aluminium puis l'ensemble à 450°C pendant 2h. Laisser refroidir et stocker dans un dessiccateur.
- Accessoires de laboratoire : Nettoyer les pinces et spatules de pesée à l'alcool. Nettoyer le carrousel supportant les échantillons à l'eau milliQ et sécher les à l'air comprimé.

- Remplissage des colonnes

Le remplissage et le montage des colonnes sont représentés à la figure 12 .

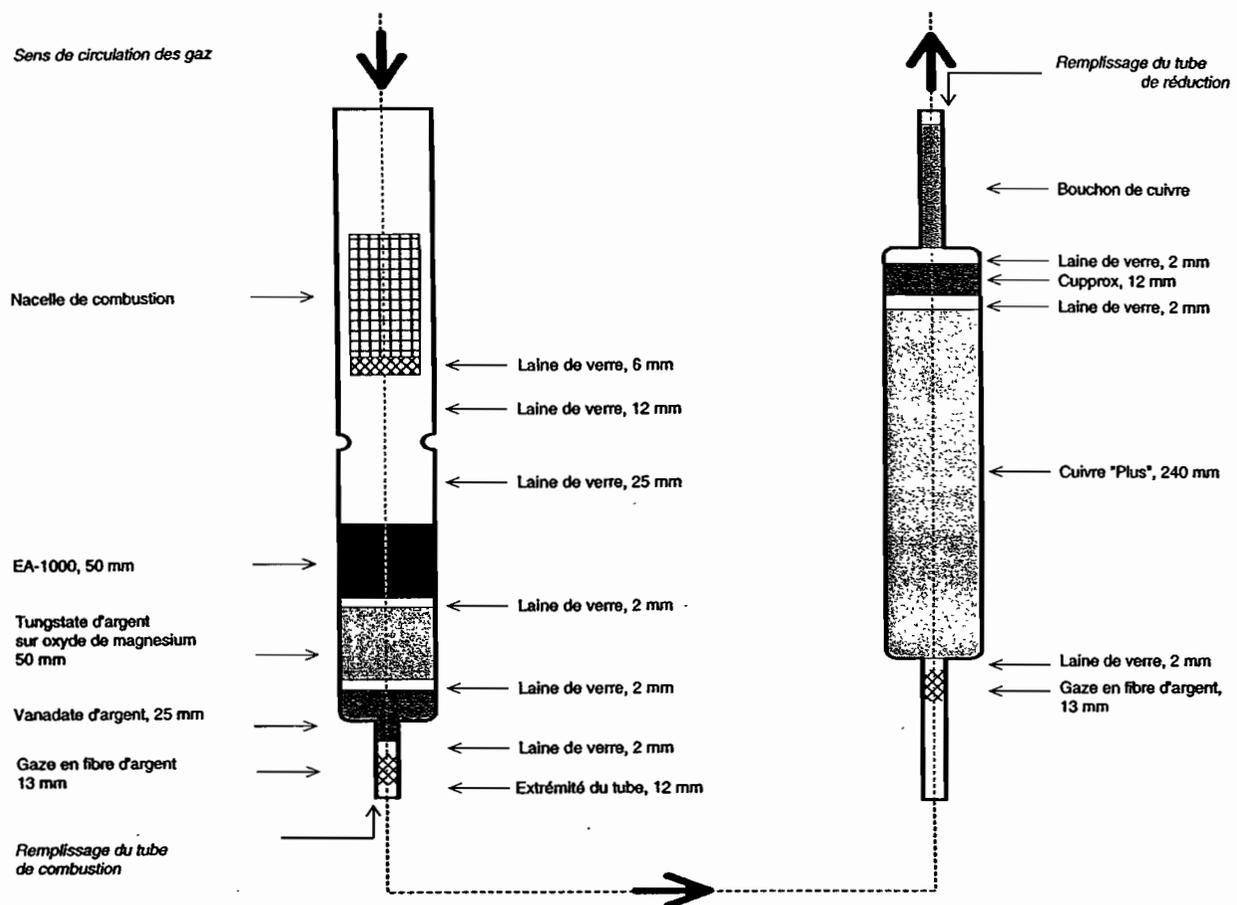


Fig. 12 : Colonnes d'oxydation et de réduction montées sur le CHN PE2400

3.3 Modalité du dosage

Les mesures sont effectuées automatiquement sur le CHN PE2400. L'étalonnage est établi à partir d'analyse de plusieurs échantillons d'acétanilide. Les valeurs de carbone, d'hydrogène et d'azote doivent être les suivantes : C = 71.09 %, H = 6.71 %, N = 10.36 %. K est le coefficient d'étalonnage ; il correspond au rapport entre l'intensité du signal de chacun de ces éléments et la quantité de matière analysée. Pour chacun de ces 3 paramètres, la reproductibilité du facteur k doit être de l'ordre de : ± 0.15 pour le carbone, ± 3.75 pour l'hydrogène et ± 0.16 pour l'azote. La reproductibilité des blancs d'analyse doit être comprise entre : ± 30 pour le carbone, ± 100 pour l'hydrogène et ± 16 pour l'azote.

4. ETALONNAGE & CALCULS

Soient X un élément donné : le carbone, l'hydrogène ou l'azote ;

I_x : l'intensité du signal de l'élément X ;

Bl_n_x : l'intensité du signal d'un blanc de l'élément X ;

K_x : le facteur d'étalonnage de l'élément X ;

V : volume d'eau de mer filtré (ml).

La quantité de chaque élément rapporté à un litre d'eau de mer s'exprime de la façon suivante :

$$X_{\text{tot}} (\mu\text{g/l}) = \frac{(I_x - Bl_n_x)}{K_x} \times \frac{1000}{V}$$

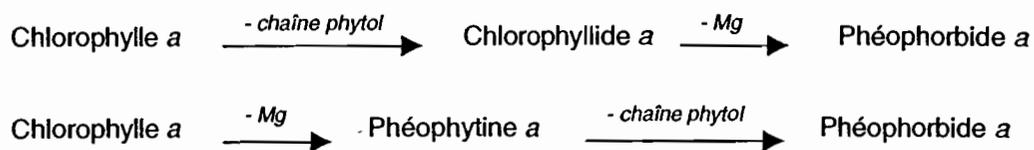
Soit M_x : la masse molaire de l'élément X ($M_C = 12.01\text{g/mol}$, $M_H = 1.01\text{g/mol}$, $M_N = 14.01\text{g/mol}$)

Les concentrations molaires de chaque élément peuvent donc se calculer de la façon suivante :

$$X_{\text{tot}} (\mu\text{mol/l}) = \frac{(I_x - Bl_n_x)}{K_x} \times \frac{1000}{V} \times \frac{1}{M_x}$$

VII. CHLOROPIGMENTS

La chlorophylle est un pigment indispensable à la photosynthèse des algues. Le dosage de ce composé sert donc à estimer la biomasse phytoplanctonique du milieu marin. Un des principaux problèmes de cette analyse réside dans la spéciation du pigment. En effet la chlorophylle (Fig. 13) est une molécule complexe qui génère de nombreux sous produits dont les spectres d'absorption sont presque tous similaires les uns aux autres. Selon Yentsch (1965), la dégradation de la chlorophylle se schématise de la façon suivante :



Bien que certains auteurs aient reporté la présence de chlorophyllide en milieu marin (Barret et Jeffrey, 1964 ; Jeffrey, 1974), il semble que les principaux produits de dégradation soient la phéophytine et la phéophorbide. Ces composés sont regroupés sous le nom de phéopigments.

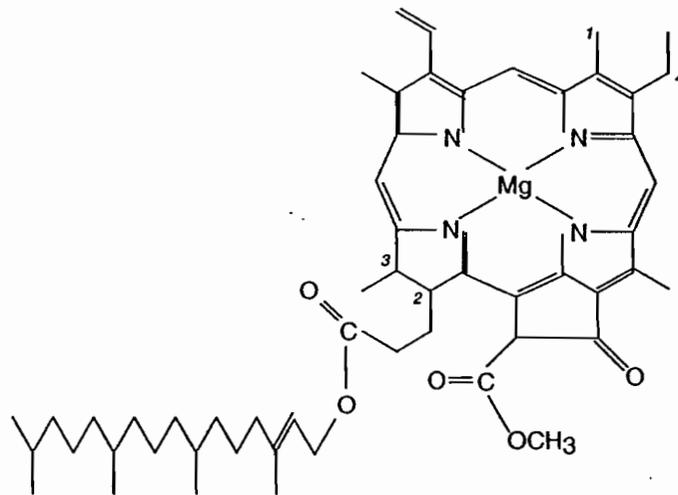


Fig. 13 : Formule semi développée plane de la chlorophylle a (Neveux, 1973)

- Chlorophylle b : comme la chlorophylle a mais en position 1, une fonction aldéhyde (-CHO) à la place du radical méthyle (-CH₃),
- Chlorophylle c₁ : comme la chlorophylle a mais un groupe acide acrylique (-CH=CH-COOH) au lieu du propionate estérifié en position 2, disparition du radical méthyle en position 3 remplacée par une double liaison entre 2 et 3,
- Chlorophylle c₂ : comme la chlorophylle c₁ mais en position 4 un radical vinyle (-CH=CH₂) au lieu du radical éthyle (-CH₂-CH₃).

1. PRINCIPE

Deux méthodes sont généralement utilisées pour le dosage de la chlorophylle : la spectrophotométrie et la fluorométrie. Le principal intérêt de la méthode fluorométrique (Yentsch et *al.*, 1963 ; Holm-Hansen et *al.*, 1965 ; Lorenzen, 1966) par rapport à la spectrophotométrie est sa plus grande sensibilité. Elle permet de traiter également des échantillons de volume plus réduit (0,1 à 1l contre 5 à 10l pour la méthode spectrophotométrique), ce qui représente un gain de temps appréciable. De plus, la mesure se fait par lecture directe à une seule longueur d'onde.

Après filtration d'un certain volume d'eau de mer pour concentrer le phytoplancton, le filtre est immergé dans un solvant qui assure l'extraction des pigments chlorophylliens. Ils sont ensuite excités par un faisceau lumineux à 450nm et la fluorescence émise est mesurée à 670nm. Sur chaque extrait, la mesure de fluorescence est effectuée deux fois, avant et après acidification. La diminution de fluorescence observée entre ces deux lectures est en relation avec le pourcentage relatif de chlorophylle *a* par rapport à la somme chlorophylle *a* + phéophytine *a*.

2. MATÉRIEL EMPLOYÉ

2.1 Appareillage

Au laboratoire de Chimie Marine, nous utilisons un fluorimètre Turner Designs TD700 équipé d'un kit optique n°7000-961 comprenant :

- lampe de lumière bleue F4T5 dont le spectre d'émission varie de 360 à 600nm (réf : 10-045),
- filtre d'excitation $\lambda_{ex} = 340-500$ nm (réf : 10-050R),
- filtre d'émission $\lambda_{em} > 665$ nm (réf : 10-051R),

Pour avoir une lecture fiable, il est conseillé d'allumer l'appareil au moins une heure avant son utilisation. Tant que les filtres et la lampe n'ont pas été manipulés, l'étalonnage n'a pas besoin d'être refait systématiquement à chaque fois que l'appareil est éteint. Le dernier étalonnage est gardé en mémoire.

2.2 Réactifs chimiques

PRODUIT	FORMULE CHIMIQUE	FOURNISSEUR	REFERENCE
Chlorophylle a commerciale, 1mg	Voir Fig. 1	Sigma	C5753
Acide chlorhydrique 36%, d=1,18	HCl	Prolabo, P.A.	20 252.290
Méthanol	CH ₃ OH	Prolabo, P.A.	20846.554

3. MODALITÉS DU DOSAGE

La méthode fluorométrique utilisée ici a été adaptée à partir de celle proposée par Yentsch et *al.* (1963). C'est une méthode simple et rapide qui permet de déterminer sélectivement des faibles concentrations de chlorophylle *a* (Chl *a*) et phéophytine *a* (Pheo *a*).

3.1 Réactifs

ACIDE CHLORHYDRIQUE, 0,3 MOL/L		
HCl, d=1,18	→	2,5ml
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	Compléter à 100ml
METHANOL, 93%		
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	70ml
Méthanol absolu	→	Compléter à 1000ml
METHANOL, 95%		
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	50ml
Méthanol absolu	→	Compléter à 1000ml

Avec cette méthode d'analyse, les contaminations d'échantillons sont extrêmement rares. La verrerie utilisée ne nécessite pas de nettoyage particulier ; il suffit qu'elle soit soigneusement rincée trois fois avec de l'eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm⁻¹). Toutefois, au laboratoire de Chimie Marine, l'utilisation fréquente des lavages à l'acide chlorhydrique peut poser des problèmes pour l'analyse de la chlorophylle. Il faut s'assurer que toute la verrerie est débarrassée des traces d'HCl.

- Acide chlorhydrique (0,3 mol/l)

Une solution d'HCl à 0,3mol/l est préparée de la façon suivante : verser lentement et avec précaution 2,5ml d'HCl fumant (d=1,18) dans 100ml d'eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm⁻¹) (et non le contraire !)

Remarque importante 1 : Les acides concentrés sont des produits fortement corrosifs, il est indispensable de les manipuler avec la plus grande précaution. Toute manipulation doit se faire sous une hotte ; le manipulateur doit impérativement porter blouse, et lunette. En cas de brûlure sur n'importe quelle partie du corps, il faut immédiatement rincer la zone atteinte à grande eau pendant ¼ d'heure même si la sensation d'échauffement disparaît rapidement. Les acides ont la capacité de pénétrer profondément dans les tissus ce qui peut alors induire de sérieuses lésions internes. Si l'accident semble important, il faut consulter un médecin.

Remarque importante 2 : Les acides sont des produits exothermiques c'est à dire que lorsqu'ils sont en contact avec un autre composé, la réaction qui se produit libère une forte chaleur. Pour toute dilution, il faut impérativement la faire en *versant lentement l'acide dans l'eau et non le contraire*. Ainsi la goutte d'acide qui tombera dans de l'eau sera automatiquement diluée et l'effet d'échauffement sera moindre. Si la température du milieu dilué devient trop importante, il faut arrêter l'addition d'acide et le faire refroidir par un bain d'eau et/ou de glace. L'addition d'acide supplémentaire pourrait conduire à un échauffement excessif et produire des projections de réactif autour de la zone de travail.

Remarque 3 : Dans le commerce, les acides concentrés sont tous appelés acides "purs" ou "fumants". Mais, selon la densité (d) et l'indice de pureté (%) du produit donnés par le fabricant, la concentration molaire peut varier même au sein d'acides "fumants" d'une même famille. Aussi si les caractéristiques (d et %) des acides ne sont pas rigoureusement les mêmes que celles utilisées au laboratoire de Chimie Marine, il est nécessaire de faire des corrections pour les volumes à mettre en œuvre.

A partir d'une solution commerciale, le calcul se fait de la façon suivante :

Soit d la densité de l'acide concentré,

% le degré de pureté du produit,

C_0 la concentration de l'acide commercial (mol/l),

C' la concentration de l'acide dilué (mol/l),

M la masse molaire de l'acide (g/mol),

E le volume d'acide concentré à diluer (unité de volume : l, ml ou autre),

U le volume total d'acide dilué (même unité de volume que E : l ml ou autre).

On a

$$C_0 = \frac{d \times \%}{M} \times 1000$$

$$C' = C_0 \times \frac{E}{U}$$

D'où E, le volume d'acide à diluer :

$$E = \frac{C'}{U} \times \frac{M}{d \times \% \times 1000}$$

- Méthanol (93 et 95%)

Pour un litre de méthanol à 95%, mélanger 950ml de méthanol et 50ml d'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$). La solution est stable indéfiniment si elle est stockée dans un flacon en verre.

Pour un litre de méthanol à 93%, mélanger 930ml de méthanol et 70ml d'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$). La solution est stable indéfiniment si elle est stockée dans un flacon en verre.

Le méthanol est un produit fortement volatil avec un caractère toxique et inflammable. Il est recommandé de le manipuler sous une hotte puis de stocker la préparation dans un flacon muni d'une dispense afin de faciliter les manipulations ultérieures. Le port des lunettes et d'un masque n'est pas indispensable, par contre le port des gants est conseillé. Bien sur, compte tenu de ses caractéristiques physico-chimiques, la manipulation du produit doit impérativement se faire loin de toute flamme ou source de chaleur.

3.2 Flaconnage / Echantillonnage / Conservation

Une fois prélevée à la bouteille Niskin, l'eau de mer est directement échantillonnée dans des flacons en polyéthylène (ou polycarbonate) puis stockées à l'abri de la lumière. Une pré filtration sur une soie de grosse maille n'est pas toujours souhaitable car elle peut entraîner des sous estimations de la Chl *a* et Pheo *a*. Il est ensuite recommandé de ne pas trop attendre entre le prélèvement et la filtration.

Les volumes d'eau de mer filtrés sont variables selon les échantillons ; en général entre 0,1 et 1l. Au laboratoire de Chimie Marine (IRD – Nouméa), nous filtrons au maximum 500ml. La filtration est effectuée sur des filtres en fibre de verre (Whatman GF/F, diamètre 25 mm, porosité $0,7\mu$) sous une dépression de 200mm Hg. La filtration terminée, le filtre prélevé à l'aide d'une pince est introduit soit dans un tube à essai pour une analyse immédiate soit dans un micro tube (1,5ml) pour être conservé à -40°C .

Remarque : les membranes de marque Sartorius ne sont pas adaptées à ce type d'analyse car elles libèrent des produits fluorescents dans le méthanol.

3.3 Extraction des pigments / Mesures

Les tubes à essai utilisés pour l'extraction et la lecture de la fluorescence doivent être parfaitement propres (exempt de traces de doigts, rayures ou contaminations d'échantillons précédents) et secs. Pour cela, ils sont rincés 3 fois à l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) puis 2 fois avec du méthanol avant d'être séchés à 60°C .

Le filtre est placé au fond d'un tube à essai dans lequel on ajoute 7ml de méthanol. La rétention d'eau de mer variant en fonction de la nature des filtres utilisés, pour être à chaque fois dans les mêmes

conditions de référence; il est nécessaire d'en tenir compte lors de l'extraction avec le méthanol. Ainsi, on considère généralement que les filtres en fibres de verre (Whatman) retiennent environ 2% d'eau ; on fera donc une extraction avec du méthanol à 95%. La rétention d'eau sur les filtres en polycarbonate (Nucléopore) étant négligeable, l'extraction des pigments se fera directement avec du méthanol à 93%.

Une fois les 7ml de méthanol introduit dans le tube à essai, fermer le tube avec un bouchon en silicone et agiter doucement. Bien que l'extraction soit complète en quelques minutes, il est préférable de la laisser se poursuivre au moins 15 minutes à l'obscurité et à température ambiante (ou 1 heure à 4°C). Agiter de nouveau avant d'enlever le filtre à l'aide d'une canne en verre propre. Faire une première lecture de fluorescence F_0 puis acidifier l'extrait avec 70 μ l d'HCl à 0,3mol/l (ou 10 μ l HCl par ml de solvant), boucher et agiter doucement. Faire immédiatement après la deuxième lecture de fluorescence F_a .

Les quantités extraites puis dégradées de chlorophylle *a* varient avec le temps. Il ne faut donc pas faire des séries d'extraction trop grande (10 échantillons maxi) car il est extrêmement important de respecter les mêmes temps de traitement pour chaque échantillon. Il faut notamment veiller à ce que le temps de lecture entre F_0 et F_a soit le même pour toutes les analyses. Une fois l'extraction faite il faudra donc traiter les filtres les uns après les autres

3.4 Etalonnage

L'étalonnage est réalisé à partir de Chl *a* commerciale (Sigma C5753).

- Préparation de la solution mère

Mettre 1mg de Chl *a* dans une fiole jaugée de 500ml ; compléter avec du méthanol à 93%. Boucher et placer la fiole à l'obscurité. Laisser extraire jusqu'à disparition totale des paillettes de chlorophylle tout en agitant régulièrement.

La chlorophylle étant une molécule sensible à la lumière, il est fortement conseillé de protéger la fiole par une feuille de papier d'aluminium. La solution se dégrade très vite ; elle ne peut pas être conservée plus d'une journée à 4°C.

La concentration exacte de cette solution est déterminée par spectrophotométrie. La mesure de densité optique se fait à 663nm dans une cuve en verre de trajet optique 1cm. La correction de DO à 750nm correspond à la mesure de turbidité.

$$[\text{Chla}] \text{ (g/l)} = \frac{\text{DO}_{663} - \text{DO}_{750}}{K}$$

Selon la littérature, la valeur du coefficient spécifique d'absorption dans le méthanol (K) varie entre 75 et 78 $\text{lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$:

- Raimbault : $K = 77 \text{ lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- Holm-Hansen et Riemann (1978) : $k = 75 \text{ lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- Marher (1972) : $K = 76 \text{ lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ valeur utilisée au laboratoire de Chimie Marine (IRD – Nouméa).

En l'absence de pheophytines, le rapport R doit être proche de 1,7

$$R = \frac{DO_{663}^{na}}{DO_{663}^a}$$

DO_{663}^{na} : densité optique à 665nm de l'étalon non acidifié
 DO_{663}^a : densité optique à 663nm de l'étalon acidifié

- Préparation des standards

Au laboratoire de Chimie Marine (IRD – Nouméa), nous travaillons généralement avec deux gammes de concentration de Chl a : l'une variant de 0 – 20 $\mu\text{g/l}$ et l'autre variant de 0 – 100 $\mu\text{g/l}$ pour des échantillons prélevés respectivement dans les lagons néo-calédonien et fidjien. Toutes les dilutions se font avec du méthanol à 93%.

	NOUVELLE CALEDONIE				FIDJI			
[Chl a] _{finale} ($\mu\text{g/l}$)	5	10	15	20	10	25	50	100
<i>La préparation des standards dépend bien sur de la concentration de la solution mère (SM). Dans la mesure où celle ci a été préparée selon le protocole ci dessous, la concentration est proche de 2000$\mu\text{g/l}$. Les gammes pourront donc être préparées de la façon suivante</i>								
V_{SM} (μl)	250	500	750	1 000	500	1 250	2 500	5 000
V_{fiole} (ml)	100	100	100	100	100	100	100	100

La lecture de la fluorescence est effectuée avant et après acidification en suivant le protocole décrit au paragraphe 3.3 : "Echantillonnage / Mesures". Trois mesures de "Blanc" sont effectuées de la même façon sur du méthanol à 93% soit F_0^{Blanc} et F_a^{Blanc} les fluorescences respectives du méthanol avant et après acidification.

3.5 Domaine d'application

Etant donné les interférences dues aux chlorophylles b et c, la précision des échantillons dépend de la nature même des communautés benthiques. Pour la chlorophylle a, Yentsch et Menzel (1963) considèrent généralement que la méthode est précise à $\pm 15\%$. Cette précision ne tient pas compte de la présence éventuelle de la chlorophyllide a qui est dosée avec la chlorophylle a.

La limite de détection dépend naturellement de l'appareillage utilisé. Avec le TD700, elle est de 10ng/l.

4. ETALONNAGE & CALCULS

L'étalonnage du fluorimètre selon cette méthode donne deux relations linéaires :

$$F_{\text{Chl}} = K_0 \cdot [\text{Chl } a] \quad (1)$$

$$F_{\text{Pheo}} = K_a \cdot [\text{Pheo } a] \quad (2)$$

Pour un échantillon λ :

$$F_0^\lambda = F_{\text{Chl}}^\lambda + F_{\text{Pheo}}^\lambda \quad (3)$$

$$F_a^\lambda = F_{\text{Chl}}^\lambda \rightarrow F_{\text{Pheo}}^\lambda + F_{\text{Pheo}}^\lambda$$

D'après (1) et (2) :

$$F_{\text{Chl}}^\lambda \rightarrow F_{\text{Pheo}}^\lambda = K_a \cdot [\text{Pheo } a]^\lambda = K_a \cdot [\text{Chl } a]^\lambda$$

$$F_{\text{Chl}}^\lambda = K_0 \cdot [\text{Chl } a]^\lambda$$

$$F_{\text{Pheo}}^\lambda = \frac{K_a}{K_0} \cdot F_{\text{Chl}}^\lambda$$

D'où
$$F_a^\lambda = \frac{K_a}{K_0} \cdot F_{\text{Chl}}^\lambda + F_{\text{Pheo}}^\lambda \quad (4)$$

Par différence entre les équations (3) et (4) :

$$F_a^\lambda - F_0^\lambda = \frac{K_a}{K_0} \cdot F_{\text{Chl}}^\lambda - F_{\text{Chl}}^\lambda$$

$$\boxed{[\text{Chl}]^\lambda = \frac{(F_a^\lambda - F_0^\lambda)}{(K_a - K_0)} \quad \text{et} \quad [\text{Pheo}]^\lambda = \frac{(K_0 \cdot F_a^\lambda - K_a \cdot F_0^\lambda)}{K_a \cdot (K_a - K_0)}}$$

VIII. OXYGENE DISSOUS

L'oxygène moléculaire dissous est un paramètre important qui gouverne la majorité des processus biologiques. Dans le milieu marin, la concentration en oxygène dissous est la résultante de nombreux facteurs :

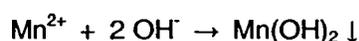
- échanges à l'interface air-océan ;
- diffusion et mélanges au sein de la masse d'eau ;
- réactions de photo réduction ;
- réactions d'oxydation chimique ;
- consommation par les organismes aquatiques pour la respiration (dégradation bactérienne des matières organiques) ;
- production par les organismes aquatiques lors de la nitrification (synthèse biologique).

Outre ces facteurs, la concentration de l'oxygène dissous dépend également de lois physiques : pression atmosphérique, pression de vapeur saturante, température de l'eau et salinité. Pour une valeur donnée de chacun de ces paramètres, la solubilité maximale de l'oxygène dans l'eau est appelée saturation. Le pourcentage d'oxygène par rapport à la saturation est un élément nécessaire à l'étude du milieu marin. Les états de sur-saturation et de sous-saturation sont alors caractéristiques des phénomènes physico-chimiques, chimiques et biologiques sus-cités.

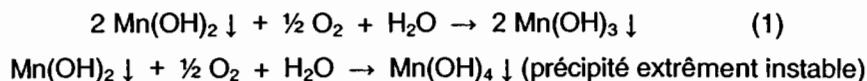
Il existe de nombreuses techniques de détermination de l'oxygène dissous dans l'eau de mer. Certaines permettent des mesures au laboratoire (méthode chimique de Winkler, méthode de chromatographie en phase gazeuse, ...), d'autres permettent des mesures in-situ (méthode électrochimique). Bien que le deuxième groupe présente des solutions de travail les plus intéressantes, les méthodes du premier groupe restent encore les plus précises. Parmi celles ci, la méthode de Winkler a été retenue comme référence universelle.

1. PRINCIPE

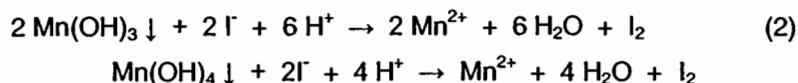
Il s'agit d'un dosage en retour basé sur la méthode de Winkler, modifiée par Carpenter (1965). On ajoute successivement dans l'échantillon d'eau de mer une solution de chlorure de manganèse et de potasse. En milieu fortement basique, il se produit alors la réaction de précipitation suivante :



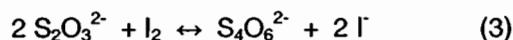
Cet hydroxyde se trouve ensuite rapidement oxydé par l'oxygène dissous dans l'eau. L'oxygène est ainsi "fixé" par le précipité en faisant passer le manganèse à des degrés d'oxydation plus élevés (n.o. +III, +IV).



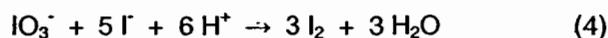
C'est sous cette forme que l'échantillon peut être conservé jusqu'à l'analyse. Les hydroxydes de manganèse sont alors dissous en milieu acide (pH<2,5). Le manganèse repasse à l'état d'oxydation +II par réaction avec des ions iodures préalablement introduits avec la solution de potasse.



L'iode libéré est alors dosé par une solution de thiosulfate.



D'après les valeurs du potentiel redox des couples $\text{S}_4\text{O}_6^{2-} / \text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ($E^0 = +0,09\text{mV}$) et $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ ($E^0 = +1,229\text{mV}$), il apparaît que la solution de thiosulfate puisse également réagir avec l'oxygène et donc être instable dans le temps puisqu'elle est en contact avec l'air. Toutefois, cette cinétique est très lente ce qui permet de pouvoir conserver la solution à condition de vérifier son titre lors de chaque série d'analyse. Pour cela, on utilise une solution étalon d'iodate de potassium qui elle, est parfaitement stable. Dans un premier temps, l'iodate se transforme en iode puis l'iode libéré est dosé par le thiosulfate.



Le point d'équivalence des dosages est mis en évidence par des méthodes électrochimiques, photométriques ou par indicateurs colorés (amidon, thiodène).

2. MATERIEL EMPLOYE

2.1 Appareillage

Au laboratoire de Chimie Marine, nous utilisons un titrateur automatique (Titroprocesseur 686 Metrohm). Les paramètres du dosage sont les suivants :

- Mode GET ;
- Vitesse de rotation du barreau aimanté : position 2 à 3 ;
- Titration rate : 1,00ml/mn ;
- Anticipation : 60 ;
- Stop V : 5ml ;
- Stop EP : 1
- Start U : retrancher 15mV au potentiel de départ ;
- Temp. : x°C (paramètre variable à mesurer avant chaque début de série);
- EP crit : 7 (réglage de la sensibilité).

Remarque 1 : la reproductibilité de la burette doit être comprise entre $\pm 5\mu\text{l}$ de thiosulfate versé.

Remarque 2 : la programmation du Titroprocesseur 686 Metrohm

F1 = (EP1*CO1*CO2)/CO3 ;3 ; (affiche le résultat à 3 chiffre après la virgule)

F2 = CO4/(CO4-CO5) ;3 ;

F3 = RS1*RS2 ; 3 ; ml/l

Avec EP1 : point d'équivalence

CO1 = 0.009 (titre du thiosulfate en mol/l, à vérifier et corriger pour chaque série d'analyse)

CO2 = 5603.5 (constante, voir § 4.1 Concentration en oxygène dissous)

CO3 = 25 (volume de la prise d'essais en ml)

CO4 = 117 (volume de l'eren en ml)

CO5 = 2 (volume des réactifs ajoutés R1 et R2 en ml)

2.2 Réactifs chimiques

PRODUIT	FORMULE CHIMIQUE	Fournisseur	REFERENCE
Chlorure de manganèse dihydraté	$\text{Mn}(\text{Cl})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck	5934.1000
Hydroxyde de potassium	KOH	Prolabo, P.A.	26 657.298
Iodure de potassium	KI	Merck	5043.1000
Acide sulfurique 95% (d=1,83)	H_2SO_4	Prolabo, P.A.	20 700.298
Thiosulfate de sodium, Titrisol 0,01 mol/l	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Merck	9909
Iodate de potassium, Titrisol 1/60 mol/l	KIO_3	Merck	9917

3. MODALITE DU DOSAGE

3.1 Préparation des réactifs

REACTIF 1 (R1), SOLUTION DE CHLORURE DE MANGANESE

Chlorure de manganèse	→	500g
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	compléter à 1000ml

REACTIF 2 (R2), SOLUTION DE POTASSE IODUREE

Hydroxyde de potassium	→	336g
Iodure de potassium	→	500g
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	compléter à 1000ml

REACTIF 3 (R3), SOLUTION DE D'ACIDE SULFURIQUE 8N

Acide sulfurique (d=1,83)	→	225ml
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	compléter à 1000ml

SOLUTION DE THIOSULFATE 0,01MOL/L

Thiosulfate 0,01mol/l Titrisol	→	1 ampoule
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	1000ml

SOLUTION MERE (SM) D'IODATE DE POTASSIUM, 1/60MOL/L

Iodate de potassium 1/60mol/l, Titrisol	→	1 ampoule
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	1000ml

SOLUTION FILLE (SF) D'IODATE DE POTASSIUM, 1/600MOL/L

Solution mère d'iodate de potassium	→	100ml
Eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm ⁻¹)	→	Compléter à 1000ml

- Réactif 1 (R1) :

Pour faire 1l de solution, dissoudre dans de l'eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm⁻¹) 500g de chlorure de manganèse. Le réactif est parfaitement stable à température ambiante dans un flacon en verre ambré. Pour des raisons de commodité d'usage, le flacon sera équipé d'une dispenseuse capable de délivrer 1ml de réactif. Il peut être conservé ainsi plusieurs mois.

Remarque : Ce produit doit être exempt de manganèse à l'état d'oxydation +III et +IV. C'est pour cette raison que le chlorure est préféré au sulfate. Il est également plus soluble.

- Réactif 2 (R2) :

Dans un flacon en verre ambré pouvant contenir 1l de solution, dissoudre 336g d'hydroxyde de potassium dans 500ml d'eau. La réaction étant exothermique, il est recommandé de manipuler avec précaution, de porter des lunettes et une blouse. Une fois le mélange refroidit, ajouter 500g d'iodure de potassium et 500ml d'eau milliQ (R = 17,8 MΩ.cm⁻¹) ; agiter. Le réactif est parfaitement stable à température ambiante. Pour des raisons de commodité d'usage, le flacon sera équipé d'une

dispensette capable de délivrer 1ml de réactif. Il peut être conservé ainsi pendant plusieurs mois. Toutefois, au cours du temps, il peut apparaître une cristallisation ; dans ce cas la solution doit être filtrée avant usage.

- Réactif 3 (R3) :

Dans un flacon en verre pouvant contenir 1l de solution, verser avec une extrême précaution 225ml d'acide sulfurique dans 775ml d'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$). Attention la réaction est particulièrement exothermique. Une fois le mélange refroidit, fermer le flacon par une dispensette pouvant délivrer un volume de 1ml. La solution est stockée à température ambiante et peut être conservée plusieurs mois.

Remarque importante 1 : Les acides concentrés sont des produits fortement corrosifs, il est indispensable de les manipuler avec la plus grande précaution. Toute manipulation doit se faire sous une hotte ; le manipulateur doit impérativement porter blouse et lunette. En cas de brûlure sur n'importe quelle partie du corps, il faut immédiatement rincer la zone atteinte à grande eau pendant $\frac{1}{4}$ d'heure même si la sensation d'échauffement disparaît rapidement. Les acides ont la capacité de pénétrer profondément dans les tissus ce qui peut alors induire de sérieuses lésions internes. Si l'accident semble important, il faut consulter un médecin.

Remarque importante 2 : Les acides sont des produits exothermiques c'est à dire que lorsqu'ils sont en contact avec un autre composé, la réaction qui se produit libère une forte chaleur. Pour toute dilution, il faut impérativement la faire en *versant lentement l'acide dans l'eau et non le contraire*. Ainsi la goutte d'acide qui tombera dans de l'eau sera automatiquement diluée et l'effet d'échauffement sera moindre. Si la température du milieu dilué devient trop importante, il faut arrêter l'addition d'acide et le faire refroidir par un bain d'eau et/ou de glace. L'addition d'acide supplémentaire pourrait conduire à un échauffement excessif et produire des projections de réactif autour de la zone de travail.

Remarque 3 : Dans le commerce, les acides concentrés sont tous appelés acides "purs" ou "fumants". Mais, selon la densité (d) et l'indice de pureté (%) du produit donnés par le fabricant, la concentration molaire peut varier même au sein d'acides "fumants" d'une même famille. Aussi si les caractéristiques (d et %) des acides ne sont pas rigoureusement les mêmes que celles utilisées au laboratoire de Chimie Marine, il est nécessaire de faire des corrections pour les volumes à mettre en œuvre.

A partir d'une solution commerciale, le calcul se fait de la façon suivante :

Soit d la densité de l'acide concentré,

% le degré de pureté du produit,

C_0 la concentration de l'acide commercial (mol/l),

C' la concentration de l'acide dilué (mol/l),

M la masse molaire de l'acide (g/mol),

E le volume d'acide concentré à diluer (unité de volume : l, ml ou autre),

U le volume total d'acide dilué (même unité de volume que E : l ml ou autre).

On a

$$C_0 = \frac{d \times \%}{M} \times 1000$$

$$C' = C_0 \times \frac{E}{U}$$

D'où E, le volume d'acide à diluer :

$$E = \frac{C'}{U} \times \frac{M}{d \times \% \times 1000}$$

- Solution de thiosulfate de sodium, 0,01 mol/l :

Verser une ampoule de Titrisol dans une fiole de 1l. Compléter par de l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) jusqu'au trait de jauge.

Remarque : Il est également possible de préparer cette solution par pesée. Dans ce cas, dissoudre 2,48g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dans une fiole d'un litre. Compléter avec de l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) jusqu'au trait de jauge. Cette solution sera conservée à température ambiante mais elle est instable. Son titre exact devra être impérativement déterminé avec précaution avant chaque série de dosages par référence à l'iodate de potassium.

- Solution d'iodate de potassium, 1/600 mol/l :

Verser une ampoule de Titrisol dans une fiole de 1l. Compléter par de l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) jusqu'au trait de jauge. Si l'ampoule de Titrisol est donnée pour une solution de 1/600 mol/l, la solution est prête. Si l'ampoule de Titrisol est donnée pour une solution de 1/60 mol/l, diluer de nouveau cette solution. Verser 100ml de SM dans une fiole de 1l et compléter avec de l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) jusqu'au trait de jauge.

Remarque : Il est également possible de préparer cette solution par pesée. Dans ce cas, sécher à 105°C pendant une heure du KIO_3 de pureté analytique. Laisser refroidir au dessiccateur et peser avec exactitude 0,3567g. Dissoudre dans de l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) et ajuster à 1l. La dissolution ne s'effectue que lentement. Cette solution est stable indéfiniment à condition d'éviter toute évaporation. L'iodate de potassium est reconnu sur le plan international comme étalon primaire pour déterminer précisément le titre du thiosulfate (Postma et al., 1976). Ne pas utiliser de bichromate de potassium (Carpenter, 1965).

3.2 Flaconnage / Echantillonnage / Conservation

Les flacons utilisés sont des erlenmeyer en verre à col rodé large de 100ml (ref : B09502, Bioblock). Les bouchons sont en verre rodé à base conique (ref : 09488, Bioblock) qui évitent tout risque de piégeage de bulle d'air. Le rodage ne doit en aucun cas être graissé. L'utilisation de flacon brun est à

éviter car la coloration du verre masque celle de l'iode et empêche la distinction entre précipité et particule turbide.

L'entretien des flacons et bouchons consiste en un lavage correct à l'eau déminéralisée. Il ne doit pas rester de traces de Mn(II). On les laissera égoutter afin qu'ils soient quasiment secs puis on les rangera bouchés avec une languette de papier au niveau du rodage entre le col du flacon et le bouchon pour éviter que les deux parties se bloquent en séchant complètement. Le matériel doit être en parfait état car la perte d'un éclat de verre, une fissure du flacon ou bouchon peut entraîner une contamination de l'échantillon par l'oxygène atmosphérique.

Pour les mesures d'oxygène, les prélèvements d'eau de mer doivent être obligatoirement associés à un enregistrement de la température. Les échantillons pour l'analyse de l'oxygène doivent être soutirés de la bouteille de prélèvement dans un délai aussi réduit que possible après la remontée et avant tout autre échantillon. L'échantillonnage doit être effectué avec le plus grand soin en évitant tout barbotage avec l'air, source d'erreur importante. Pour cela, on adapte à la bouteille de prélèvement un tuyau transparent et souple suffisamment long pour qu'il puisse plonger au fond du flacon (Fig. 14). Le diamètre intérieur du tuyau ne doit pas dépasser 4mm pour éviter les éventuelles turbulences lors de l'écoulement. Pour que la fixation du tuyau au robinet de la bouteille soit plus facile, on pourra monter ce tuyau sur un manchon en plastique souple plus large. Il est inutile de rincer le flacon si celui ci est sec.

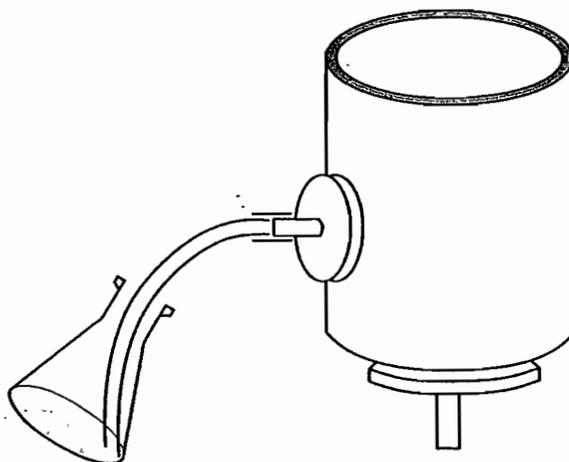


Fig. 14 : Remplissage du flacon d'échantillonnage à partir d'une bouteille Niskin.

Le prélèvement se fait de la façon suivante :

- purger le tuyau jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de bulles d'air accrochées aux parois ;
- avec le robinet ouvert, le col du flacon tête en bas, faire glisser le long de la paroi du flacon l'extrémité du tuyau souple jusqu'au fond du flacon ;
- faire basculer le flacon pour qu'il se remplisse d'eau de mer ; laisser déborder ;
- retirer doucement le tuyau ;
- fermer le robinet.

La conservation du prélèvement se fait par la fixation immédiate de l'oxygène dissous sous forme de précipité d'hydroxyde de manganèse. Pour cela :

- vérifier qu'il n'y a pas de bulles d'air dans les embouts des dispensettes de réactifs R1 et R2, sinon purger une fois ;
- plonger l'embout de la dispensette R1 dans l'échantillon d'eau de mer : introduire 1ml ;
- faire de même avec R2 ;
- boucher sans emprisonner d'air puis agiter pour disperser le précipité.

Après introduction des réactifs R1 et R2, l'oxygène est fixé ; l'échantillon peut se conserver très longtemps si le bouchon est tenu par un élastique et le flacon stocké sous l'eau.

3.3 Mesures

- Mise en route de la burette automatique
 - agiter le flacon de thiosulfate de l'unité interchangeable ;
 - purger plusieurs fois la burette automatique (5ml) à l'aide de la commande manuelle ;
 - vérifier qu'il n'y ait pas de bulles d'air dans le circuit ;
 - ouvrir le trou de remplissage de l'électrode.
- Calibration

DETERMINATION DU BLANC

 - remplir par débordement un erlenmeyer à col rodé (100ml) avec de l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) ;
 - ajouter 1ml de R3 en plongeant l'embout de la dispensette sous la surface, fermer avec le bouchon, agiter ;
 - ouvrir le flacon, ajouter 1ml de R2 en plongeant l'embout de la dispensette sous la surface, fermer avec le bouchon, agiter ;
 - ouvrir le flacon, ajouter 1ml de R1 en plongeant l'embout de la dispensette sous la surface, fermer avec le bouchon, agiter ;
 - mettre l'échantillon sous agitation magnétique et effectuer le dosage à l'aide du Titroprocesseur 686 METROHM, noter le volume de thiosulfate versé pour arriver au point d'équivalence (V_1) ainsi que l'excès de thiosulfate versé (ΔV) entre l'équivalence et l'arrêt du dosage ;
 - ajouter de nouveau 1ml de iodate (0,01 mol/l) dans cet échantillon puis mettre sous agitation magnétique ;
 - effectuer le dosage sur le Titroprocesseur 686 METROHM, noter le volume de thiosulfate versé V_2 ;
 - recommencer cette opération deux autres fois.

Le blanc de réactif Br = $V1 - V2 - \Delta V$

La reproductibilité du volume de thiosulfate versé doit être comprise entre $\pm 5\mu\text{l}$, le volume versé doit être inférieur à 0,1ml.

ÉTALONNAGE DU THIOSULFATE

- remplir par débordement erlenmeyer avec de l'eau milliQ ($R = 17,8 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$) ;
 - ajouter 1ml de R3 en plongeant l'embout de la dispensette sous la surface ;
 - fermer avec le bouchon, agiter ;
 - ouvrir le flacon, ajouter 1ml de R2 en plongeant l'embout de la dispensette sous la surface ;
 - fermer avec le bouchon, agiter ;
 - ouvrir le flacon, ajouter 1ml de R1 en plongeant l'embout de la dispensette sous la surface ;
 - fermer le bouchon, agiter ;
 - prélever 25ml de cet échantillon pour le transférer dans le récipient du Titroprocesseur ;
 - introduire exactement 1ml de la solution d'iodate de potassium (0,01N) ;
 - mettre sous agitation magnétique, laisser la réaction se poursuivre 2 à 3 minutes ;
 - effectuer le dosage sur le Titroprocesseur 686 METROHM, noter le volume de thiosulfate versé ;
 - recommencer cette opération tant que la reproductibilité du dosage n'est pas comprise entre $\pm 5\mu\text{l}$, recommencer une troisième fois.
- Dosage des échantillons
 - enlever délicatement le bouchon rodé ;
 - ajouter 1ml de R3 en plongeant l'embout de la dispensette sous la surface ;
 - reboucher l'erlenmeyer sans faire de bulles ;
 - agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète du précipité ;
 - enlever délicatement le bouchon et transférer exactement 25ml d'échantillon dans le récipient du dosage ;
 - mettre sous agitation magnétique ;
 - effectuer le dosage sur le Titroprocesseur 686 METHROM ;
 - faire un duplicat d'analyse ; si la précision du dosage n'est pas de $\pm 5\mu\text{l}$, refaire une troisième mesure.

Pour un travail en dosage manuel, procéder de la même façon :

- détermination du blanc ;
- étalonnage du thiosulfate ;
- dosage des échantillons.

Le point d'équivalence se détermine par observation visuelle. Quelques gouttes d'empois d'amidon (1%) sont ajoutées vers la fin du dosage lorsque la solution a viré du brun orangé au jaune pale. L'amidon prend une teinte noir-violet en présence d'iode. La solution vire immédiatement à l'incolore lorsque tout l'iode a réagi. Pour déterminer précisément ce point d'équivalence, il est nécessaire d'ajouter le thiosulfate au goutte à goutte jusqu'à ce que la solution devienne soudainement incolore.

Remarque : pour préparer l'empois d'amidon (1%), mélanger 2g d'amidon avec un peu d'eau distillée pour faire une pâte. Ajouter 200ml d'eau distillée bouillante. Bien mélanger et faire bouillir jusqu'à dissolution complète de l'amidon.

3.4 Domaine d'application

D'après Strickland et Parsons (1972), cette méthode est applicable dans un domaine de concentration très étendu : 0,005 à 8mmol/l d'oxygène (soit 0,06 à 90ml/l). En raison des risques d'erreur liés surtout au prélèvement, il est difficile d'estimer l'exactitude réelle de ces mesures. Néanmoins, en pratiquant cette méthode avec un maximum de précautions, on peut atteindre sans difficulté une précision de l'ordre de $\pm 0,03$ ml/l.

La méthode décrite n'est pas adaptée à l'analyse des eaux fortement polluées. Toute substance oxydante ou réductrice, présente dans l'eau à analyser (fer, sulfite, thiosulfate, chlore, hypochlorite, chromate, nitrite) entraînera des résultats erronés par excès pour les oxydants ou par défaut pour les réducteurs. Les substances organiques (tanins, lignines, acides humiques, ...) susceptibles de fixer l'iode, interfèrent également ainsi que les substances oxydables en milieu basique. Ces cas se rencontrent plus fréquemment en eaux douces et parfois en estuaires au voisinage des rejets.

4. ETALONNAGE & CALCULS

4.1 Concentrations en oxygène dissous

VARIABLE	DEFINITION	UNITE
N	Nombre de moles	mol
[]	Concentration molaire	mol/l
$V_{S_{2O_3}}^B$	Volume de thiosulfate versé pour la détermination du blanc	ml
$V_{S_{2O_3}}^E$	Volume de thiosulfate versé pour l'étalonnage	ml
$V_{S_{2O_3}}^D$	Volume de thiosulfate versé pour le dosage d'un échantillon	ml
V_{I_03}	Volume d'iodate	ml
$V_{éch}$	Volume d'échantillon utilisé pour le dosage	ml
V_{flacon}	Volume des flacons d'échantillonnage	ml
$V_{réactif}$	Volume des réactifs ajoutés lors de l'échantillonnage	ml

- Titre du thiosulfate

D'après les équations des réactions (3) et (4), nous pouvons écrire la relation suivante :

$$n_{S_2O_3} = 2 n_{I_2} = 2 \times 3 n_{IO_3}$$

$$[S_2O_3] = 6 \cdot \frac{[IO_3] \cdot V_{IO_3}}{(V_{S_2O_3}^E - V_{S_2O_3}^B)}$$

- Oxygène dissous

D'après les équations des réactions (1), (2) et (3), nous pouvons écrire la relation suivante :

$$(1) \quad n_{Mn(OH)_3} = 4 n_{O_2}$$

$$(2) \quad n_{Mn(OH)_3} = 2 n_{I_2}$$

$$(3) \quad n_{S_2O_3} = 2 n_{I_2}$$

$$\text{D'où } n_{O_2} = \frac{1}{4} n_{S_2O_3}$$

$$[O_2] = \frac{1}{4} \cdot [S_2O_3] \cdot (V_{S_2O_3}^D - V_{S_2O_3}^B) \cdot \frac{1}{V_{\text{éch}}}$$

Dans la pratique, on notera que l'échantillon a subi une légère dilution puisque deux réactifs (R1, R2) de 1ml chacun ont été introduit dans l'erlenmeyer pour piéger l'oxygène.

$$[O_2] = \frac{1}{4} \cdot [S_2O_3] \cdot (V_{S_2O_3}^D - V_{S_2O_3}^B) \cdot \frac{1}{V_{\text{éch}}} \cdot \frac{V_{\text{flacon}}}{(V_{\text{flacon}} - V_{\text{réactif}})}$$

L'habitude reconnue en océanographie est l'expression de la concentration en ml/l d'O₂ (exprimée dans les conditions standards P = 1 atm, T = 275,15 K) et non en mol/l d'O₂. Dans ces conditions, la masse volumique de l'oxygène est de 1,429g/l (Handbook of chemistry and physics). Sachant que la masse molaire de l'oxygène est de 31,9988g/mol ; une mole d'oxygène occupe donc un volume de 22391ml. D'où la relation suivante :

$$C_{O_2} = \frac{1}{4} \cdot 22414 \cdot [S_2O_3] \cdot (V_{S_2O_3}^D - V_{S_2O_3}^B) \cdot \frac{1}{V_{\text{éch}}} \cdot \frac{V_{\text{flacon}}}{(V_{\text{flacon}} - V_{\text{réactif}})} \quad (\text{ml/l})$$

Le facteur de dilution $V_{\text{flacon}} / (V_{\text{flacon}} - V_{\text{réactif}})$ peut être déterminé et inclus dans la constante si on utilise des flacons de volumes très voisins et toujours les mêmes volumes de réactifs. On notera que le volume $V_{\text{réactif}}$ n'inclus que les volumes des réactifs R₁ et R₂ car l'addition postérieure d'acide déplace un volume d'eau totalement exempt d'oxygène.

En océanographie, il est aussi courant de trouver les concentrations en oxygène exprimée en $\mu\text{mol/kg}$. La conversion des résultats se fait alors à l'aide de la formule suivante :

$$O_2 \equiv \frac{44,660 \times O_2 \text{ (ml/l)}}{\rho_{sw}} \quad (\mu\text{mol/kg})$$

La densité de l'eau de mer (ρ_{sw}) à 1 atm est donnée par l'équation :

$$\rho_{sw} = \rho_w + A S + B S^{1.5} + C S^2$$

avec T : température absolue de l'eau en K ($t^\circ\text{C} + 273,15$) ;

S : salinité de l'eau ‰ (g.kg^{-1}) ;

$$\rho_w = 0,999842594 + 6,793952 \cdot 10^{-5} T - 9,095290 \cdot 10^{-6} T^2 + 1,001685 \cdot 10^{-7} T^3 - 1,120083 \cdot 10^{-9} T^4 + 6,536332 \cdot 10^{-12} T^5 ;$$

$$A = 8,24493 \cdot 10^{-4} - 4,0899 \cdot 10^{-6} T + 7,6438 \cdot 10^{-8} T^2 - 8,2467 \cdot 10^{-10} T^3 + 5,3875 \cdot 10^{-12} T^4 ;$$

$$B = -5,72466 \cdot 10^{-6} + 1,0227 \cdot 10^{-7} T - 1,6546 \cdot 10^{-9} T^2 ;$$

$$C = 4,8314 \cdot 10^{-7} ;$$

4.2 Solubilité de l'oxygène dans l'eau, pourcentage d'oxygène dissous

La solubilité de l'oxygène dans l'eau dépend de plusieurs facteurs : la température, la salinité et la pression partielle d'oxygène. La solubilité de l'oxygène dans l'eau est calculée pour $P = 1\text{atm}$ à 20,25% (en volume) d'oxygène et une humidité relative de 100% à la pression atmosphérique totale (101325 Pa). L'équation de solubilité est la suivante :

$$\ln C = A_1 + A_2 \cdot \ln \frac{100}{T} + A_3 \cdot \ln \frac{T}{100} + A_4 \cdot \ln \frac{T}{100} + S \left[B_1 + B_2 \cdot \frac{T}{100} + B_3 \left(\frac{T}{100} \right)^2 \right]$$

Avec : C : solubilité de l'oxygène en $\text{cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ (ml/l) ;

T : température absolue de l'eau en K ($t^\circ\text{C} + 273,15$) ;

S : salinité de l'eau ‰ (g.kg^{-1}) ;

$$A_1 = -173,4292 ;$$

$$A_2 = +249,6339 ;$$

$$A_3 = +143,3483 ;$$

$$A_4 = -21,8492 ;$$

$$B_1 = -0,033096 ;$$

$$B_2 = +0,014259 ;$$

$$B_3 = -0,0017000.$$

Le pourcentage d'oxygène dissous par rapport à la saturation se calcule simplement selon

$$\% \text{O}_2 = \frac{\text{Concentration mesurée}}{\text{Solubilité}} \times 100$$

BIBLIOGRAPHIE

- Aminot A., Chaussepied M., 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. *CNEXO*, 400p.
- Banse K., Falls C.P., Hobson L.A., 1963. A gravimetric method for determining suspended matter in sea water using Millipore filters. *Deep Sea Res.*, 10 : 639-642.
- Barrett J., Jeffrey S.W., 1964. Chlorophyllase and formation of an atypical chlorophyllide in marine algae. *Plant. Physiol.*, 39 : 44-57.
- Bendschneider K., Robinson R.J., 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *J. Mar. Res.*, 11 : 87-96.
- Carpenter J.H., 1965. The accuracy of the Winkler method for dissolved oxygen analysis. *Limnol., Oceanogr.*, 10 : 135-140.
- Deniges M.G., 1920. Réaction de coloration extrêmement sensible des phosphates et arsénates ; ses applications. *C.R. Acad. Sces., Paris*, 802-804.
- Fanning G.O., Pilson M.E.Q., 1973. On the spectrophotometric determination of dissolved silica in natural waters. *Anal. Chem.*, 45 : 136-140.
- Genfa Z., Dasgupta P.K., 1989. Fluorometric measurement of aqueous ammonium ion in a flow injection system. *Anal. Chem.*, 61 : 408-412.
- Grasshoff K., Eherhardt M., Kremling K., 1983. Methods of sewaters analysis. *Verlag Chemie, Weinheim, RFA, Second edition*, 419p.
- Holms-Hansen O., Lorenzen C.J., Holmes R.W., Strickland J.D.H., 1965. Fluorimetric determination of chlorophyll. *J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer.*, 30 : 3-15.
- Holmes R.M., Aminot A., Kérouel R., Bethanie A., Hooher A., Peterson B.J., 1999. A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems. *Can. J. Aquat. Sci.*, 56 : 1801-1808.
- Ivanoff A., 1972. Introduction à l'océanographie. I. Propriétés physiques et chimiques des eaux de mer. *Vuibert (eds)*, 208p.
- Jeffrey S.W., 1974. Profiles of photosynthetic pigments in the ocean using thin layer chromatography. *Mar. Biol.*, 26 : 101-110.
- Kérouel R., Aminot A., 1997. Fluorometric determination of ammonia in sea and estuarine waters by direct segmented flow analysis. *Mar. Chem.*, 57 : 265-275.
- Koroleff F., 1969. Direct determination of ammonia in naturel water as indophenol blue. *ICES, C/M. 1969/C : 9 Hydr. Comm.*
- Koroleff F., 1976. Determination of phosphorus. In *Methods of sea water analysis*, K.Grasshoff (Eds.), *Verlag Chemie, Weinheim, RFA*, 117-126.
- Koroleff F., 1976. Determination of silicon. In *Methods of sea water analysis*, K.Grasshoff (Eds.), *Verlag Chemie, Weinheim, RFA*, 149-158.
- Lorenzen C.J., 1966. A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration. *Deep Sea Res.*, 13 : 223-227.
- Millero F.J., Sohn M.L., 1992. *Chemical Oceanography*, *CRC Press*, 531p.
- Neveux J., 1973. Recherches sur la chlorophylle a et la phéophytine a. *Thèse d'Océanographie biologique, Université de Paris VI*.
- Mullin J.B., Riley J.P., 1955. The spectrophotometric dertermination of silicate-silicon in natural waters with special reference to sea water. *Anal. Chil. Acta.*, 12 : 162-170.

- Murphy J., Riley J.P., 1962.** A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta*, 27 : 31-36.
- Oudot C., Montel Y., 1988.** A high sensitivity method for the determination of nanomolar concentrations of nitrate and nitrite in seawater with a Technicon autoanalyzer II. *Mar. Chem.*, 24 : 239-252.
- Postma H., Svanson A., Lacombe H., Grasshoff K., 1976.** The international oceanographic tables for the solubility of oxygen in sea water. *J. Cons. Int. Explor. Mer.*, 36(3) : 295-296.
- Raimbault P., Slawyk G., Coste B., Fry J., 1990.** Feasibility of measuring an automated colorimetric procedure for the determination of seawater nitrate in the 0 to 100nM range : examples from field and culture. *Mar. Biol.*, 104 : 347-351.
- Redfield A.C., 1934.** On the proportion of organic derivatives in the sea and their relation to the composition of plankton. In *James Johnstone Memorial, Liverpool*, 177-192.
- Roth M., 1971.** Fluorescence reaction for amino acids. *Anal. Chem.*, 42(7) : 880-882.
- Riley J.P., Grasshoff K., Voipio A., 1972.** Nutrient Chemicals. In *A guide to marine pollution*, Goldberg, Gordon and Breach (Eds.), Science Publishers Inc., N.Y., 81-110.
- Souchay P., 1969.** Ions minéraux condensés. *Massion, Paris*, 497pp.
- Strickland J.D.H., Parsons T.R., 1972.** A practical handbook of sea water analysis. *Bull. Fish. Res. Bd. Can.*, 167 : 311p.
- Tréguer P., Le Corre P., 1975.** Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer. Utilisation de l'Autoanalyzer II Technicon. 2nd ed. *Laboratoire d'Océanographie Chimique, Université de Bretagne Occidentale, Brest*, 110pp.
- Wood E.D., Armstrong F.A., Richards F.A., 1967.** Determination of nitrate in sea water by cadmium copper reduction to nitrite. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 47 : 23-31.
- Yentsch C.S., 1965.** Distribution of chlorophyll and pheophytin in the open ocean. *Deep Sea Res.* 12 : 653-666.
- Yentsch C.C., Menzel D.W., 1963.** A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and pheophytin by fluorescence. *Deep Sea Res.*, 10 : 221-231.