

Réunion des points focaux du MED POL

Vidéoconférence, 27-28 mai et 6-7 octobre 2021

**Point 12 de l'ordre du jour : Harmonisation et normalisation de la surveillance du cluster IMAP Pollution**

- a) **Directives / protocoles de suivi pour les indicateurs communs IMAP 13, 14, 17, 18, 20 et 23**
- b) **Directives / protocoles de surveillance pour l'assurance qualité analytique et la communication des données de surveillance pour les indicateurs communs IMAP 13, 14, 17, 18 et 20**
- c) **Directives / protocoles de surveillance pour les microplastiques flottants**

**Directives/Protocoles de contrôle concernant le prélèvement et la conservation des échantillons d'eau de mer pour l'analyse des indicateurs communs 13 et 14 : concentration en nutriments essentiels et en chlorophylle a**

Pour des raisons environnementales et économiques, le tirage du présent document a été restreint. Les participants sont priés d'apporter leur copie à la réunion et de ne pas demander de copies supplémentaires.

## Table des matières

1.	Introduction .....	1
2.	Note technique pour l'échantillonnage de l'eau de mer aux fins de la détermination du paramètre hydrographique et de la mesure de la concentration des nutriments clés et de la chlorophylle <i>a</i> .....	2
2.1.	Protocole pour l'utilisation d'un échantillonneur d'eau unique attaché à une ligne .....	3
2.2.	Protocole pour l'utilisation d'un échantillonneur d'eau attaché à une rosette.....	4
3.	Note technique pour la conservation des échantillons d'eau de mer aux fins de la détermination des paramètres hydrographiques et de la mesure de la concentration des nutriments clés et de la chlorophylle <i>a</i> .....	6
3.1.	Protocole pour la conservation d'échantillons d'eau de mer aux fins de la détermination de la salinité .....	6
3.2.	Protocole pour la conservation d'échantillons d'eau de mer aux fins de la détermination de la concentration des nutriments.....	7
3.3.	Protocole pour la conservation d'échantillons d'eau de mer aux fins de la détermination de la concentration en chlorophylle <i>a</i> .....	11

### **Annexes:**

Annexes I: Références

## Note du Secrétariat

Conformément au programme de travail 2020-2021 adopté par la COP21, le programme MED POL a préparé les lignes directrices de surveillance relatives aux indicateurs communs 13, 14, 17 et 20 de l'IMAP en vue de leur examen lors de la réunion intégrée des groupes de correspondance sur la surveillance de l'approche écosystémique (CORMON) (décembre 2020), tandis que les lignes directrices de surveillance pour l'indicateur commun 18 ainsi que les lignes directrices de surveillance relatives à l'assurance qualité et à la communication des données sont en cours de finalisation en vue de leur examen lors de la réunion du CORMON sur la surveillance de la pollution prévue en avril 2021.

Ces lignes directrices de surveillance contiennent des manuels cohérents destinés à guider le personnel technique des laboratoires compétents IMAP des Parties contractantes pour la mise en œuvre des pratiques de surveillance normalisées et harmonisées liées à un indicateur commun IMAP spécifique (c'est-à-dire l'échantillonnage, la conservation et le transport des échantillons, la préparation et l'analyse des échantillons, ainsi que l'assurance qualité et la communication des données de surveillance). Pour la première fois, ces lignes directrices présentent un résumé des meilleures pratiques connues disponibles et utilisées dans la surveillance du milieu marin, en exposant des pratiques analytiques globales intégrées qui pourront être appliquées afin de garantir la représentativité et l'exactitude des résultats analytiques nécessaires à la production de données de surveillance de qualité assurée.

Les lignes directrices/protocoles de surveillance s'appuient sur les connaissances et les pratiques acquises au cours des 40 années de mise en œuvre de la surveillance du MED POL et sur des publications récentes, mettant en évidence les pratiques actuelles des laboratoires maritimes des Parties contractantes ainsi que d'autres pratiques issues des conventions sur les mers régionales et de l'Union européenne. Une analyse approfondie des pratiques actuellement disponibles du PNUE/PAM, du PNUE et de l'AIEA ainsi que d'HELCOM, d'OSPAR et du Centre commun de recherche de la Commission européenne a été entreprise afin de contribuer à une approche novatrice pour la préparation des lignes directrices/protocoles de surveillance de l'IMAP.

Les lignes directrices de surveillance pour l'échantillonnage et la conservation des échantillons d'eau de mer pour l'analyse des indicateurs communs 13 et 14 en ce qui concerne la concentration des nutriments clés et de la chlorophylle *a* fournissent cinq protocoles réunis dans les deux notes techniques suivantes : a) Note technique pour l'échantillonnage de l'eau de mer aux fins de la détermination du paramètre hydrographique et de la mesure de la concentration des nutriments clés et de la chlorophylle *a*, comprenant les deux protocoles suivants : i) Protocole pour l'utilisation d'un échantillonneur d'eau unique attaché à une ligne, et ii) Protocole pour l'utilisation d'un échantillonneur d'eau attaché à une rosette ; et b) Note technique pour la conservation des échantillons d'eau de mer aux fins de la détermination des paramètres hydrographiques et de la mesure de la concentration des nutriments clés et de la chlorophylle *a*, comprenant les trois protocoles suivants : i) Protocole pour la conservation d'échantillons d'eau de mer aux fins de la détermination de la salinité, ii) Protocole pour la conservation d'échantillons d'eau de mer aux fins de la détermination de la concentration des nutriments, et iii) Protocole pour la conservation d'échantillons d'eau de mer aux fins de la détermination de la concentration en chlorophylle *a*.

Les lignes directrices/protocoles de surveillance pour les indicateurs communs 13 et 14 de l'IMAP, les présentes lignes directrices relatives à l'échantillonnage et à la préservation des échantillons d'eau de mer pour l'analyse des indicateurs communs 13 et 14 en ce qui concerne la concentration de nutriments clés et de chlorophylle *a*, établissent une base solide pour une mise à jour régulière des pratiques de surveillance en vue d'une mise en œuvre réussie de l'IMAP.

Conformément aux conclusions et recommandations des réunions intégrées des groupes de correspondance sur la mise en œuvre de l'approche écosystémique de l'IMAP (CORMON) (vidéoconférence, 1-3 décembre 2020), et en particulier au paragraphe 22, la Réunion des CORMON a demandé au Secrétariat de modifier les Lignes directrices/Protocoles de surveillance en abordant les propositions techniques convenues qui ont été décrites dans le rapport de la Réunion et de soumettre l'ensemble de ces documents à la réunion des points focaux du MED POL. Les réunions intégrées des

CORMON n'ayant pas demandé de modifications supplémentaires de ces Lignes directrices/Protocoles de surveillance, ceux-ci sont soumis à l'examen de la présente Réunion des points focaux du MED POL tels qu'ils ont été examinés et approuvés par les réunions intégrées des CORMON.

## Liste des abréviations / acronymes

<b>APE</b>	Agence de protection de l'environnement des États-Unis
<b>ASTM</b>	American Society for Testing and Materials (Société des États-Unis pour les essais et les matériaux)
<b>BDH</b>	British Drug Houses, une grande entreprise chimique qui a fusionné avec Merck KGaA
<b>BEE</b>	Bon état écologique
<b>BODC</b>	British Oceanographic Data Centre (Centre britannique de données océanographiques)
<b>CAS</b>	Le numéro de registre CAS est un identifiant numérique unique attribué par le Chemical Abstracts Service (CAS)
<b>CI</b>	Indicateur commun
<b>COP</b>	Conférence des parties
<b>CORMON</b>	Groupe de correspondance sur la surveillance
<b>DDW</b>	Eau doublement distillée
<b>EcAp</b>	Approche écosystémique
<b>HELCOM</b>	Commission pour la protection du milieu marin dans la zone de la mer Baltique – Commission d'Helsinki
<b>HPLC</b>	Chromatographie liquide à haute performance
<b>IMAP</b>	Programme de surveillance et d'évaluation intégrées de la mer et des côtes méditerranéennes et les critères d'évaluation connexes
<b>ISO</b>	Organisation internationale de normalisation
<b>JGOFS</b>	Étude conjointe des flux océaniques mondiaux
<b>LD</b>	Limite de détection
<b>MED POL</b>	Programme coordonné de surveillance continue et de recherche en matière de pollution dans la Méditerranée
<b>MSFD</b>	Directive-cadre Stratégie pour le milieu marin
<b>OE</b>	Objectif écologique
<b>OSPAR</b>	Convention pour la protection du milieu marin de l'Atlantique du Nord-Est
<b>OSW</b>	Eau de mer oligotrophe
<b>PAM</b>	Plan d'action pour la Méditerranée
<b>SFA</b>	Auto-analyseur à débit segmenté
<b>SI</b>	Système international d'unités [SI, abrégé du Système international (d'unités) français]
<b>UE</b>	Union européenne
<b>UNESCO</b>	Organisation des Nations Unies pour l'éducation, la science et la culture
<b>WOCE</b>	Expérience mondiale concernant la circulation océanique

## 1. Introduction

1. Les lignes directrices pour l'échantillonnage et la conservation des échantillons d'eau de mer aux fins de l'analyse des indicateurs communs 13 et 14 en ce qui concerne la concentration des nutriments clés et de la chlorophylle *a* établissent les protocoles pour l'échantillonnage et la conservation des échantillons aux fins de l'analyse de la salinité, des nutriments et de la chlorophylle *a*. L'échantillonnage et la conservation des échantillons représentent une étape importante dans le processus de surveillance du milieu marin. Grâce à un échantillonnage et à une préservation appropriés des échantillons, une évaluation du BEE concernant l'objectif écologique 5, relatif à l'eutrophisation, comme l'exposent en détail les fiches d'orientation de l'IMAP (PNUE/PAM, 2019)<sup>1</sup>, sera autorisée et maintenue.

2. Les protocoles IMAP élaborés dans le cadre des présentes lignes directrices pour l'échantillonnage et la conservation des échantillons d'eau de mer aux fins de l'analyse des indicateurs communs 13 et 14 en ce qui concerne la concentration des nutriments clés et de la chlorophylle *a* fournissent des conseils détaillés sur l'équipement nécessaire, les procédures et les points faibles recensés. Ces conseils sont étayés par des observations importantes et par une description des problèmes éventuels. Cependant, ces protocoles sont conçus pour être non pas des manuels de formation analytique, mais des lignes directrices pour les laboratoires méditerranéens.

3. Les présentes lignes directrices de surveillance s'appuient sur le programme intégré de surveillance et d'évaluation (IMAP) du PNUE/PAM, et respectivement sur les fiches d'orientation pour les indicateurs communs 13 et 14 de l'IMAP (PNUE/PAM, 2019), sur les protocoles normalisés (PNUE/PAM, 2019a)<sup>2</sup> et sur les systèmes d'assurance qualité des données (PNUE/PAM, 2019b)<sup>3</sup>, afin de permettre la comparabilité des données et la mise en place de systèmes d'évaluation régionaux. Elles tiennent également compte des techniques d'échantillonnage et d'analyse auparavant utilisées pour la stratégie de surveillance de l'eutrophisation du MED POL (PNUE/PAM/MED POL, 2005)<sup>4</sup>, tout en fournissant des procédures détaillées qui sont pertinentes pour la mise en œuvre de l'IMAP. Les détails des protocoles d'échantillonnage et de conservation des échantillons permettent de répondre aux besoins des mesures tant dans les zones off-shore que dans les zones côtières étroites.

4. Le diagramme ci-dessous indique la catégorie des présentes lignes directrices de surveillance relatives à l'échantillonnage et à la conservation des échantillons de nutriments et de chlorophylle *a* au sein de la structure que forment toutes les lignes directrices de surveillance préparées pour les indicateurs communs 13, 14, 17, 18 et 20 de l'IMAP.

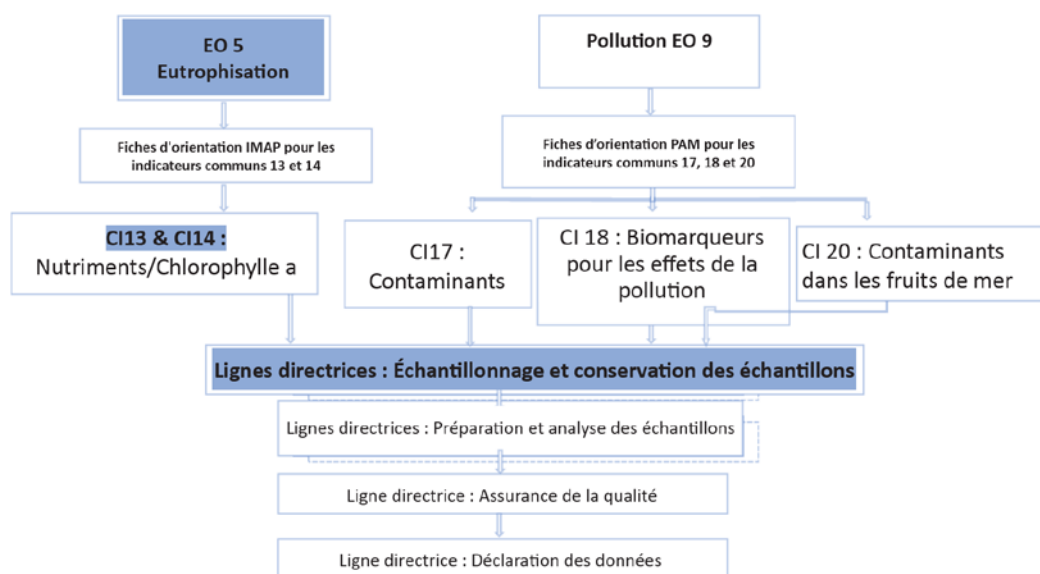
---

<sup>1</sup> (UNEP/MAP, 2019), UNEP/MED WG.467/5. IMAP Guidance Factsheets: Update for Common Indicators 13, 14, 17, 18, 20 and 21: New proposal for candidate indicators 26 and 27.

<sup>2</sup> (UNEP/MAP, 2019a), UNEP/MED WG.463/6. Monitoring Protocols for IMAP Common Indicators related to pollution.

<sup>3</sup> (UNEP/MAP, 2019b), UNEP/MED WG.467/10. Schemes for Quality Assurance and Control of Data related to Pollution

<sup>4</sup> (UNEP/MAP/MED POL), 2005. Sampling and Analysis Techniques for the Eutrophication Monitoring Strategy of MED POL. MAP Technical Reports Series No. 163. UNEP/MAP, Athens, 46 pp.



### Diagramme de flux : lignes directrices pour la surveillance des objectifs écologiques 5 et 9 de l'IMAP

#### 2. Note technique pour l'échantillonnage de l'eau de mer aux fins de la détermination du paramètre hydrographique et de la mesure de la concentration des nutriments clés et de la chlorophylle *a*

5. L'échantillonnage est une étape importante dans le processus de surveillance du milieu marin. Bien que des efforts importants aient été déployés pour concevoir des procédures de mesure analytique, très peu d'attention a été accordée à l'échantillonnage. Jusqu'à présent, les analystes scientifiques se sont principalement concentrés sur les mesures effectuées en laboratoire, le processus d'échantillonnage étant mené par différentes personnes, qui travaillent même souvent dans des organisations différentes. Les connaissances des analystes scientifiques sur le processus d'échantillonnage sont donc parfois très limitées.

6. L'échantillonnage pourrait être défini comme un processus de sélection d'une portion de matériau suffisamment petite en volume pour qu'il soit pratique de la transporter et de la manipuler en laboratoire, tout en représentant avec précision la partie de l'environnement échantillonné. Les principales difficultés de l'échantillonnage sont la représentativité et l'intégrité. De nombreuses personnes pensent que l'analyse commence lorsque l'échantillon arrive au laboratoire. Cependant, l'échantillonnage fait partie intégrante du processus analytique et en est le point de départ. L'échantillonnage est si important que, dans certains cas, c'est principalement dans cette procédure que sont commises les erreurs qui faussent l'ensemble du processus analytique.

7. L'échantillonnage doit toujours commencer par la définition de l'objectif de la mesure (Stoeppler, 1997<sup>5</sup>). Si les différentes étapes relèvent de la responsabilité de différentes personnes, il doit y avoir une bonne communication entre toutes les parties concernées. Les planificateurs de l'échantillonnage et les analystes scientifiques doivent optimiser l'ensemble de la procédure de mesure, y compris l'étape de l'échantillonnage. Le plan d'échantillonnage doit être rédigé sous la forme d'un protocole qui précise les aspects suivants :

- le moment, le lieu et la manière de prélever des échantillons ;
- l'équipement d'échantillonnage, y compris son entretien et son étalonnage ;
- les récipients des échantillons, y compris le nettoyage, l'ajout de stabilisants et le stockage ;

<sup>5</sup> M. Stoeppler (Ed.), 1997. Sampling and Sample Preparation: Practical Guide for Analytical Chemists, Springer Verlag, Berlin, Germany.

- les procédures de traitement des échantillons (par exemple la manipulation avant les mesures) ;
- les procédures de sous-échantillonnage ;
- la tenue d'un registre type (par exemple l'étiquetage, l'enregistrement des informations, les informations auxiliaires et les exigences en matière de chaîne de conservation).

8. La fréquence d'échantillonnage est donc un facteur important en termes de représentativité. Une faible fréquence d'échantillonnage pourrait conduire à une sous-estimation de la présence occasionnelle d'échantillons à forte concentration en analyte. La fréquence d'échantillonnage dépend d'un certain nombre de facteurs, par exemple le transport, l'accès au site d'échantillonnage, la disponibilité des organismes d'essai et les contraintes financières.

9. Dans le cadre de la présente note technique, les lignes directrices de surveillance fournissent les protocoles IMAP suivants pour l'échantillonnage de l'eau de mer aux fins de la détermination du paramètre hydrographique et de la mesure de la concentration des nutriments clés et de la chlorophylle *a* :

- Protocole pour l'utilisation d'un échantillonneur d'eau unique attaché à une ligne ;
- Protocole pour l'utilisation d'un échantillonneur d'eau attaché à une rosette ;

## **2.1. Protocole pour l'utilisation d'un échantillonneur d'eau unique attaché à une ligne**

### *a. Principe de travail*

10. La mesure de la salinité et de l'oxygène, des nutriments et de la chlorophylle *a* nécessite la collecte d'échantillons d'eau à différentes profondeurs. Cette tâche essentielle est accomplie à l'aide de « bouteilles d'eau ». La première bouteille d'eau, la « bouteille de Nansen », a été développée par Fritjof Nansen. Elle se compose d'un cylindre métallique avec deux mécanismes de fermeture rotatifs aux deux extrémités. La bouteille est attachée à un fil. Une fois abaissée à la profondeur souhaitée, elle est ouverte aux deux extrémités, de sorte que l'eau s'écoule librement. À la profondeur où l'échantillon d'eau doit être prélevé, l'extrémité supérieure de la bouteille se détache du fil et la bouteille est retournée. Cela permet de fermer les vannes aux extrémités et d'enfermer l'échantillon, qui peut alors être ramené à la surface.

11. Dans un « profil océanographique », plusieurs bouteilles sont attachées à intervalles réguliers sur un fil fin et plongées dans la mer. Lorsque les bouteilles ont atteint la profondeur souhaitée, un poids métallique (« messenger ») est déposé sur le fil pour déclencher le mécanisme de rotation de la bouteille supérieure. Le même mécanisme libère de la bouteille un nouveau messenger, qui descend alors le long du fil pour libérer la deuxième bouteille, et ainsi de suite jusqu'à la dernière bouteille.

12. La bouteille de Nansen est aujourd'hui largement remplacée par la bouteille de Niskin. Basée sur l'idée de Nansen, elle intègre deux modifications majeures. Premièrement, son cylindre est en plastique, ce qui élimine toute réaction chimique entre la bouteille et l'échantillon qui pourrait interférer avec la mesure des traceurs. Deuxièmement, son mécanisme de fermeture ne nécessite plus de retourner la bouteille : les valves supérieure et inférieure sont maintenues ouvertes par des ficelles et fermées par un élastique. La bouteille de Niskin étant fixée sur le fil en deux points au lieu d'un seul (comme c'est le cas de la bouteille de Nansen), il est plus facile d'augmenter son volume d'échantillonnage. Des bouteilles de Niskin de différentes tailles sont utilisées pour le prélèvement d'échantillons. Les bouteilles de Nansen et de Niskin sont utilisées avec des thermomètres à inversion.

### *b. Procédure*

13. Lorsque le profil océanographique est abaissé à la profondeur souhaitée, il faut prévoir suffisamment de temps d'adaptation à l'environnement d'échantillonnage. Cela est principalement lié à la mesure de la température, car les thermomètres doivent s'adapter à la température locale. Pour les thermomètres à inversion numérique, 2 minutes sont nécessaires, contre 10 minutes pour les thermomètres à mercure.

14. Une fois le profil déclenché (messenger libéré), il faut attendre le temps nécessaire pour que toutes les bouteilles soient fermées.



15. Après la récupération des bouteilles, celles-ci doivent généralement être placées sur un porte-échantillon qui permet de prélever facilement le contenu et qui n'est pas exposé à la lumière directe du soleil, afin de minimiser l'échange de chaleur.
16. Si l'échantillon est prélevé, la première étape consiste à lire la température.
17. Le protocole de sous-échantillonnage suivant est maintenu :
  - i) échantillons d'oxygène dissous et de pH à l'aide de tubes en tygon ;
  - ii) salinité ;
  - iii) puis, dans l'ordre, nitrites, autres nutriments ;
  - iv) chlorophylle *a*.
18. Les sources de contamination doivent être évitées :
  - i) Il convient d'éviter toute contamination provenant des équipements d'échantillonnage, des navires et des activités à bord des navires pendant la réalisation de l'échantillonnage. Certains détails sont fournis avec un seul paramètre.
  - ii) Les bouteilles de prélèvement doivent être nettoyées avec de l'acide HCL dilué et lavées à l'eau pure, et elles doivent toujours rester fermées lorsqu'elles ne sont pas utilisées.

## **2.2. Protocole pour l'utilisation d'un échantillonneur d'eau attaché à une rosette**

### *a. Principe de travail*

19. Un échantillonneur de rosette est constitué d'un assemblage de 6 à 36 bouteilles d'échantillonnage. Chaque bouteille contient un volume compris entre une valeur minimale de 1,2 L et une valeur maximale de 30 L. L'ensemble de ces bouteilles constitue l'échantillonneur de rosette ; les bouteilles sont regroupées autour d'un cylindre situé au centre de l'ensemble, où se trouve un détecteur CTD. L'appareil est attaché à un câble métallique. Un treuil à bord du bateau déroule la corde pendant la descente et l'enroule pendant la montée (c'est-à-dire à la fin de la collecte des échantillons). Lors des opérations en mer, un échantillonneur de rosette peut s'approcher du fond marin à une distance de 1 à 5 m, selon les conditions particulières en mer. L'ouverture de chaque bouteille d'échantillonnage peut être automatique (en atteignant une certaine profondeur) ou manuelle (réalisée par l'opérateur, à distance).

### *b. Procédure*

20. La rosette et le CTD sont des instruments uniques et il existe autant de protocoles de mesure du CTD (WOCE, 1991<sup>6</sup> ; UNESCO, 1994<sup>7</sup> ; UNESCO, 1988<sup>8</sup>) qu'il y a de protocoles disponibles. À partir des recommandations de ces protocoles et compte tenu de l'expérience de terrain, il est préférable d'utiliser le protocole ci-dessous.
21. Il convient de suivre les recommandations du fabricant concernant les préparations du CTD et de l'échantillonneur de rosette. Si le CTD n'a pas été utilisé depuis longtemps, par exemple lors du premier profil de la croisière, des problèmes de fuites de bouteilles peuvent survenir en raison du fait que les joints toriques des bouchons des bouteilles sont déshydratés. Si ce problème est connu, il est possible de l'éviter en rinçant et en remplissant toutes les bouteilles avec de l'eau douce pendant au moins une heure avant le prélèvement.
22. Lorsque le CTD est sur le pont, mettre en marche la pression du CTD dans le système et noter la température dans le journal de bord.

<sup>6</sup> WOCE, 1991. WOCE Operational Manual WHPO 91-1, WOCE Report No68/. (<http://whpo.ucsd.edu/manuals.html>).

<sup>7</sup> UNESCO, 1994. Protocols for Joint Global Flux Study (JGOFS) Core Measurements. Manual and Guide, 29: 1-181.

<sup>8</sup> UNESCO, 1988. The acquisition, calibration and analysis of CTD data. A report of SCOR Working Group 51. UNESCO Technical Papers in Marine Science, 54: 1-59.

23. Le CTD doit être abaissé sous la surface de la mer pendant au moins 1 minute avant le début des mesures. Cela donne le temps à tous les capteurs de s'acclimater et aux bulles d'air d'être évacuées par la pompe.
24. Remonter le CTD à la surface et lancer la mesure du profil. Si la mer est agitée, il est recommandé de commencer la descente à partir de quelques mètres sous la surface de la mer pour éviter que des bulles ne viennent briser les vagues qui entrent dans les capteurs.
25. Il convient de veiller à ce que la vitesse de descente soit aussi constante que possible et se situe autour de  $0,5 \text{ m/s}^{-1}$ . Si un système de compensation active du pilonnement (AHC) est disponible, une vitesse plus lente ( $0,3 \text{ m/s}^{-1}$ ) peut être utilisée.
26. Abaisser le CTD le plus près possible du fond, sans toutefois risquer de toucher le fond. Noter la profondeur du fond et toutes les autres informations requises par le journal de bord ou le protocole de surveillance du CTD.
27. Les bouteilles de l'échantillonneur de rosette doivent de préférence être tirées à des profondeurs standard sélectionnées pendant la coulée vers le haut afin d'obtenir un profil CTD non perturbé pendant le coulage vers le bas et des échantillons d'eau non perturbés pendant le coulage vers le haut. Si le treuil est manœuvré manuellement entre les différentes profondeurs d'échantillonnage, il convient de veiller à s'approcher le plus doucement possible de la profondeur fixée afin de réduire la perturbation du profil de l'eau. Ceci est particulièrement important dans les eaux stratifiées.
28. À chaque profondeur d'échantillonnage, les bouteilles de prélèvement doivent avoir le temps de s'acclimater et il convient d'éviter l'effet de traînée d'eau des profondeurs. Attendre au moins 1 minute avant de déclencher les bouteilles de prélèvement. Si les valeurs du CTD ne sont toujours pas stables, attendre encore 3 minutes avant de déclencher. Si les bouteilles sont équipées de capteurs de référence, ne pas oublier de respecter le temps d'attente approprié pour que les capteurs effectuent la mesure après la mise à feu de la bouteille.
29. Cependant, si le CTD et la rosette sont équipés et préparés pour des bouteilles d'échantillonnage à écoulement libre, ils peuvent être configurés pour déclencher des échantillons d'eau à des profondeurs standard prédéfinies pendant la descente. Il convient de souligner que les échantillons près de la surface doivent être collectés pendant la remontée pour éviter d'emprisonner les bulles d'air mélangées dans l'eau en brisant les vagues et les turbulences lorsque le CTD est abaissé.
30. Lorsque le CTD est remonté sur le pont, noter la pression et la température dans le journal du CTD. La valeur de la pression doit être approximativement la même que celle lue avant la coulée ; les différences sont dues à l'hystérésis thermique et mécanique du capteur de pression. La pression de pont n'est pas utilisée en tant que compensation pour corriger la pression. La pression de pont ne doit être utilisée que pour vérifier la cohérence par rapport à la dérive historique mesurée en laboratoire.
31. Toute fuite ou tout dysfonctionnement du CTD, de l'échantillonneur d'eau ou des bouteilles d'eau doit être signalé. Il convient également de noter tout relevé douteux des capteurs, ainsi que tous les événements survenus pendant la coulée. Les instructions du fabricant pour le nettoyage du CTD après chaque coulée doivent être suivies.
32. Entre les coulées et après la croisière, le CTD et la rosette doivent être stockés de manière à éviter toute contamination.

c. *Procédure après récupération du CTD/de la rosette*

33. Après la récupération, l'ensemble CTD/rosette doit être placé dans un endroit non exposé à la lumière directe du soleil ou couvert, afin de minimiser l'échange de chaleur.
34. Le protocole de sous-échantillonnage suivant doit être maintenu :
  - i) échantillons d'oxygène dissous et de pH à l'aide de tubes en tygon ;
  - ii) salinité, lorsqu'elle a été échantillonnée pour contrôle ;
  - iii) ensuite, dans l'ordre, nitrites, autres nutriments, et

iv) chlorophylle.

35. Les sources de contamination doivent être évitées :

- i) Il convient d'éviter toute contamination provenant des équipements d'échantillonnage, des navires et des activités à bord des navires pendant la réalisation de l'échantillonnage. Certains détails sont fournis avec un seul paramètre.
- ii) Les bouteilles de prélèvement doivent être nettoyées avec de l'acide HCL dilué et lavées à l'eau pure, et elles doivent toujours rester fermées lorsqu'elles ne sont pas utilisées.

### **3. Note technique pour la conservation des échantillons d'eau de mer aux fins de la détermination des paramètres hydrographiques et de la mesure de la concentration des nutriments clés et de la chlorophylle *a***

36. Outre la représentativité, l'une des principales difficultés de l'échantillonnage est la préservation de l'échantillon. La composition initiale de l'échantillon doit être conservée depuis le prélèvement jusqu'à l'analyse. Si ce n'est pas le cas, les conclusions finales ne refléteront pas la situation initiale. À cet égard, la manipulation et le stockage des échantillons prélevés revêtent une grande importance lors de l'échantillonnage.

37. Il convient d'adopter des pratiques de conservation appropriées. Les échantillons nécessitant une conservation doivent être conservés dès que possible après leur prélèvement afin de préserver leur intégrité. Il est impossible, en pratique, de conserver entièrement et certainement les échantillons, quelle que soit leur provenance. Quelle que soit la nature de l'échantillon, il n'est jamais possible d'obtenir une stabilité totale pour chaque constituant. Au mieux, la conservation des échantillons ne fait que ralentir les changements biologiques et chimiques qui se poursuivent inévitablement après le prélèvement. Les méthodes de conservation sont destinées à retarder l'action biologique ainsi que l'hydrolyse des composés et complexes chimiques et à réduire la volatilité des constituants. Les méthodes de conservation se limitent au contrôle du pH, à l'ajout de produits chimiques, au transfert dans des bouteilles ambrées ou opaques, à la filtration, à la réfrigération et à la congélation.

9. Dans le cadre de la présente note technique, les lignes directrices de surveillance fournissent les protocoles IMAP suivants pour la préservation des échantillons d'eau de mer aux fins de la détermination du paramètre hydrographique et de la mesure de la concentration des nutriments clés et de la chlorophylle *a* :

- Protocole pour la conservation d'échantillons d'eau de mer aux fins de la détermination de la salinité ;
- Protocole pour la conservation d'échantillons d'eau de mer aux fins de la détermination de la concentration des nutriments ;
- Protocole pour la conservation d'échantillons d'eau de mer aux fins de la détermination de la concentration en chlorophylle *a*.

#### **3.1. Protocole pour la conservation d'échantillons d'eau de mer aux fins de la détermination de la salinité**

##### *a. Équipement*

38. L'équipement utilisé pour la conservation des échantillons d'eau de mer aux fins de la détermination de la salinité comprend :

- i) des bouteilles de Niskin disposées sur un câble ou sur un échantillonneur multiple (rosette) ;
- ii) des bouteilles en verre avec des bouchons à fermeture parfaite de 120-250 ml (le volume nécessaire dépend du salinomètre utilisé). Pour éviter les fuites et l'évaporation, il est recommandé d'utiliser des bouteilles en verre avec bouchon et sous-bouchon.

##### *b. Procédure*

39. La bouteille d'échantillon doit être soigneusement rincée (au moins trois fois) avec la même eau que l'échantillon.
40. La bouteille doit être remplie jusqu'à la base du goulot, laissant ainsi suffisamment d'espace pour l'éventuelle dilatation thermique de l'eau.
41. Le bouchon, la zone de vissage et le col de la bouteille doivent être soigneusement rincés et séchés pour éviter la formation de cristaux de sel qui pourraient précipiter et se dissoudre dans l'échantillon lors de la réouverture au laboratoire.
42. Le bouchon et le sous-bouchon doivent être bien serrés pour éviter l'évaporation entre le moment de la collecte et celui de l'analyse en laboratoire.

*c. Stockage des échantillons*

43. Pour obtenir les meilleurs résultats possible, il est préférable d'analyser les échantillons dès que possible et uniquement lorsque leur température est en équilibre avec celle du laboratoire. L'équilibre thermique est généralement atteint en 4 à 5 heures, mais il est possible d'accélérer ce processus en assurant une bonne circulation de l'air autour des bouteilles ou en les immergeant dans un bain d'eau (Stalcup, 1991<sup>9</sup>). Cependant, s'ils sont conservés à température ambiante dans des bouteilles bien fermées, les échantillons restent intacts pendant quelques semaines, sauf variations de conductivité dues aux changements de pH, qui peuvent également entraîner des changements de la valeur de la salinité à la deuxième décimale (Grasshoff, 1983)<sup>10</sup>. L'étanchéité et l'inertie chimique des bouteilles sont des facteurs déterminants pour une bonne conservation des échantillons.

*d. Observations importantes*

44. Il est conseillé d'écrire le numéro de position sur la bouteille qui recueille l'échantillon de la bouteille de Niskin sur l'échantillonneur. Cela facilitera la phase d'échantillonnage et réduira au minimum le risque de prélever l'échantillon sur la mauvaise bouteille de Niskin.
45. Pendant le prélèvement de l'échantillon, pour éviter toute contamination, il convient de surveiller l'égouttement de la surface de l'eau des parties externes de l'échantillonneur. Il convient de faire preuve de la même prudence en cas de pluie.
46. Les sous-bouchons doivent être changés tous les 2 ou 3 ans, ou lorsqu'ils sont déformés.

**3.2. Protocole pour la conservation d'échantillons d'eau de mer aux fins de la détermination de la concentration des nutriments**

47. Les concentrations de nutriments et d'autres éléments bioactifs sont susceptibles de changer en raison de l'activité des micro-organismes naturellement présents dans l'eau de mer. Par conséquent, en règle générale, les échantillons ne doivent pas être exposés inutilement à la lumière et ils doivent être analysés dans les quelques heures qui suivent leur prélèvement.
48. Néanmoins, il est parfois nécessaire de reporter l'analyse de quelques heures ou de quelques jours en raison du mauvais temps ou du manque de personnel et d'espace dans le laboratoire. Il existe une littérature abondante à ce sujet (par exemple Kirkwood, 1992<sup>11</sup>, 1996<sup>12</sup> ; Dore et al., 1996)<sup>13</sup>, qui indique qu'aucun système de conservation universel ne peut à lui seul satisfaire toutes les exigences. Par exemple, les récipients en verre ne conviennent pas si l'on veut déterminer le silicate ; à différentes saisons, des échantillons provenant du même endroit peuvent contenir des micro-organismes d'espèces et de concentrations différentes, de sorte qu'un système de conservation donné

<sup>9</sup> Stalcup M.C., 1991. Salinity measurements. In: WOCE Operational Manual WHPO 91-1, WOCE Report No 68 (<http://whpo.ucsd.edu/manuals.html>).

<sup>10</sup> Grasshoff, K., 1983. Determination of salinity. In: Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K. (eds), *Methods of Seawater Analysis*, Verlag Chemie; Weinheim: 31-60.

<sup>11</sup> Kirkwood, D.S., 1992. *Mar. Chem.*, 38, 151.

<sup>12</sup> Kirkwood, D.S., 1996. *Nutrients: Practical notes on their determination in seawater*. Copenhagen: ICES Tech. Mar. Environ. Sci., 17, 25 pp.

<sup>13</sup> Dore, J.E., Houlihan, T., Hebel, D.V., Tien, G., Tupas, L., Karl, D.M. (1996), *Mar. Chem.*, 53, 173.

pourrait être efficace au printemps, mais pas à l'automne. Les deux approches de la conservation décrites ci-après sont la réfrigération et l'intoxication.

49. La congélation (à - 20 °C) est la méthode privilégiée par de nombreux scientifiques lorsque les échantillons de nutriments doivent être conservés pendant plusieurs semaines, voire plusieurs mois (par exemple Macdonald et McLaughlin, 1982<sup>14</sup> ; Macdonald et al., 1986<sup>15</sup> ; Kremling et Wenck, 1986<sup>16</sup> ; Chapman et Mostert, 1990<sup>17</sup> ; Kirkwood, 1996). Si les échantillons sont visiblement troubles, ils doivent être filtrés dès que possible après le prélèvement. Les sous-échantillons doivent être placés dans des bouteilles soigneusement nettoyées et congelés, stockés et décongelés en position verticale. Pour le stockage, il convient d'utiliser des bouteilles en verre dur avec des bouchons à vis recouverts de téflon ou, de préférence, des bouteilles en polyéthylène haute densité, en polycarbonate ou en polypropylène. Pour les échantillons de silicate, seules les bouteilles en plastique sont recommandées. Les bouteilles ne doivent être remplies qu'aux deux tiers de leur volume pour éviter que le liquide ne se comprime à travers les bouchons à vis pendant le processus de congélation. Si possible, il est recommandé de les congeler rapidement dans de l'azote liquide ou dans une bouillie sèche de méthane glacé (à - 20 °C pendant 20 minutes environ). D'après la meilleure pratique, les échantillons de nutriments peuvent être conservés pendant un mois au maximum avant l'analyse (ISO 5667-3:2012)<sup>18</sup>.

50. Les facteurs qui affectent l'altération des échantillons peuvent être mécaniques, physiques, chimiques, biologiques et systématiques. Ces inconvénients peuvent être partiellement surmontés au moyen des mesures suivantes :

- i. l'échantillon peut être conservé dans des flacons jetables à scintillation, en polyéthylène haute densité, avec un bouchon adapté pour assurer une fermeture parfaite. Le polyéthylène a l'avantage de résister aux agents chimiques et aux variations thermiques, il présente une plus grande résistance mécanique et des tests expérimentaux ont démontré qu'il ne cède pas et n'absorbe pas de substances ;
- ii. le problème biologique peut être partiellement atténué par le filtrage de l'échantillon à l'aide de seringues équipées de swinnex contenant des filtres en fibre de verre d'une taille de pores < 1 µm, au préalable abondamment rincés avec de la DDW, puis, de temps en temps, avec l'eau de l'échantillon lui-même ;
- iii. utiliser un seul flacon pour déterminer la concentration du nutriment à analyser ;
- iv. les récipients doivent être lavés avec 10 % de HCl, puis rincés avec de la DDW et, enfin, avec l'eau de l'échantillon lui-même ;
- v. l'échantillon doit être prélevé directement dans la bouteille d'échantillonnage et conservé dans l'obscurité, à une température de + 4 °C, s'il est analysé dans les 24 heures. Si l'échantillon n'est pas analysé dans ce délai, il convient de le congeler à une température de - 20 °C, en prenant soin de laisser le flacon debout ;
- vi. le flacon ne doit pas être rempli à plus de trois quarts du volume.

51. Cette approche, avec des volumes d'échantillons contenus, est plus adaptée lorsque les échantillons sont utilisés avec une méthode d'analyse automatisée.

52. En particulier sur les petits navires océanographiques, afin d'éviter la contamination de l'échantillon d'eau de mer par les gaz d'échappement, il est conseillé de prélever l'échantillon directement à partir du bec de l'échantillonneur d'eau à l'aide d'une seringue de 50 ml. Dans ce cas, la seringue doit être équipée d'un Swinnex et de robinets à double sens pour faciliter son lavage. La répartition des échantillons dans des flacons à scintillation pour le stockage peut se faire dans les laboratoires du navire ou dans des espaces du navire non contaminés par les gaz d'échappement.

<sup>14</sup> Macdonald, R.W., McLaughlin, F.A. (1982), *Water Res*, 16,95.

<sup>15</sup> Macdonald, R.W., McLaughlin, E.A., Wong, C.S. (1986), *Limnol. Oceanogr.*, 31, 1139.

<sup>16</sup> Kremling, K., Wenck, A. (1986), *Meeresforschung*, 31,69.

<sup>17</sup> Chapman, P., Mostert, S. A. (1990), *S. Afr J. Mar. Sci.*, 9,239.

<sup>18</sup> ISO 5667-3:2012 Water quality — Sampling. Part 3: Preservation and handling of water samples.

53. L'avantage des flacons à scintillation, outre le fait qu'il est pratique de ranger les flacons eux-mêmes sur des supports spécialement conçus, réside dans la rapidité de la congélation, qui est toujours considérée comme la meilleure procédure de conservation. Certains opérateurs ont vérifié que l'utilisation de flacons précédemment utilisés réduisait la possibilité de contamination. D'autres rincent les flacons avec une solution diluée de HCl (0,1 M) et laissent les flacons sécher à l'envers. En résumé, une procédure fiable consiste à utiliser des récipients, même neufs, mais préalablement protégés de la poussière ou d'autres contaminations possibles, qui doivent être lavés plusieurs fois avec l'échantillon et ne doivent pas être complètement remplis afin d'éviter que l'expansion du liquide pendant la congélation ne force le gel à sortir du récipient.

*a. Détails spécifiques de la collecte et de la conservation des échantillons*

54. Les détails spécifiques de la collecte et de la conservation des échantillons sont tirés du Manuel de référence pour les techniques d'échantillonnage et d'analyse pour la stratégie de surveillance de l'eutrophisation du MED POL (PNUE/PAM/MED POL, 2005), avec quelques améliorations mineures.

*a.1. Orthophosphate - P*

55. Les échantillons d'eau destinés à l'analyse des phosphates doivent être prélevés dans des bouteilles en verre bouchées ou en polyéthylène « vieilli », d'un volume de 50 à 100 ml, directement à partir du tube de sortie du filtre en ligne utilisé pour recueillir les particules en suspension. Les échantillons sont conservés dans un endroit sombre et frais jusqu'à ce que l'analyse puisse être effectuée. Pour le phosphate, l'analyse doit commencer le plus tôt possible, de préférence dans la demi-heure et dans tous les cas dans les 2 heures, et seules des bouteilles en verre doivent être utilisées pour le stockage intermédiaire des échantillons. Les échantillons ne doivent pas être conservés dans de nouveaux récipients en polyéthylène ou en polychlorure de vinyle, car il a été démontré que le phosphate disparaît rapidement dans ces récipients. Par conséquent, des bouteilles en polyéthylène haute densité vieilli ou en d'autres matières plastiques, par exemple en polycarbonate, peuvent convenir, mais tous les récipients des échantillons doivent être soigneusement testés avant leur utilisation. Une fois prélevés, les échantillons doivent être conservés à l'abri de la lumière dans un réfrigérateur jusqu'à ce qu'ils doivent en être sortis pour leur analyse.

56. L'ajout d'acide aux échantillons non filtrés ne saurait être recommandé, car cela provoque l'hydrolyse des polyphosphates éventuels et la libération de phosphate par le plancton et les bactéries. L'ajout de tous les réactifs de la procédure analytique à l'échantillon et le report de la mesure photométrique ne sont pas non plus possibles, car l'arsenic et le silicate réagissent également et faussent les lectures de phosphate.

57. En résumé, il convient d'éviter de stocker des échantillons pour l'analyse du phosphate dissous pendant plus d'une heure.

*a.2. Ammonium - N*

58. Les échantillons destinés à l'analyse de l'ammonium ne doivent être prélevés et stockés que dans des bouteilles en verre ou en polyéthylène haute densité vieilles à l'eau de mer et hermétiquement fermées, qui ne doivent être utilisées que pour l'analyse de l'ammoniac. Il convient en outre d'éviter, si possible, de filtrer les échantillons, car il est presque impossible d'obtenir des filtres exempts d'ammonium. Les eaux à forte turbidité contiennent souvent des concentrations élevées d'ammoniac et peuvent ainsi être diluées avant l'analyse (la turbidité résiduelle peut alors être compensée par la soustraction de l'absorbance de l'échantillon convenablement dilué sans ajout de réactifs).

59. L'ammonium est un composé nutritif qui subit rapidement une conversion biologique, c'est-à-dire une oxydation en nitrites et en nitrates et une fixation sous forme d'azote lié aux amines dans les organismes. L'analyse de l'ammoniac doit commencer sans délai après l'échantillonnage. Les méthodes chimiques de conservation se sont avérées insatisfaisantes en raison du fait que les organismes libèrent rapidement de l'ammoniac. Il est donc fortement recommandé d'ajouter les réactifs à l'ammoniac dans l'heure qui suit le prélèvement.

### *a.3. Nitrite - N*

60. Le nitrite est un composé intermédiaire, qui se produit lorsque l'ammoniac est oxydé ou que le nitrate est réduit. La présence de quantités plus élevées de nitrite ( $> 1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) implique la présence d'une forte activité bactérienne dans l'échantillon d'eau de mer. Le stockage d'échantillons aux fins de l'analyse des nitrites n'est donc pas recommandé. La conservation chimique (par exemple, l'ajout de chloroforme) semble également insatisfaisante. Dans les eaux troubles, une étape de filtration est nécessaire. Par conséquent, le sous-échantillon pour la détermination des nitrites doit être prélevé directement à la sortie du filtre en ligne décrit ci-dessus, dans un récipient en verre de 100 à 150 ml. Les réactifs au nitrite doivent, si possible, être ajoutés à l'échantillon dans l'heure qui suit. Le stockage intermédiaire de l'échantillon dans des bouteilles en verre au réfrigérateur, pendant 3 heures au maximum, n'entraîne dans la plupart des cas aucune modification significative de la teneur en nitrites si la teneur initiale en ammoniac est faible ( $< 0,07 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Les échantillons doivent être conservés uniquement dans des bouteilles en verre ou en polyéthylène hermétiquement fermées. Il a été signalé que les ions de sulfure interfèrent avec le dosage du nitrite ; par conséquent, lorsque l'on soupçonne la présence de sulfure d'hydrogène dans un échantillon, le gaz doit être expulsé avec de l'azote après l'addition du réactif acide sulfanilamide (Grasshoff et al., 1983).

### *a.4. Nitrate - N*

61. Le nitrate est le produit d'oxydation final des composés azotés. Les modifications de la teneur initiale en nitrate d'un échantillon d'eau de mer ne peuvent donc résulter que de l'oxydation de l'ammoniac et du nitrite ou de l'adsorption du nitrate sur le matériau du récipient de l'échantillon. L'adsorption du nitrate en particules semble être insignifiante puisque la procédure analytique libre n'importe quel nitrate, qui peut être adsorbé. Pour des raisons encore inconnues, la teneur en nitrate d'un échantillon diminue rapidement s'il est stocké dans des bouteilles en polyéthylène et, à un niveau de  $1,4 \mu\text{mol L}^{-1}$  environ, la moitié du nitrate disparaît dans les 7 jours de stockage à température ambiante. Cela signifie que seules des bouteilles en verre ou en polyéthylène haute densité « vieilli » avec des bouchons à vis serrés (de préférence avec des revêtements en téflon) doivent être utilisées.

62. Si des bouteilles en plastique plus grandes sont utilisées pour le sous-échantillonnage aux fins de l'analyse de tous les nutriments, la quantité nécessaire de nitrate doit être transférée dans une bouteille en verre ou en polyéthylène haute densité « vieilli » dans l'heure qui suit l'échantillonnage. L'analyse ne doit pas être retardée de plus de 5 heures. Dans ce cas, les échantillons doivent être conservés dans un réfrigérateur. Si un stockage plus long est inévitable, l'échantillon doit être rapidement congelé à  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  après l'ajout de la solution tampon de chlorure d'ammonium (Grasshoff et al., 1983).

### *a.5. Silicate - Si*

63. De toute évidence, il ne faut pas utiliser de bouteilles en verre pour le stockage et l'analyse d'échantillons d'eau de mer à la recherche de silicate réactif. Le sous-échantillonnage pour l'analyse des silicates doit être effectué avec des bouteilles en plastique (en polyéthylène ou en polypropylène). Quelques jours de stockage de l'échantillon dans l'obscurité d'un réfrigérateur n'entraînent pas de modifications significatives de la teneur en silicate. Cependant, pendant les saisons de forte productivité, il convient de ne pas les stocker pendant plus d'une journée. Une polymérisation de l'orthosilicate pendant le stockage d'échantillons congelés a été signalée dans des échantillons d'eau douce, mais ne se produit pas dans l'eau de mer. Si l'échantillon est conservé congelé, il est recommandé de le décongeler progressivement à température ambiante pendant au moins 24 heures. Cependant, comme pour tous les nutriments, il est préférable d'analyser l'échantillon sans délai.

64. La meilleure procédure pour le stockage et la conservation des échantillons d'eau douce semble être l'acidification de l'échantillon avec de l'acide sulfurique à un pH de 2,5 et le stockage dans des bouteilles en polyéthylène haute densité, hermétiquement fermées et vieilles à l'eau de mer, dans l'obscurité, à environ  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Cependant, comme pour tous les nutriments, il est préférable d'analyser l'échantillon sans délai.

### 3.3. Protocole pour la conservation d'échantillons d'eau de mer aux fins de la détermination de la concentration en chlorophylle *a*

#### a. *Équipement et réactifs*

65. L'équipement utilisé pour la conservation des échantillons d'eau de mer aux fins de la détermination de la concentration de chlorophylle *a* comprend :

- i) des bouteilles en plastique foncé, de 1 L (eaux côtières) - 5 L (haute mer)
- ii) un filet à plancton à mailles de 250 µm
- iii) un entonnoir en plastique adapté aux bouteilles
- iv) un appareil de filtration (pour les filtres de 25 ou 47 mm de diamètre)
- v) une pompe à vide et un piège
- vi) des filtres en fibre de verre Whatman GF/F de 25 ou 47 mm (recommandé)
- vii) des tubes de centrifugeuse calibrés de 10 ml
- viii) un congélateur ou un réfrigérateur
- ix) un pulvérisateur automatique ou une pipette pour l'acétone
- x) des cylindres gradués de 1 L
- xi) un entonnoir pour la filtration et du papier filtre
- xii) de l'acétone, ppa [(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO]
- xiii) du carbonate de sodium anhydre [Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>]
- xiv) de l'acétone neutralisée : ajouter du carbonate de sodium anhydre pur à l'acétone pure (ppa) et agiter vigoureusement. Après au moins 24 heures, filtrer l'acétone par du papier et la transférer dans la bouteille ou le flacon hermétique.

#### b. *Échantillonnage*

66. L'échantillon d'eau doit être transféré des bouteilles de prélèvement aux bouteilles en plastique foncé, à travers le filet à mailles de 250 µm, et stocké dans un endroit frais, à l'abri de la lumière du soleil. La préfiltration de l'échantillon est destinée à retenir le zooplancton et les fragments de macroalgues éventuellement présents (Strickland et Parsons, 1968<sup>19</sup>; Lenz et Fritsche, 1980<sup>20</sup>).

#### c. *Procédure de filtrage*

67. Les filtres en fibre de verre Whatman GF/F sont les plus adaptés à l'utilisation et la filtration doit être effectuée dans un court laps de temps à partir de la collecte (maximum 1-2 heures), surtout si les échantillons ont été collectés dans des environnements eutrophes. Les filtres en fibre de verre sont moins sujets au colmatage et sont moins chers que les filtres à membrane synthétique. Ils sont également appréciés pour leur grande capacité de rétention, leur facilité d'homogénéisation et leur polyvalence.

68. Si le but est d'estimer des fractions dimensionnelles précises des particules, on peut utiliser des filtres à base de membranes synthétiques (polycarbonate) à la place des filtres en fibre de verre. Ces filtres, avec une impression d'énucléation, ont l'avantage de présenter des pores calibrés et garantissent donc une séparation très précise des particules en fonction de leur taille. Il convient cependant de relever certains inconvénients, comme la très faible capacité de rétention et le débit de filtration beaucoup plus lent, qui obligent à répartir l'échantillon sur un plus grand nombre de filtres si l'on veut augmenter la sensibilité de la méthode.

---

<sup>19</sup> Strickland Ld., Parsons T.R., 1968. A practical handbook of sea-water analysis. Bull. Fish. Res. Board Can., 167, 1-312.

<sup>20</sup> Lenz J., Fritsche P., 1980. The estimation of chlorophyll *a* in water samples: a comparative study on retention in a glass-fibre and membrane filter and on the reliability of two storage methods. Arch. Hydrobiol. Beih., 14: 46-51.



69. Placer le filtre dans le boîtier approprié de l'appareil de filtration, humidifié et démarrer la pompe à vide avec une légère dépression, pour lui permettre d'adhérer uniformément au support.
70. À l'aide d'un cylindre gradué, verser entre 0,5 et 5 L d'échantillon dans l'entonnoir du système de filtration.
71. Mettre en marche la pompe à vide, à condition que la différence de pression entre la partie inférieure et la partie supérieure du filtre ne dépasse pas - 25 KPa (environ 150 mm Hg), pour éviter de briser les cellules végétales en raison de la perte de pigments qui en résulte.
72. À la fin de la filtration, maintenir la pompe en marche pendant quelques secondes pour éviter qu'une partie de la matière ne soit perdue. La quantité d'eau à filtrer est liée à la concentration de pigments (en haute mer, où les concentrations de chlorophylle *a* mesurées se situent généralement à environ 1 µg L<sup>-1</sup>, il est nécessaire de filtrer environ 3 L d'eau de mer alors que dans les eaux côtières, 0,5-1 L peuvent suffire).
73. Comme mentionné précédemment, les suspensions d'algues doivent être filtrées avec une très faible différence de pression entre les deux côtés du filtre pour minimiser la rupture des cellules.
74. Il est conseillé d'utiliser des supports de filtration qui possèdent une valve pour l'échappement de l'air, afin de ne pas limiter la surface filtrante en raison de la présence de bulles d'air, et qui sont serrés par la rotation d'une bague indépendante de la face supérieure du support, ce qui permet d'éviter de déchirer le filtre lors du montage ou du démontage du support.

*d. Stockage des échantillons*

75. La conservation des échantillons est un aspect critique de la procédure analytique, qui peut déterminer le début des processus de dégradation des chlorophylles qui conduiront à leur sous-estimation (Rai et Marker, 1982)<sup>21</sup>. Par conséquent, il est toujours préférable d'effectuer l'extraction et l'analyse des pigments de chlorophylle immédiatement après le filtrage de l'échantillon.
76. Toutefois, si cela n'est pas possible, immédiatement après la filtration, placer le filtre dans un tube de centrifugeuse à fermeture hermétique et ajouter un volume connu d'acétone pure neutralisée pour immerger complètement le filtre (environ 5 ml). Conserver ensuite l'éprouvette dans l'obscurité à - 20 °C (ou en tout cas à des températures comprises entre - 20 °C et + 4 °C), en veillant particulièrement à l'étanchéité du bouchon.
77. Le stockage du matériau filtré pendant une période allant de quelques jours à plusieurs semaines peut avoir un effet négatif, entraînant la dégradation des pigments de chlorophylle (Yanagi et Koyama, 1971<sup>22</sup> ; Blasco, 1973<sup>23</sup> ; Neveux, 1979<sup>24</sup> ; Lenz et Fritsche, 1980 ; Lazzara et al., 1990<sup>25</sup> ; Mantoura et al., 2005<sup>26</sup>).
78. D'autres méthodes de stockage des filtres sont parfois utilisées, mais ne sont pas recommandées, comme le stockage à - 20 °C après congélation des filtres humides ou séchés (Panella

---

<sup>21</sup> Rai H., Marker A.F.M., 1982. The measurements of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods. Arch. Hydrobiol. Beih., 16: 1-130.

<sup>22</sup> Yanagi K, Koyama T., 1971. Thin layer chromatographic method for determining plant pigments in marine particulated matter, and ecological significance of the results. Geochem. J., 5: 23-37.

<sup>23</sup> Blasco D., 1973. Estudio de las variaciones de la relacion fluorescencia in vivo chl a, y su aplicacion en ocea- nografia. Influencia de la limitacion de diferentes nutrientes, efecto del dia y noche y dependencia de la especie estudiada. Inv. Pesq., 37: 533-536.

<sup>24</sup> Neveux J., 1979. Pigments chlorophylliens. In: Jacques G. (ed), Phytoplankton, Biomasse, Production, Nu- meration et Culture. Edition du Castellet, Perpignan: 1-107.

<sup>25</sup> Lazzara L., Bianchi F., Falcucci M., Hull V., Modigh M., Ribera D'alcalà M., 1990. Pigmenti clorofilliani. In: Innamorati M., Ferrari I., Marino D., Ribera d'Alcalà M. (eds), Metodi nell'ecologia del plancton marino. Nova Thalassia, LINT, Trieste: 207-223.

<sup>26</sup> Mantoura R.F.C., Wright S.W., Barlow R.G., Cummings D.E., 2005 Filtration and storage of pigments from microalgae. In: Jeffery S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. (eds), Phytoplankton pigments in ocea- nography: guidelines to modern methods. 2nd ed. SCOR UNESCO, Paris: 283-305.

et Magazzù, 1978<sup>27</sup>) ou la technique de séchage et de congélation (lyophilisation), qui ne donne pas de résultats de conservation satisfaisants selon Lenz et Fritsche (1980).

79. La conservation de la chlorophylle *a* dans des échantillons de microalgues prélevés sur un filtre a jusqu'à présent fait l'objet d'un nombre très limité d'études, si l'on considère la diffusion de la pratique de conservation des filtres, même pour des périodes prolongées (Mantoura et al., 2005). Presque toutes les études datent d'avant les années 1980, ne portent pas sur des analyses distinctes des pigments extraits et présentent souvent des résultats contrastés (Marker et al., 1980)<sup>28</sup>, de sorte qu'aucune pratique de congélation ne peut être recommandée.

80. En conclusion, il est conseillé d'effectuer immédiatement des mesures sur les extraits ou, si cela s'avère impossible, de ne conserver le filtre immergé dans de l'acétone pure à - 20 °C ou, de préférence, à - 80 °C que pendant des périodes inférieures à un mois, ou de ne conserver le filtre humide gelé à l'air (entre - 20 °C et - 80 °C) que pendant des périodes inférieures à une semaine.

---

<sup>27</sup> Panella S., Magazzù G., 1978. Analisi dei pigmenti fitoplanctonici. In: Magazzù G. (ed.), *Metodi per lo studio del plancton e della produzione primaria*. Edizioni GM: 19-33.

<sup>28</sup> Marker A.F.H., Nusch E.A., Rai H., Riemann B., 1980. The measurement of photosynthetic pigments in fresh waters and standardization of methods: conclusions and recommendations. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.*, 14: 91–106.

**Annexe I**  
**Références**

## Références

UNEP/MAP/MED POL, 2005. Sampling and Analysis Techniques for the Eutrophication Monitoring Strategy of MED POL. MAP Technical Reports Series No. 163. UNEP/MAP, Athens, 46 pp.

UNEP/MAP, 2019. UNEP/MED WG.467/5. IMAP Guidance Factsheets: Update for Common Indicators 13, 14, 17, 18, 20 and 21: New proposal for candidate indicators 26 and 27.

UNEP/MAP, 2019a. UNEP/MED WG.463/6. Monitoring Protocols for IMAP Common Indicators related to pollution.

UNEP/MAP, 2019b. UNEP/MED WG.463/10. Schemes for Quality Assurance and Control of Data related to Pollution.

## Salinity

Grasshoff, K., 1983. Determination of salinity. In: Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K. (eds), *Methods of Seawater Analysis*, Verlag Chemie; Weinheim: 31-60.

Stalcup M.C., 1991. Salinity measurements. In: WOCE Operational Manual WHPO 91-1, WOCE Report No 68 (<http://whpo.ucsd.edu/manuals.html>).

## Key nutrients

Chapman, P., Mostert, S. A. (1990), *S. Afr J. Mar. Sci.*, 9,239.

Dore, J.E., Houlihan, T., Hebel, D.V., Tien, G., Tupas, L., Karl, D.M. (1996), *Mar. Chem.*, 53, 173.

ISO 5667-3:2012 Water quality — Sampling. Part 3: Preservation and handling of water samples.

Kirkwood, D.S., 1992. *Mar. Chem.*, 38,151.

Kirkwood, D.S., 1996. Nutrients: Practical notes on their determination in seawater. Copenhagen: ICES Tech. Mar. Environ. Sci., 17,25 pp.

Kremling, K., Wenck, A. (1986), *Meeresforschung*, 31,69.

Macdonald, R.W., McLaughlin, F.A. (1982), *Water Res*, 16,95.

Macdonald, R.W., McLaughlin, EA., Wong, C.S. (1986), *Limnol. Oceanogr.*, 31, 1139.

## Chlorophyll a

Blasco D., 1973. Estudio de las variaciones de la relacion fluorescencia in vivo chl a, y su aplicacion en oceanografia. Influencia de la limitacion de diferentes nutrientes, efecto del dia y noche y dependencia de la especie estudiada. *Inv. Pesq.*, 37: 533-536.

Lazzara L., Bianchi F., Falcucci M., Hull V., Modigh M., Ribera D'alcalà M., 1990. Pigmenti clorofilliani. In: Innamorati M., Ferrari I., Marino D., Ribera d'Alcalà M. (eds), *Metodi nell'ecologia del plancton marino*. Nova Thalassia, LINT, Trieste: 207-223.

Lenz J., Fritsche P., 1980. The estimation of chlorophyll a in water samples: a comparative study on retention in a glass-fibre and membrane filter and on the reliability of two storage methods. *Arch. Hydrobiol. Beih.*, 14: 46-51.

Mantoura R.F.C., Wright S.W., Barlow R.G., Cummings D.E., 2005 Filtration and storage of pigments from microalgae. In: Jeffery S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. (eds), *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. 2nd ed. SCOR UNESCO, Paris: 283-305.

Marker A.F.H., Nusch E.A., Rai H., Riemann B., 1980. The measurement of photosynthetic pigments in fresh waters and standardization of methods: conclusions and recommendations. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.*, 14: 91–106.

Neveux J., 1979. Pigments chlorophylliens. In: Jacques G. (ed), *Phytoplankton, Biomasse, Production, Numeration et Culture*. Edition du Castellet, Perpignan: 1-107.

Panella S., Magazzù G., 1978. Analisi dei pigmenti fitoplanctonici. In: Magazzù G. (ed.), *Metodi per lo studio del plancton e della produzione primaria*. Edizioni GM: 19-33.

Rai H., Marker A.F.M., 1982. The measurements of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods. *Arch. Hydrobiol. Beih.*, 16: 1-130.

Strickland Ld., Parsons T.R., 1968. A practical handbook of sea-water analysis. *Bull. Fish. Res. Board Can.*, 167, 1-312.

Yanagi K, Koyama T., 1971. Thin layer chromatographic method for determining plant pigments in marine particulated matter, and ecological significance of the results. *Geochem. J.*, 5: 23-37.