



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 la détermination de la concentration en nutriments essentiels dans l'eau de mer : composés azotés**

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 relative à la détermination de la concentration de nitrite .....	2
2.1.	Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration de nitrite.....	3
2.2.	Protocole pour la détermination colorimétrique automatisée de la concentration de nitrite .	5
3.	Note technique relative à la détermination de la concentration de nitrate.....	7
3.1.	Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration de nitrate. ....	7
3.2.	Protocole pour la détermination colorimétrique automatisée de la concentration de nitrate	12
4.	Note technique relative à la détermination de la concentration d'ammonium .....	14
4.1.	Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration d'ammonium.	15
4.2.	Protocole pour la détermination colorimétrique automatisée de la concentration d'ammonium .....	19

### Annexes :

Annexe 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.

Afin de soutenir les efforts nationaux, les présentes Directives de surveillance pour la détermination de la concentration d'éléments nutritifs clés dans la colonne d'eau - Composés de l'azote fournissent les six protocoles regroupés sous l'arborescence des Notes techniques pour la détermination de la concentration de nitrite, de nitrate et d'ammonium dans l'eau de mer, comme suit : a) Note technique pour la détermination de la concentration de nitrite, comprenant i) le Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration de nitrite et ii) le Protocole pour la détermination colorimétrique automatisée de la concentration de nitrite ; b) Note technique pour la détermination de la concentration de nitrate, comprenant i) le Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration de nitrate et ii) le Protocole pour la détermination colorimétrique automatisée de la concentration de nitrate ; et c) Note technique pour la détermination de la concentration d'ammonium, comprenant i) le Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration d'ammonium et ii) le Protocole pour la détermination colorimétrique automatisée de la concentration d'ammonium.

Les Directives/Protocoles de surveillance relatifs aux indicateurs communs 13 et 14 de l'IMAP, incluant l'indicateur relatif à la concentration d'éléments nutritifs clés dans la colonne d'eau, constituent une base solide pour la 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>CSRO</b>	Comité scientifique pour les recherches océaniques
<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 Directives de surveillance des concentrations d'éléments nutritifs clés dans la colonne d'eau - Composés de l'azote présentent les protocoles pour la détermination manuelle et automatisée de la concentration de nitrite, de nitrate et d'ammonium. La concentration d'éléments nutritifs dissous dans la colonne d'eau est probablement l'aspect le plus déterminant pour la vie en milieu marin. L'azote et le phosphore sont les deux éléments nutritifs les plus importants. En effet, ils sont indispensables pour favoriser la production primaire de plancton. Ces éléments sont dits « limitants », car les plantes ne peuvent pas pousser sans eux. À l'heure actuelle, le système de classification des eaux sur lequel se fonde l'évaluation des GES en ce qui concerne l'objectif écologique 5 « Eutrophisation » repose sur la concentration de chlorophylle, telle que détaillée dans les Fiches d'orientation de l'IMAP (PNUE/PAM, 2019)<sup>1</sup>. Mais prochainement, les Fiches d'orientation relatives à la concentration d'éléments nutritifs clés dans la colonne d'eau viendront le compléter.
2. Les Protocoles de l'IMAP élaborés dans le cadre des Directives de surveillance pour la détermination de la concentration d'éléments nutritifs clés dans la colonne d'eau - Composés de l'azote proposent des orientations précises sur l'équipement requis, les réactifs, les procédures analytiques ainsi que les méthodologies adaptées pour mesurer la concentration de nitrites, de nitrates et d'ammonium dans la colonne d'eau, les calculs, la conversion des données (le cas échéant) et l'identification des points critiques, le tout complété par des observations importantes et des problèmes éventuels. Toutefois, ils n'ont pas vocation à être employés en tant que manuels de formation analytique. Il s'agit plutôt de directives à destination des laboratoires méditerranéens, devant le cas échéant être testées et modifiées afin de valider leurs résultats finaux.
3. Les présentes Directives de surveillance s'appuient sur le Programme de surveillance et d'évaluation intégrées de la mer et des côtes méditerranéennes et les critères d'évaluation connexes (IMAP) du PNUE/PAM, respectivement sur les Fiches d'orientation relatives aux 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> à des fins de comparaison des données et d'élaboration de systèmes d'évaluation régionaux. Elles tiennent également compte des techniques d'échantillonnage et d'analyse précédentes mises en place dans le cadre de la Stratégie MED POL de surveillance continue de l'eutrophisation (PNUE/MAP/MED POL, 2005)<sup>4</sup>, tout en fournissant des procédures détaillées pertinentes pour la mise en œuvre de l'IMAP. Les détails des protocoles de détermination des éléments nutritifs clés permettent de répondre aux besoins des mesures tant dans les zones marines que dans les zones côtières étroites.
4. Le symbole et l'unité suggérés par le Système international d'unités (SI) sont présentés pour les paramètres décrits dans les sous-chapitres « Symbole, unités et précision » présents à la fin de chaque protocole. L'exactitude, la précision et, si possible, la limite de détection (LOD) attendues sont également présentées. Un identificateur de méthode est également proposé, tel que présenté dans la bibliothèque P01 du Lexique d'utilisation des paramètres du British Oceanographic Data Centre (BODC), inclus dans les Dictionnaires de données et les Normes de données pour l'eutrophisation intégrés au Système d'information pilote de l'IMAP.
5. Le diagramme ci-dessous indique la catégorie des présentes Directives de surveillance relatives à la détermination de la concentration d'éléments nutritifs clés dans la colonne d'eau (concentration des composés de l'azote) dans la structure de toutes les Directives de surveillance préparées dans le cadre des indicateurs communs 13, 14, 17, 18 et 20 de l'IMAP.
  - a. *Méthodes à flux continu*
6. Le principe utilisé par les analyseurs automatiques par flux continu segmenté (SFA) est reconnu comme étant la méthode la plus fiable et la plus précise pour la détermination des nutriments.

<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.

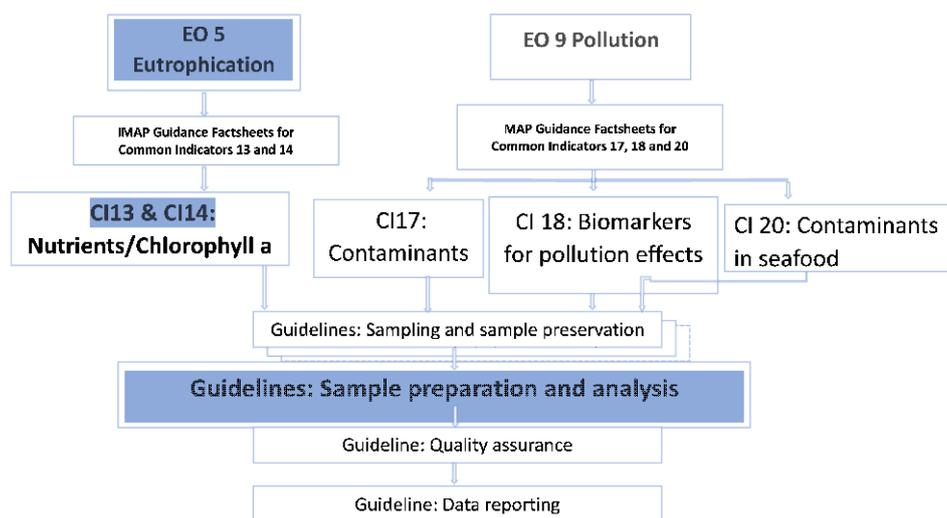
<sup>2</sup> (UNEP/MAP, 2019a), UNEP/MED WG.463/6. Monitoring Protocols for IMAP Common Indicators related to pollution.

<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.

Différents systèmes sont disponibles et peuvent être configurés pour correspondre aux méthodes standard (ISO, EPA, ASTM, etc.). Dans la mesure du possible, il est fortement recommandé d'utiliser de tels outils analytiques, et ce en raison de l'augmentation considérable de la précision et du débit d'échantillons qu'ils permettent. Idéalement, ces outils analytiques peuvent être utilisés dans les laboratoires à bord d'un navire de recherche. Cela permet d'éviter les problèmes de détérioration des échantillons lors du stockage.

7. La multiplicité des méthodes rapportées dans la littérature est davantage liée à l'optimisation des méthodes pour différents environnements qu'à une différence significative dans les réactions employées. Dans les Protocoles consacrés aux différentes méthodes, certains aspects spécifiques seront mentionnés. Quant aux principes généraux des systèmes SFA, on peut se référer, outre la documentation fournie par les fabricants, aux manuels Strickland et Parsons (1965)<sup>5</sup> et Grasshoff et al. (1999)<sup>6</sup>. Divers laboratoires ont également produit de nombreux rapports techniques visant à homogénéiser les méthodes au sein des programmes internationaux tels que le JGOFS ou le WOCE. Dans les Protocoles, seule l'indication la plus essentielle relative à la méthode la plus fréquemment utilisée sera proposée. Des observations importantes relatives aux aspects critiques des méthodes seront également indiquées, et ce afin d'en assurer la bonne exécution.



**Diagramme de flux :** Directives de surveillance des objectifs écologiques 5 et 9 de l'IMAP.

## 2. Note technique relative à la détermination de la concentration de nitrite

8. Cette note technique permet d'élaborer la méthode de détermination de la concentration de nitrite basée sur une série de réactions produisant la formation d'un composé diazoïque, coloré et mesuré par colorimétrie. Cette procédure, l'une des plus délicates parmi les analyses colorimétriques directes, est spécifique aux nitrites et ne révèle aucun écart d'efficacité par rapport à la force ionique de la solution. La méthode originale, proposée par Griess-Ilosvay (Ilosvay, 1889)<sup>7</sup>, a ensuite été modifiée par Shinn (1941)<sup>8</sup> avant d'être appliquée à l'analyse de la colonne d'eau par Bendschneider et Robinson (1952)<sup>9</sup>.

<sup>5</sup>Strickland J.J., Parsons T., 1965. A manual of sea water analysis: with special reference to the more common micronutrients and to particulate organic material. Fisheries Research Board of Canada, 311 pp.

<sup>6</sup>Grasshoff, K., Kremling, K., Ehrhardt, M. (eds), 1999. Methods of Seawater Analysis 3rd Edition Wiley-VCH Weinheim, 634 pp.

<sup>7</sup>Ilosvay L. (1889) Determination of nitrite in saliva and exhaled air. Bull. Soc. Chim. Fr., 2, 388-391.

<sup>8</sup>Shinn M.B. (1941) A colorimetric method for the determination of nitrite. Ind. Eng. Chem Anal. Ed., 13, 33-35.

<sup>9</sup>Bendschneider K., Robinson R.J. (1952) A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. J. Mar. Res., 11, 87-96.

9. La procédure analytique repose sur la formation, dans un environnement dont le pH est inférieur à 2 et dont la température ne dépasse pas 40 °C, d'un sel de diazonium (chlorure de diazosulfanilamide) qui réagit à la naphtyléthylènediamine avant de produire un colorant diazoïque.

10. Dans le cadre de cette Note technique, les présentes Directives de surveillance fournissent les protocoles de l'IMAP suivants pour la détermination colorimétrique de la concentration de nitrite :

- Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration de nitrite ;
- Protocole pour la détermination colorimétrique automatisée de la concentration de nitrite ;

## 2.1. Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration de nitrite.

### b. Équipement :

11. L'équipement pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration de nitrite comprend :

- |  |  |
|--|--|
| 1. cylindres gradués ou pipettes de 50 ml ;                  | 8. micropipettes de précision pour mesurer des volumes compris entre 10 et 100 µL ;                              |
| 2. récipients en verre borosilicaté de 100 ml (bêcher) ;     | 9. échelle analytique ;  |
| 3. verrerie de laboratoire pour les préparations chimiques ; | 10. poêle ;  |
| 4. distributeur automatique de 1 ml ;                        | 11. four à micro-ondes ;   |
| 5. flacons jaugés de 500 ml ;                                | 12. sécheur ;  |
| 6. flacons jaugés de classe A de 100 ml ;                    | 13. spectrophotomètre ou colorimètre sensible à 543 nm équipé de cellules avec trajet optique d'au moins 50 mm ; |
| 7. flacons jaugés de classe A de 1 L ;                       |  |

### c. Produits chimiques :

12. Les produits chimiques pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration de nitrite comprennent :

- |   |   |
|---|---|
| 1. mélange sulfochromique ;   | 4. <i>N-N</i> -(Naphtyl-1)-éthylènediamine dichlorhydrate [C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> · 2HCl] ; |
| 2. acide chlorhydrique concentré [HCl] ;  | 5. nitrite de sodium [NaNO <sub>2</sub> ] ;   |
| 3. sulfanilamide [NH <sub>2</sub> SO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ] ; | 6. chloroforme [CHCl <sub>3</sub> ] ;   |

### d. Préparation de solutions mères :

#### *Réactif au sulfanilamide*

13. 50 ml d'acide chlorhydrique concentré sont versés dans un bêcher d'au moins 600 ml, contenant 400 ml d'eau de qualité réactif, et agités jusqu'à ce que le mélange soit complet. 5 g de sulfanilamide sont dissous dans cette solution. Le volume est ajusté à 500 ml avec de l'eau de qualité réactif. La solution reste stable pendant de nombreux mois si elle est conservée au réfrigérateur dans des récipients en plastique ou en verre.

#### *Réactif NNEDDC*

14. 500 mg de *N*-(1-Naphthyl)éthylènediamine dichlorhydrate dans 450 ml d'eau de qualité réactif sont dissous et ajustés au volume avec de l'eau de qualité réactif dans un flacon de 500 ml. Conservée au réfrigérateur dans des flacons opaques, la solution reste stable pendant 1 à 2 mois. Elle doit être jetée si une couleur brune apparaît.

#### *Solution étalon de nitrite de sodium - 2 mmol L<sup>-1</sup>*

15. Quelques grammes de nitrite de sodium placés dans un four à 110 °C sont séchés et refroidis dans un séchoir à gel de silice. 138 mg sont pesés sur une balance de précision, puis dissous et ajustés au volume dans 800 ml d'eau de qualité réactif dans un flacon de 1 L (classe A). Conservée au

réfrigérateur dans un flacon opaque, la solution reste stable pendant environ un mois si on y ajoute quelques gouttes de chloroforme.

e. Préparation de l'équipement spécifique pour l'analyse :

d.1 *Entretien des cuves de réaction*

16. Les flacons de réaction contenant le mélange sulfochromique bouillant sont périodiquement lavés, rincés abondamment à l'eau de qualité réactif et séchés. Pour l'entretien ordinaire après utilisation, ils sont rincés à l'eau de qualité réactif et placés à l'envers sur du papier filtre.

f. Procédure analytique :

e.1 *Réactifs à préparer lors de l'utilisation*

*Préparation de solutions étalon*

17. 5 étalons de concentration de nitrite connue sont préparés : dilution dans des flacons de 100 ml (classe A) de 10, 25, 50, 75 et 100 µL (respectivement) de solution étalon de nitrite de sodium (mesurée à l'aide d'une pipette de précision) avec de l'eau de mer oligotrophe. Les concentrations de nitrite sont donc comprises entre 0,2 et 2 µmol L<sup>-1</sup>, plus la teneur en nitrite de l'eau de mer oligotrophe.

e.2 *Traitement analytique*

18. Si l'échantillon est congelé au moment de l'analyse, il est rapidement décongelé en utilisant un bain à 37 °C ou un four à micro-ondes (par exemple).

19. Les béchers contenant 50 ml d'échantillon ou chacun des étalons (mesurés à l'aide d'un cylindre gradué) sont remplis.

20. On ajoute 1 ml de réactif sulfanilamide à chaque échantillon ou étalon à l'aide d'un distributeur. On laisse ensuite la réaction se produire pendant 5 minutes.

21. On ajoute 1 ml de réactif NNEDDC à chaque échantillon ou étalon à l'aide d'un distributeur. On laisse ensuite la réaction se produire pendant 10 minutes supplémentaires.

e.3 *Préparation des blancs réactifs*

22. Au moins deux répliques de blancs réactifs placés dans le même type de récipient en verre borosilicaté de 100 ml, en utilisant 50 ml d'eau de qualité réactif, sont préparées en appliquant la même procédure que pour les échantillons et les étalons.

e.4 *Mesures spectrophotométriques*

23. On mesure l'absorbance du blanc ( $bl_{c,i}$ ) de chaque cellule du spectrophotomètre ou du colorimètre utilisé pour la lecture par rapport à la cellule de référence, à 543 nm, en les remplissant d'eau sans réactif. L'opération est superflue si une seule cellule est utilisée.

24. Pour chaque flacon, le nombre de cellules utilisées et l'identification du contenu du flacon (échantillon, solution étalon, blanc) sont notés dans un formulaire. La cellule est rincée avec une partie de son contenu, remplie. L'absorbance à 543 nm est ensuite lue, puis inscrite sur le même formulaire.

g. Calculs

25. Le blanc de réactif ( $bl$ ) est calculé en tant que moyenne des deux lectures de blanc.

26. La corrélation entre les valeurs d'absorbance des 5 étalons et les concentrations supposées est calculée en utilisant la méthode de régression des moindres carrés ordinaires. Le facteur colorimétrique ( $f$ ) est représenté par la pente.

27. La concentration de nitrite dans les échantillons est calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$c(\text{NO}_2^-) / \mu\text{mol L}^{-1} = (\text{ABS} - bl - bl_{c,i}) f$$

où

$c(\text{NO}_2^-)$  = concentration d'orthophosphates

ABS = absorbance de l'échantillon

bl = blanc des réactifs

$bl_{c,i}$  = blanc de la  $i$ -ème cellule utilisée

$f$  = facteur colorimétrique

28. Pour une cellule disposant d'un trajet optique de 50 mm, le facteur colorimétrique est égal à environ  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , c'est-à-dire qu'une différence de concentration de  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  (par exemple entre la solution étalon 3 et 5) devrait correspondre à une différence d'absorbance d'environ 0,25.

*h. Remarques importantes :*

29. la solution mère étalon est renouvelée fréquemment (au moins une fois par mois).

*i. Problèmes éventuels :*

30. la méthode proposée ne provoque ni complication ni interférence. Toutefois, toute trace de sulfure d'hydrogène doit être éliminée de l'échantillon avant l'analyse (Grasshoff, 1983<sup>10</sup> ; Airey et al., 1984<sup>11</sup>).

## 2.2. Protocole pour la détermination colorimétrique automatisée de la concentration de nitrite

*a. Réactifs*

*Réactif au sulfanilamide*

31. 10 g de sulfanilamide sont dissous dans 100 ml de HCl concentré et ajustés à un litre avec de la DDW. La solution doit être conservée dans un flacon en verre opaque et reste stable pendant au moins un mois.

*Réactif NNEDDC*

32. 1 mg de  $N$ -(1-Naphthyl)éthylènediamine dichlorhydrate dans 950 ml d'eau de qualité réactif sont dissous et ajustés au volume avec de la DDW dans un flacon de 1000 ml. Conservée au réfrigérateur dans des flacons opaques, la solution reste stable pendant 1 à 2 mois. Elle doit être jetée si une couleur brune apparaît.

*b. Étalon*

33. Environ 2 g de  $\text{NaNO}_2$  sont séchés dans un four à  $100^\circ\text{C}$ . Il convient de vérifier que le poids du sel reste constant dans le temps. Le sel est placé dans un séchoir à gel de silice pendant 24 heures supplémentaires. 138 mg sont pesés sur une balance de précision, puis dissous dans 800 ml de DDW dans un flacon de 1 L (classe A) avant d'être ajustés au volume. On obtient une concentration finale de  $2 \text{ mmol L}^{-1}$ . Conservée au réfrigérateur dans un flacon opaque, la solution reste stable pendant environ un mois si l'on y ajoute quelques gouttes de chloroforme.

34. Cet étalon est utilisé au quotidien pour la préparation de 5 solutions étalons. La concentration des étalons est choisie en fonction de la quantité de sel de  $\text{NO}_2$  anticipée couvrant toute la gamme des concentrations attendues. À partir des 5 étalons, on obtient le facteur de multiplication nécessaire pour calculer les concentrations.

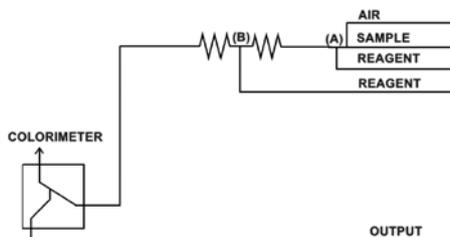
*c. Collecteur*

35. Le collecteur (Illu. 1) est composé de deux injecteurs et de quatre bobines de 10 enroulements chacune. Le premier injecteur (A) est muni de trois entrées : la première pour l'échantillon, la deuxième pour l'air et la troisième pour l'introduction du premier réactif. Immédiatement après, on

<sup>10</sup>Grasshoff, K. (1983) Determination of nitrite. In: "Methods of Seawater Analysis", Grasshoff K., M. Ehrhardt, K. Kremling Eds, Verlag Chemie, Weinheim, 139-142.

<sup>11</sup>Airey D., Dal Pont G., Sandars G. (1984) A method of determining and removing sulphide to allow the determination of sulphate, phosphate, nitrite and ammonia by conventional methods in small volumes of anoxic waters. Analytica Chim. Acta, 166, 79-92.

trouve 4 bobines composites de 10 bobines chacune : dans les 2 premières, le premier réactif est mélangé ; dans les 2 autres, le second réactif est introduit au point (B) au moyen du second injecteur.



**Illustration 1.** Collecteur pour la mesure des nitrites.

*d. Remarques importantes :*

36. En cas d'instabilité du référentiel lors de l'allumage sans réactif, lavez le circuit avec du HCl à 10 %.
37. Si une hausse manifeste du référentiel est constatée au cours de l'analyse, nettoyez immédiatement la cellule de lecture du colorimètre en y injectant directement de l'acide chlorhydrique à 50 %, sans arrêter le circuit.
38. Utilisez de la DDW en procédant à une déionisation dans le récipient d'échantillonnage de l'instrument.
39. Si des composants du circuit doivent être remplacés (injecteurs, barboteurs), rééquilibrez le circuit en modifiant les débits des tuyaux.
40. Utilisez des récipients adaptés pour les différents réactifs. Le bouchon du récipient doit être muni de petits trous permettant d'insérer des capillaires (aiguilles, etc.) pour le retrait du réactif.
41. L'eau pauvre en nutriments, ou eau oligotrophe (OSW), est utilisée comme eau de lavage entre les divers échantillons. Des OSW de salinité similaire à celle des échantillons doivent être utilisées.

*e. Symbole, unités et précision*

42. Pour le paramètre décrit dans ce protocole, le symbole et l'unité suggérés par le Système international d'unités (SI), la précision attendue, ainsi que les identificateurs de méthode tels que fournis dans la bibliothèque P01 du Lexique d'utilisation des paramètres du BODC sont fournis comme suit :

**Symbole :**  $c(\text{NO}_2^-)$

**Unité :**  $\mu\text{mol L}^{-1}$

**Précision :**  $\pm 0,02$

**Précision :**  $\pm 0,02$

**LOD :** 0,03

**Identificateur de méthode :**

SDN:P01::NTRIMATX

Concentration de nitrite {NO<sub>2</sub>- CAS 14797-65-0} par unité de volume de la masse d'eau [phase particulaire dissoute plus réactive] par analyse colorimétrique manuelle

SDN:P01::NTRIAAZX

Concentration de nitrite {NO<sub>2</sub>- CAS 14797-65-0} par unité de volume de la masse d'eau [phase inconnue] par analyse colorimétrique

### 3. Note technique relative à la détermination de la concentration de nitrate

43. La méthode a été introduite par Morris et Riley (1963)<sup>12</sup>, mais ce n'est que plus tard que la dynamique des réactions concernées a été étudiée en profondeur (Nydhal, 1976<sup>13</sup> ; Grasshoff, 1983<sup>14</sup>). La méthode de détermination du nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) est basée sur sa réduction en nitrite, qui est ensuite déterminée de manière colorimétrique par la formation d'un colorant azoïque. Elle s'est avérée fiable et utile pour le travail en mer et ne comporte que très peu d'interférences dans les eaux littorales et océaniques.

44. La méthode détermine la somme du nitrite et du nitrate. Il convient donc de procéder à une détermination distincte du nitrite et de soustraire la concentration de celle obtenue à l'aide de cette méthode. Pour des niveaux de concentration supérieurs à environ 20 µmol L<sup>-1</sup>, il convient d'établir des courbes d'étalonnage pour une gamme basse et haute.

45. Le nitrate est réduit en nitrite dans une colonne de réduction remplie de granulés de cadmium enrobés de cuivre. Le rendement de la réduction dépend du pH de la solution et de l'activité de la surface métallique. Les conditions de la réduction décrites dans la méthode sont ajustées à un pH d'environ 8,5. Ainsi, le nitrate est converti en nitrite de manière quasi quantitative (90-95 %) et ne subit aucune réduction supplémentaire. Un tampon de chlorure d'ammonium est utilisé pour contrôler le pH et complexer les ions de cadmium libérés. Le nitrite formé est ensuite déterminé par colorimétrie (à 540 nm). La méthode proposée est en grande partie celle illustrée par Grasshoff (1983).

46. Dans le cadre de cette Note technique en lien avec la détermination de la concentration de nitrate, les présentes Directives de surveillance fournissent les protocoles de l'IMAP suivants pour la détermination colorimétrique de la concentration de nitrate :

- Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration de nitrate ;
- Protocole pour la détermination colorimétrique automatisée de la concentration de nitrate ;

#### 3.1. Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration de nitrate.

##### a. Équipement :

47. L'équipement pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration de nitrate comprend :

- |   |  |
|---|--|
| 1. cylindres gradués ou pipettes de 50 ml ;   | 12. sécheur ;  |
| 2. récipients en verre borosilicaté de 100 ml (bêcher) ;                            | 13. spectrophotomètre ou colorimètre sensible à 543 nm équipé de cellules avec trajet optique d'au moins 50 mm ; |
| 3. verrerie de laboratoire pour les préparations chimiques ;                        | 14. pompe péristaltique avec un ou plusieurs canaux ;  |
| 4. distributeur automatique de 1 ml ;   | 15. colonnes de réduction ;  |
| 5. flacons jaugés de 1000 ml et 500 ml ;  | 16. tuyau tygon de 4 à 4,5 mm de diamètre interne ;  |
| 6. flacons jaugés de classe A de 100 ml ;   | 17. laine de verre ;   |
| 7. flacons jaugés de classe A de 1 L ;  | 18. pH-mètre ;   |
| 8. micropipettes de précision pour mesurer des volumes compris entre 10 et 100 µL ; | 19. tamis de maille de 0,25 et 0,42 mm pour la taille des particules (60 et 40 mailles).                         |
| 9. échelle analytique ;   |  |
| 10. poêle ;   |  |
| 11. four à micro-ondes ;  |  |

##### b. Produits chimiques :

<sup>12</sup> Morris A.W., Riley J.P. (1963) The determination of nitrate in sea water. *Analytica Chim. Acta*, 29, 272-279.

<sup>13</sup> Nydhal F. (1976) On the optimum conditions for the reduction of nitrate to nitrite by cadmium. *Talanta*, 23, 349-357.

<sup>14</sup> Grasshoff K. (1983) Determination of nitrate. In: "Methods of Seawater Analysis", Grasshoff K., M. Ehrhardt, K. Kremling Eds, Verlag Chemie, Weinheim, 143-150.

48. Les produits chimiques pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration de nitrate comprennent :

1. mélange sulfochromique ;
2. acide chlorhydrique concentré [HCl] ;
3. sulfanilamide [NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>] ;
4. *N-N*-(Naphthyl-1)-éthylènediamine dichlorhydrate [C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> · 2HCl] ;
5. nitrate de potassium 99,999 % [KNO<sub>3</sub>] ;
6. nitrate de sodium [NaNO<sub>2</sub>] ;
7. chlorure d'ammonium [NH<sub>4</sub>Cl] ;
8. hydroxyde d'ammonium [NH<sub>4</sub>OH] ;
9. cadmium granulaire pour les réacteurs [Cd] ;
10. sulfate de cuivre pentahydraté [CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O] ;
11. chloroforme [CHCl<sub>3</sub>] ;

c. Préparation de solutions mères :

*Réactif aux sulfanilamides*

49. 50 ml d'acide chlorhydrique concentré sont versés dans un bécher d'au moins 600 ml, contenant 400 ml d'eau de qualité réactif, et agités jusqu'à ce que le mélange soit complet. 5 g de sulfanilamide sont dissous dans cette solution. Le volume est ajusté à 500 ml avec de l'eau de qualité réactif. La solution reste stable pendant de nombreux mois si elle est conservée au réfrigérateur dans des récipients en plastique ou en verre.

*Réactif NNEDDC*

50. 500 mg de *N*-(1-Naphthyl)éthylènediamine dichlorhydrate dans 450 ml d'eau de qualité réactif sont dissous et ajustés au volume avec de l'eau de qualité réactif dans un flacon de 500 ml. Conservée au réfrigérateur dans des flacons opaques, la solution reste stable pendant 1 à 2 mois. Elle doit être jetée si une couleur brune apparaît.

*Solution de sulfate de cuivre*

51. 20 g de sulfate de cuivre pentahydraté sont dissous dans de l'eau de qualité réactif dans une fiole volumétrique de 1 L et stockés dans un flacon opaque. La solution est stable indéfiniment.

*Environ 0,2 mol L<sup>-1</sup> d'acide chlorhydrique*

52. 100 ml d'acide chlorhydrique concentré et 500 ml d'eau de qualité réactif sont mélangés dans un bécher sous agitation. Stockée dans un flacon en verre, la solution reste stable indéfiniment.

*Tampon de chlorure d'ammonium-ammoniac*

53. 10 g de chlorure d'ammonium pour analyse sont dissous dans un bécher dans 1 L d'eau de qualité réactif. Le pH de la solution est ajusté à 8,5 en ajoutant une petite quantité de solution d'hydroxyde d'ammonium (environ 1,5 ml devrait suffire) au goutte-à-goutte, en agitant et en vérifiant le pH à l'aide d'un pH-mètre. La solution tampon doit être conservée dans un flacon opaque et reste stable pendant de nombreux mois.

*Solution étalon de nitrate de potassium - 5 mmol L<sup>-1</sup>*

54. Quelques grammes de nitrate de potassium placés dans un four à 110 °C sont séchés et refroidis dans un séchoir à gel de silice. 505,6 mg sont pesés sur une balance de précision, puis dissous dans 800 ml d'eau de qualité réactif dans un flacon de 1 L (classe A) avant d'être ajustés au volume. Conservée au réfrigérateur dans un flacon opaque, la solution reste stable pendant environ un mois si l'on y ajoute quelques gouttes de chloroforme.

*Solution étalon de nitrite de sodium - 2 mmol L<sup>-1</sup>*

55. Quelques grammes de nitrite de sodium placés dans un four à 110 °C sont séchés et refroidis dans un séchoir à gel de silice. 138 mg sont pesés sur une balance de précision, puis dissous dans 800 ml d'eau de qualité réactif dans un flacon de 1 L (classe A) avant d'être ajustés au volume. Conservée au réfrigérateur dans un flacon opaque, la solution reste stable pendant environ un mois si l'on y ajoute quelques gouttes de chloroforme.

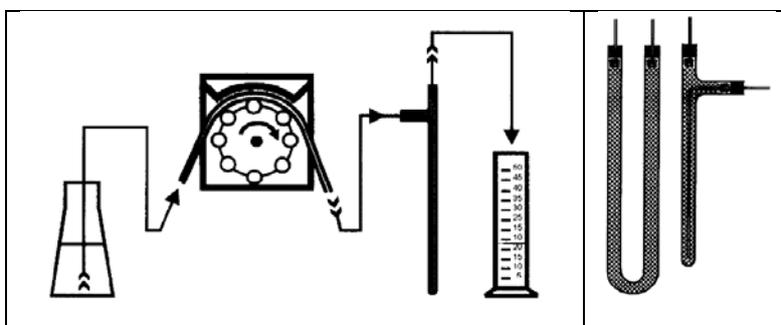
d. Préparation de l'équipement spécifique pour l'analyse :

d.1 *Entretien des cuves de réaction*

56. Les flacons de réaction contenant le mélange sulfochromique bouillant sont régulièrement lavés, rincés abondamment à l'eau de qualité réactif puis séchés. Pour l'entretien ordinaire après utilisation, les flacons sont rincés avec de l'eau de qualité réactif et placés à l'envers sur du papier filtre.

d.2. *Colonne de réduction*

57. La majeure partie de la colonne de réduction est constituée d'un tube de verre en forme de U d'une longueur totale d'environ 10-25 cm et d'un diamètre intérieur à 3 mm. Les connexions au flacon d'échantillon de 100 ml et au flacon Erlenmeyer de 25 ml (marqué) sont effectuées à partir d'un tube capillaire flexible (Tygon). L'échantillon est prélevé dans la colonne par une petite pompe péristaltique. Pour des raisons pratiques, l'ensemble peut être monté dans une boîte. Les débits appropriés doivent être déterminés par expérimentation.



**Illustration 2.** Colonne de réduction pour l'analyse des nitrates et type de colonnes.

d.3. *Préparation de la colonne de réduction*

58. Le cadmium granulé disponible dans le commerce (comme la poudre grossière pour les réducteurs de qualité - BDH) est tamisé. Une fraction entre 40 et 60 mailles (à savoir environ 0,25 et 0,42 mm) est retenue et utilisée.

59. Les granulés de cadmium tamisés sont débarrassés des oxydes par lavage dans de l'acide chlorhydrique 0,2 mol L<sup>-1</sup>. Les granules sont agités vigoureusement (pendant environ 3 minutes) dans un bécher de 200 ml avec 100 ml de la solution de sulfate de cuivre. Ensuite, les granulés de cadmium cuivrés sont rincés et agités légèrement. L'eau est ensuite décantée puis lavée à nouveau jusqu'à être exempte de cuivre finement dispersé.

60. **Le cadmium est un poison. Par conséquent, il doit être manipulé avec précaution. Sa poussière ne doit jamais être inhalée. Toutes les opérations sur métal sec sont effectuées sous une hotte.**

61. Les granulés cuivrés sont versés dans la colonne de réduction (avec de l'eau distillée et un entonnoir). L'efficacité du conditionnement est favorisée en tapotant doucement la colonne à l'aide d'un crayon. Une fois le premier bras rempli, l'entonnoir est relié au second afin de répéter la procédure. Un espace est laissé dans les deux bras latéraux afin de pouvoir y placer de la laine de verre.

62. Le cadmium est activé en passant à travers environ 250 ml de solution tampon (chlorure d'ammonium) contenant environ 100 µmol L<sup>-1</sup> de nitrate, puis rincé abondamment avec la solution tampon. Le réducteur est ensuite utilisé pour l'analyse.

63. L'efficacité de la colonne de réduction est vérifiée par l'analyse d'une solution étalon de nitrate à la concentration adaptée (par exemple équimolaire). L'absorbance déterminée est comparée à celle d'une solution de nitrite de même concentration (par exemple, si  $A_{\text{NO}_3} = 0,200$ ,  $A_{\text{NO}_2} = 0,210$ , l'efficacité de la réduction serait de  $(0,200 \times 100) / 0,210 = 95,2 \%$ ).

64. La colonne est prête à l'emploi et reste stable pendant quelques mois.

e. *Procédure analytique :*

e.1. *Réactifs à préparer lors de l'utilisation*

*Préparation de solutions étalon*

65. 5 étalons de concentration de nitrate connue sont préparés : dilution dans des flacons de 100 ml (classe A) de 10, 25, 50, 75 et 100  $\mu\text{L}$  (respectivement) de solution étalon de nitrate de potassium (mesurée à l'aide d'une pipette de précision) avec de l'eau de mer oligotrophe ou de l'eau de qualité réactif. Les concentrations nitrate sont donc comprises entre 0,5 et 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , plus la teneur en nitrate de l'eau de mer oligotrophe (si utilisée pour la dilution).

66. 3 étalons de concentration de nitrite connue sont préparés : dilution dans des flacons de 100 ml (classe A) de 50, 75 et 100  $\mu\text{L}$  (respectivement) de solution étalon de nitrite de sodium (mesurée à l'aide d'une pipette de précision) avec de l'eau de mer oligotrophe ou de l'eau de qualité réactif. Les concentrations nitrate sont donc comprises entre 1 et 2  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , plus la teneur en nitrite de l'eau de mer oligotrophe (si utilisée pour la dilution).

e.2. *Traitement analytique*

67. Si l'échantillon est congelé au moment de l'analyse, il est rapidement décongelé en utilisant un bain à 37 °C ou un four à micro-ondes (par exemple).

68. Les béchers de 100 ml contenant 50 ml d'échantillon ou chacun des étalons (mesurés à l'aide d'un cylindre gradué) sont remplis.

69. 50 ml de tampon d'ammonium (mesuré à l'aide d'un cylindre gradué) sont ajoutés et bien mélangés.

70. L'extrémité du tube capillaire est insérée dans le bécher contenant le premier échantillon à analyser.

71. La pompe péristaltique est réglée de manière à assurer un débit compris entre 2,5 et 3  $\text{ml min}^{-1}$  et démarrée en laissant l'échantillon passer à travers la colonne de réduction. Les 25 premiers ml de l'échantillon sont mis au rebut.

72. Les 25 ml suivants sont recueillis et transférés dans un flacon ou un bécher de 50 ml.

73. Les autres échantillons à analyser, les étalons de nitrate et de nitrite sont passés dans le système. Le fonctionnement de la pompe péristaltique est interrompu entre chaque opération.

74. Après le passage du dernier échantillon, la colonne de réduction est lavée avec 50 ml de tampon d'ammonium. Elle doit toujours être entièrement remplie de tampon.

75. Un sous-étalon est préparé à l'aide d'un cylindre gradué pour chaque étalon de nitrite : 12,5 ml d'étalon et 12,5 ml de tampon d'ammonium sont ajoutés dans un bécher et mélangés correctement. La préparation de ces étalons, qui ne sont pas passés par la colonne de réduction, est requise pour vérifier le degré de transformation du nitrite en composés dont l'indice d'oxydation est inférieur, indépendamment du degré d'efficacité de la colonne, sauf pour les impuretés de nitrate présentes dans l'étalon de nitrite.

76. 1 ml de réactif sulfanilamide est ajouté à chaque flacon contenant les échantillons et les trois séries d'étalons (nitrates, nitrites et nitrites non passés par la colonne de réduction) à l'aide d'un distributeur. On laisse ensuite la réaction se produire pendant 5 minutes.

77. On ajoute 1 ml de réactif NEDDC à chaque échantillon ou étalon à l'aide d'un distributeur. On laisse ensuite la réaction se produire pendant 10 minutes.

e.3. *Préparation des blancs réactifs*

78. Au moins deux répliques de blancs réactifs placés dans le même type de récipient en verre borosilicaté de 100 ml, en utilisant 50 ml d'eau de qualité réactif, sont préparées en appliquant la même procédure que pour les échantillons et les étalons (ce qui inclut le passage par la colonne de réduction).

#### e.4 Mesures spectrophotométriques

79. On mesure l'absorbance du blanc ( $bl_{c,i}$ ) de chaque cellule du spectrophotomètre ou du colorimètre utilisé pour la lecture par rapport à la cellule de référence, à 543 nm, en les remplissant d'eau sans réactif. L'opération est superflue si une seule cellule est utilisée.

80. Pour chaque flacon, le nombre de cellules utilisées et l'identification du contenu du flacon (échantillon, solution étalon, blanc) sont notés dans un formulaire. La cellule est rincée avec une partie de son contenu, remplie. L'absorbance à 543 nm est ensuite lue, puis inscrite sur le même formulaire.

81. La lecture des blancs est affectée par une petite erreur due à la différence de matrice utilisée, mais elle est généralement négligeable car elle est uniquement liée aux impuretés de nitrate dans le tampon d'ammonium.

#### f. Calculs

82. Le blanc de réactif (bl) est calculé en tant que moyenne des deux lectures de blanc.

83. La corrélation entre les valeurs d'absorbance des trois séries d'étalons et les concentrations supposées est calculée en utilisant la méthode de régression des moindres carrés ordinaires. Le facteur colorimétrique des nitrates ( $f_1$ ), des nitrites ( $f_2$ ) et des nitrites non passés par la colonne de réduction ( $f_3$ ) est représenté par les pentes.

84. L'efficacité de la colonne pour la réduction des nitrates et la préservation des nitrites présents dans l'échantillon est indiquée par les ratios  $f_1/f_2$  et  $f_2/f_3$ . Si l'efficacité de la réduction est insatisfaisante ( $< 90\%$ ), la longueur de la colonne doit être augmentée. Elle doit en revanche être réduite si le rendement en nitrites est inférieur à  $95\%$ .

85. La concentration de nitrate dans les échantillons est calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$c(\text{NO}_3^-) / \mu\text{mol L}^{-1} = (\text{ABS} - \text{bl} - \text{bl}_{c,i}) - c(\text{NO}_2^-) / f_2 \cdot f_1$$

où

$c(\text{NO}_3^-)$  = concentration de nitrate

$c(\text{NO}_2^-)$  = concentration de nitrite dans l'échantillon (dérivée de manière indépendante)

ABS = absorbance de l'échantillon

bl = blanc des réactifs

$bl_{c,i}$  = blanc de la  $i$ -ème cellule utilisée

$f_1$  = facteur colorimétrique du nitrate

$f_2$  = facteur colorimétrique du nitrite

86. Pour une cellule disposant d'un trajet optique de 50 mm, le facteur colorimétrique de nitrate est égal à environ  $8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , c'est-à-dire qu'une différence de concentration de  $2 \mu\text{mol L}^{-1}$  (par exemple entre la solution étalon 1 et 3) devrait correspondre à une différence d'absorbance d'environ 0,25.

#### g. Remarques importantes

87. Avant d'effectuer l'analyse, les caractéristiques de la colonne doivent être soigneusement vérifiées. Si des bulles d'air pénètrent dans la colonne, il est préférable de les vider et de les reconditionner, car le temps de rétention devient variable suite à l'expulsion progressive de l'air. Il est également possible de laisser la solution tampon passer à travers la colonne pendant environ 20 à 30 minutes, pour expulser la plus grande partie de l'air. Dans les deux cas, il est nécessaire de faire passer au moins une série d'étalons dans la colonne pour vérifier les éventuelles variations du rendement de la réduction.

88. La détermination du facteur  $f_2$  est superflue lorsque les concentrations de nitrites s'avèrent être d'un ordre de grandeur inférieur à celles des nitrates. Dans ce cas, il suffit de calculer le facteur colorimétrique  $f_1$  et de soustraire la concentration de nitrites des valeurs obtenues.

89. Si un grand nombre d'échantillons doit être analysé, l'efficacité de la colonne de réduction pendant l'analyse doit être vérifiée périodiquement.

*h. Problèmes éventuels*

90. la méthode proposée ne provoque ni complication ni interférence. Toutefois, le sulfure d'hydrogène, à peine présent dans les échantillons contenant du nitrate, peut être précipité sous forme de sulfure de cuivre ou de cadmium (Grasshoff, 1983).

91. L'efficacité de la colonne peut être réduite en cas de présence de concentrations de phosphates supérieures à  $2 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Olsen, 1980)<sup>15</sup>.

**3.2. Protocole pour la détermination colorimétrique automatisée de la concentration de nitrate**

*a. Réactifs*

*Tampon*

92. 10 g de chlorure d'ammonium sont dissous dans 700 ml de DDW, puis portés au volume d'un litre. Ajouter 1 ml de Brij et de l'hydroxyde de sodium à la solution de façon à obtenir un pH de 8,5. La solution est très stable.

*Sulfanilamide*

93. 10 g de sulfanilamide sont dissous dans 100 ml de HCl concentré et ajustés à 1 litre avec de la DDW. La solution doit être conservée dans un flacon en verre opaque et reste stable pendant au moins un mois.

*Dihydrochlorure d'éthylènediamine*

94. 1 g de dichlorhydrate d'éthylènediamine est dissous dans 1 L de DDW. La solution doit être conservée dans un flacon en verre opaque et reste stable pendant au moins un mois.

*b. Étalon*

51. Quelques grammes de nitrate de potassium placés dans un four à 110 °C sont séchés et refroidis dans un séchoir à gel de silice. 505,6 mg sont pesés sur une balance de précision, puis dissous dans 800 ml de DDW dans un flacon de 1 L (classe A) avant d'être ajustés au volume. Conservée au réfrigérateur dans un flacon opaque, la solution reste stable pendant environ un mois si l'on y ajoute quelques gouttes de chloroforme. Cet étalon est utilisé au quotidien pour la préparation de 5 solutions étalons à concentration plus faible.

95. La concentration des étalons mineurs est choisie en fonction de la quantité de sel de  $\text{NO}_3$  anticipée, de façon à ce que l'ensemble de sous-étalons couvre toute la gamme des concentrations attendues. À partir des 5 étalons, on obtient un facteur de multiplication nécessaire pour calculer les concentrations.

*c. Réducteur*

96. Le réducteur est composé d'un tube en verre Pyrex de 20 cm de long, d'un diamètre interne de 2 mm et plié en U.

97. Des granulés de cadmium préalablement préparés selon la procédure décrite ci-dessous sont insérés dans le tube.

98. Une partie du cadmium granulaire est tamisée pour obtenir une fraction de granules entre 0,42 et 0,60 mm, puis lavée avec 10 % de HCl et avec de la DDW. 2 g de sulfate de cuivre sont ensuite dissous dans 100 ml de DDW. Le cadmium est immergé dans la solution et agité jusqu'à ce que la coloration disparaisse. Le cadmium est lavé jusqu'à élimination totale du cuivre colloïdal lié au cadmium (couleur argentée des grains). Le tube de verre est rempli de DDW et les granulés sont

---

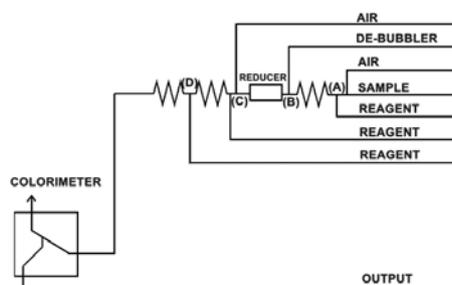
<sup>15</sup>Olsen R.J. (1980) Phosphate interference in the cadmium reduction analysis of nitrate. *Limnol. Oceanogr.*, 25, 758-760.

extraits du flacon à l'aide d'une pipette Pasteur. Une fois le réducteur rempli, de la laine de verre est introduite aux extrémités pour empêcher le cadmium de s'échapper.

99. Il existe des alternatives à l'utilisation de cadmium granulaire, comme l'utilisation de bobines de cadmium ou de parois internes recouvertes de cadmium, ou l'utilisation de bobines de polyéthylène avec un fil de cadmium placé à l'intérieur. Dans tous les cas, l'activation du cadmium avec la solution de sulfate de cuivre est nécessaire dans certaines procédures. Le sulfate de cuivre est ajouté en continu avec le tampon.

#### d. Collecteur

Le collecteur (Illustration 3) est constitué de trois injecteurs, de cinq bobines (une de 5 enroulements et quatre de 10) et d'un réducteur. Le premier injecteur (A) est équipé de trois entrées : la première pour l'échantillon, la deuxième pour les bulles d'air et la troisième pour l'introduction du premier réactif. Immédiatement après, on trouve une bobine composée de 5 enroulements dans laquelle le liquide est mélangé au tampon. À l'extrémité de la bobine se trouve un débulleur, qui a pour fonction d'éliminer les bulles du circuit pour empêcher l'air de pénétrer dans le réducteur. Il est lui-même relié au débulleur au point (B). Au point (C), après le réducteur, on trouve le deuxième injecteur équipé de trois entrées : la première pour l'échantillon à réduire de  $\text{NO}_3^-$  à  $\text{NO}_2^-$ , la deuxième pour restaurer les bulles d'air et la troisième pour introduire le second réactif. Immédiatement après, on trouve 4 bobines composées de 10 bobines chacune : dans les 2 premières, le mélange avec le deuxième réactif a lieu ; dans les 2 autres, le troisième réactif est injecté au point (D).



**Illustration 3.** Collecteur pour la mesure des nitrates.

#### e. Remarques importantes

100. Le passage d'air dans le réducteur n'est pas autorisé.

101. L'efficacité du réducteur est vérifiée en comparant l'étalon de nitrate avec celui des nitrites en suivant la méthodologie suivante : 1) Deux étalons de nitrate sont préparés : l'un à une concentration de  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ , l'autre à  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Le doublement de la concentration doit correspondre à un doublement effectif de la lecture. 2) Deux étalons de nitrate de la même concentration ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) sont préparés. Les deux étalons sont passés dans le circuit préparé pour les nitrates. Il convient de vérifier que leur valeur de lecture est identique afin de s'assurer qu'aucune réduction de la concentration des nitrites n'a eu lieu dans la colonne de cadmium.

102. Le point de bulles d'air du circuit doit être ajusté à chaque remplacement de réducteur en réglant les débits des tuyaux.

103. Il faut activer le réducteur en passant un étalon de  $\text{NO}_3^-$  avec une concentration de  $25 \mu\text{mol dm}^{-3}$  à travers le circuit à chaque remplacement.

104. Si un référentiel instable est observé lors de la mise en marche de l'appareil en l'absence de réactif, le circuit doit être lavé avec 10 % de HCl.

105. Si une hausse manifeste du référentiel est constatée au cours de l'analyse, nettoyez immédiatement la cellule de lecture du colorimètre en y injectant directement de l'acide chlorhydrique à 50 %, sans arrêter le circuit.

106. La DDW est déionisée (si possible), directement dans le réservoir d'eau de l'instrument.

107. Si le remplacement des composants du circuit (injecteurs, barboteurs) est nécessaire, il convient de rééquilibrer le circuit en modifiant les débits des tuyaux.

108. Utilisez des récipients adaptés pour les différents réactifs. Le bouchon du récipient doit être muni de petits trous permettant d'insérer des capillaires (aiguilles, etc.) pour le retrait du réactif.

109. Lorsque des étalons mixtes sont utilisés, les étalons  $\text{NO}_3^-$  (soit  $\text{NH}_4^+$  soit  $\text{NO}_2^-$ ) ne doivent jamais être combinés.

110. De l'eau pauvre en éléments nutritifs ou de l'eau oligotrophe (OSW) doit être utilisée comme eau de lavage entre les échantillons. Des OSW aux valeurs de salinité similaires à celles de l'échantillon à analyser doivent être utilisées.

111. L'étalon  $\text{NO}_2^-$  passé dans la colonne de réduction des nitrates doit avoir la même valeur de lecture que l'étalon  $\text{NO}_2^-$  analysé dans le circuit des nitrites.

112. Étant donné que la concentration des nitrates est déterminée après leur réduction en nitrites : Le cuivre-cadmium n'a pas une efficacité de réduction de 100 %. Dans certaines conditions, il réduit également les nitrites. Par conséquent, s'il était nécessaire de discriminer les deux ions, l'efficacité du réducteur devrait être déterminée avec précision à la fois pour le nitrite (à l'aide d'une solution ayant une concentration de nitrite uniquement), et pour le nitrate (à l'aide d'une solution ayant une concentration connue de nitrate uniquement).

113. Pour le paramètre décrit dans ce protocole, le symbole et l'unité suggérés par le Système international d'unités (SI), la précision attendue, ainsi que les identificateurs de méthode tels que fournis dans la bibliothèque P01 du Lexique d'utilisation des paramètres du BODC sont fournis comme suit :

**Symbole :**  $c(\text{NO}_3^-)$       **Unité :**  $\mu\text{mol L}^{-1}$

**Précision :**  $\pm 0,02$

**Précision :**  $\pm 0,02$

**LOD :** 0,03

**Identificateur de méthode :**

SDN:P01::NTRAMADZ

Concentration de nitrate {NO3- CAS 14797-55-8} par unité de volume de la masse d'eau [phase particulaire dissoute plus réactive < phase inconnue] par filtration et analyse colorimétrique manuelle et correction pour le nitrite

SDN:P01::CHEMM012

Concentration de nitrate {NO3- CAS 14797-55-8} par unité de volume de la masse d'eau [phase particulaire dissoute plus réactive] par auto-analyse colorimétrique et correction pour le nitrite

#### 4. Note technique relative à la détermination de la concentration d'ammonium

114. La détermination de la concentration d'ammonium est basée sur une série de réactions catalysées photochimiquement qui conduisent à la formation de bleu d'indophénol. La concentration du composé est ensuite mesurée par colorimétrie. La première application analytique de la formation d'indophénol à partir de phénol et d'hypochlorite a été réalisée par Berthelot (1859)<sup>16</sup>.

115. La formation de monochloramine prédomine, par rapport à celle des di- et trichloramines, pour les valeurs de pH supérieures à 7,5. L'étape suivante de la réaction consiste en l'attaque de la monochloramine sur le cycle benzénique du phénol pour former, probablement, de la chloraminoquinone. Enfin, la quinone, ou l'intermédiaire formé, produit de l'indophénol par copulation avec un autre phénol. Cette étape dépend strictement du pH, car  $\text{OH}^-$  est directement introduit dans la réaction. C'est pourquoi toutes les méthodes qui utilisent le phénol et l'hypochlorite nécessitent un environnement dont le pH est d'environ 10,5 (Ivancic et Degobbis, 1984)<sup>17</sup>.

<sup>16</sup>Berthelot, M.P. (1859) Répertoire de Chimie Appliquée, pp. 284.

<sup>17</sup>Ivancic I., Degobbis D. (1984) An optimal manual procedure for ammonia analysis in natural waters by indophenol blue method. Water Res., 18, 1143-1147.

116. Enfin, étant donné l'importance du contrôle du pH dans le développement de la réaction (Sasaki et Sawada, 1980)<sup>18</sup>, l'effet salin significatif (rendement différent de la réaction en eau douce ou salée) qui se produit dans cette méthode (Koroleff, 1983)<sup>19</sup> dépend largement de la capacité tampon de la matrice de l'échantillon. Pour cette raison, la méthode peut être appliquée à des échantillons collectés dans des environnements estuariens, où les variations d'alcalinité sont fortes, en tamponnant la solution de manière adéquate (Mantoura et Woodward, 1983)<sup>20</sup>.

117. La procédure décrite ici suit principalement les méthodes décrites par Grasshoff et Johansen (1973)<sup>21</sup> et par Koroleff (1983), telles que décrites par Hansen et Koroleff (1999)<sup>22</sup>. Elle est adaptée dans le présent manuel à partir du précédent (PNUE/MAP/MED POL, 2005).

118. Dans le cadre de cette Note technique en lien avec la détermination de la concentration d'ammonium, les présentes Directives de surveillance fournissent les protocoles de l'IMAP suivants pour la détermination colorimétrique de la concentration d'ammonium :

- Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration d'ammonium ;
- Protocole pour la détermination colorimétrique automatisée de la concentration d'ammonium ;

#### **4.1. Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration d'ammonium.**

##### *a. Équipement :*

119. L'équipement pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration de nitrate comprend :

1. cylindres gradués ou pipettes de 50 ml ;
2. récipients en verre borosilicaté de 100 ml (bécher) ;
3. verrerie de laboratoire pour les préparations chimiques ;
4. distributeur automatique de 1 ml ;
5. flacons jaugés de 1000 ml et 500 ml ;
6. flacons jaugés de classe A de 100 ml ;
7. flacons jaugés de classe A de 1 L ;
8. micropipettes de précision pour mesurer des volumes compris entre 10 et 100 µL ;
9. échelle analytique ;
10. poêle ;
11. four à micro-ondes ;
12. sécheur ;
13. spectrophotomètre ou colorimètre sensible à 543 nm équipé de cellules avec trajet optique d'au moins 50 mm (100 mm idéalement) ;

##### *b. Produits chimiques :*

1. Les produits chimiques pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration de nitrate comprennent : mélange sulfochromique ;
2. acide chlorhydrique concentré [HCl] ;
3. hydroxyde de sodium [NaOH] ;
4. persulfate de potassium [K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>] ;
5. phénol [C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH] ;
6. disodium EDTA [C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub>] ;

<sup>18</sup>Sasaki K., Sawada Y. (1980) Determination of ammonia in estuary. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 46, 319-321.

<sup>19</sup>Koroleff F. (1983) Determination of ammonia. In: "Methods of seawater analysis", Grasshoff K., M. Ehrhardt, K. Kremling Eds, Verlag Chemie, Weinheim, 150-175.

<sup>20</sup>Mantoura R.F.C., Woodward E.M.S. (1983) Optimization of the indophenol blue method for the automated determination of ammonia in estuarine water. Eustar. Coast. Shelf, Sci., 17, 219-229.

<sup>21</sup>Grasshoff K., Johansen H. (1972) A new automatic and direct method for the automatic determination of ammonia in sea water. J. Cons. Int. Explor. Mer, 34, 516-521.

<sup>22</sup>Hansen H.P., Koroleff, F. (1999) Determination of nutrients. In Methods of Seawater Analysis. K. Grasshoff, K. Kremling and M. Ehrhardt (eds) 3rd Edition Wiley-VCH Weinheim pp159-228.

7. acide dichloroisocyanurique de sodium [ $C_3HCl_2N_3NaO_3$ ] ;
8. nitroprussiate de sodium dihydraté [ $Na_2Fe(CN)_5NO \cdot 2H_2O$ ] ;
9. citrate trisodique dihydraté [ $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ] ;
10. chlorure d'ammonium [ $NH_4Cl$ ] ;
11. hydroxyde d'ammonium [ $NH_4OH$ ] ;
12. chloroforme [ $CHCl_3$ ] ;

c. Préparation de solutions mères :

*Une eau « sans ammoniac »*

120. Il n'existe aucune procédure standard pour la préparation d'eau à très faible teneur en ammoniac. L'eau déionisée peut parfois être utilisée sans distillation ultérieure, mais il est à noter que les échangeurs d'ions (résines) peuvent potentiellement produire des substances organiques et de l'ammoniac. Si les concentrations des blancs d'ammoniac sont supérieures à  $0,3 \mu mol L^{-1}$ , l'eau doit être distillée ultérieurement. Dans cette deuxième étape, 0,3 g de NaOH et 1 g de  $K_2S_2O_8$  sont ajoutés à 1 000 ml d'eau (dans un flacon de 2 L). La solution doit être portée à ébullition pendant 10 minutes pour éliminer l'ammoniac (sans le condenseur), puis distillée jusqu'à obtention d'un résidu d'environ 150 ml. L'eau distillée doit être conservée dans un récipient hermétique, de préférence en verre. La méthode de préparation de l'eau sans ammoniac doit être régulièrement vérifiée. De plus, des blancs appropriés doivent être analysés avec chaque lot d'échantillons. Comme alternative, les « eaux de surface prélevées en haute mer » peuvent être utilisées comme eau « sans ammoniac ».

*Solution tampon*

121. 240 g de citrate trisodique dihydraté ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ), 20 g d'EDTA disodique ( $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$ ) et 0,4 g de NaOH sont dissous dans environ 600 ml d'eau distillée. La solution est portée à ébullition (pour éliminer l'ammoniac) jusqu'à ce que son volume soit inférieur à 500 ml. Elle est ensuite refroidie et diluée à 500 ml avec de l'eau « sans ammoniac ». La solution est stable et doit être conservée dans une bouteille en polyéthylène hermétique.

*Réactif au phénol*

122. 80 g de phénol incolore ( $C_6H_5OH$ ) sont dissous dans 300 ml d'éthanol, puis ajoutés à 600 ml d'eau distillée et 600 mg de nitroprussiate de sodium dihydraté ( $Na_2Fe(CN)_5NO \cdot 2H_2O$ ) dans de l'eau « sans ammoniac », puis dilués à 1 000 ml. Conservée au réfrigérateur dans un flacon opaque et hermétique, la solution devrait rester stable pendant plusieurs mois. **Le phénol est un composé particulièrement toxique : il convient de porter des lunettes et des gants de sécurité lors de la manipulation, qui devra être effectuée sous une hotte de laboratoire.**

*Hypochlorite réactif*

123. 1 g d'acide dichloroisocyanurique de sodium ( $C_3HCl_2N_3NaO_3$  ; dichloro-s-triazine-2, 3, 6 (1H, 3H, 5H)-trione) et 8 g de NaOH sont dissous dans de l'eau « sans ammoniac » et dilués à 500 ml. L'acide dichloroisocyanurique de sodium, utilisé comme donneur d'hypochlorite (par rapport aux solutions d'hypochlorite commerciales généralement utilisées), a l'avantage d'être un solide stable facile à préparer. La solution doit être conservée dans un flacon opaque et reste stable pendant au moins une semaine.

*Solution mère d'ammoniac (A) ( $10 mmol L^{-1} NH_3$ )*

124. Le chlorure d'ammonium ( $NH_4Cl$ ) est séché à  $100^\circ C$  à poids constant. 0,0535 g de  $NH_4Cl$  sont ensuite dissous dans de l'eau « sans ammoniac » et dilués à 100 ml dans une fiole volumétrique. Conservée dans un flacon en verre (à l'abri de la lumière du soleil) et au réfrigérateur, la solution devrait rester stable pendant au moins plusieurs semaines.

*Solution de travail à l'ammoniac (B) ( $100 \mu mol L^{-1} NH_3$ )*

125. Exactement 10,0 ml de la solution mère sont dilués avec de l'eau « sans ammoniac » à un volume final de 1 000 ml dans une fiole volumétrique en verre.

d. Préparation de l'équipement spécifique pour l'analyse :

#### *d.1 Traitement des cuves de réaction*

126. Tous les flacons et tubes à utiliser doivent être nettoyés avec du HCl chaud, bien rincés à l'eau « sans ammoniac » et rester fermés entre les analyses. L'analyse doit être effectuée dans une pièce bien ventilée où aucune solution ammoniacale n'est stockée. (**Remarque** : cela inclut tout produit de nettoyage contenant de l'ammoniac et utilisé par le personnel de nettoyage du laboratoire, pendant ou en dehors des heures de travail.) Cela inclut le réactif  $\text{NH}_4\text{Cl}$  utilisé pour l'analyse des nitrates. **Il est interdit de fumer.**

127. Alternative : Avant utilisation, toutes les fioles doivent être traitées en y réalisant la réaction avec l'ajout de réactifs chimiques à l'« eau sans ammoniac » ou à l'« eau de surface prélevée en haute mer ». La réaction doit durer au moins 6 heures. Les flacons doivent être secoués périodiquement pendant cette période. Ensuite, le flacon doit être rincé à l'eau sans ammoniac et rester fermé hermétiquement lorsqu'il n'est pas utilisé. Les flacons ne doivent pas être lavés entre l'analyse de différents ensembles d'échantillons/étalons, mais simplement rincés à l'eau « sans ammoniac » et rester fermés.

#### *e. Procédure analytique :*

##### *e.1. Réactifs à préparer lors de l'utilisation*

###### *Préparation de solutions étalon*

128. 7 étalons de concentration d'ammoniac connue sont préparés : respectivement 0,5, 1, 2, 3, 5, 7 et 10 ml de solution de travail d'ammoniac (B) (mesurés à l'aide d'une pipette de précision) sont dilués avec de l'eau « sans ammoniac » ou de « l'eau de surface prélevée en haute mer » dans des flacons de 100 ml (classe A), en remplissant jusqu'à la graduation des 100 ml. Les concentrations d'ammoniac se situent donc entre 0,5 et 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Dans ce cas, il est probablement préférable de ne pas utiliser d'eau de mer à faible teneur en éléments nutritifs, sauf si elle présente une concentration d'ammoniac suffisamment faible.

##### *e.2. Traitement analytique*

129. Si l'échantillon est congelé au moment de l'analyse, il est rapidement décongelé en utilisant un bain à 37 °C ou un four à micro-ondes (par exemple).

130. Les flacons contenant une aliquote d'échantillons ou de solutions étalon de différentes concentrations sont pré-rincés.

131. Les flacons contenant 50 ml d'échantillon ou chacun des étalons (mesurés à l'aide d'un cylindre gradué) sont remplis.

132. 2 ml de réactif au phénol, 1 ml de solution tampon et 2 ml de réactif à l'hypochlorite sont ajoutés. La solution est mélangée en faisant tourbillonner les ajouts. Les flacons de réaction sont correctement fermés et conservés dans un endroit sombre pendant le temps de réaction qui est d'au moins 6 heures à température ambiante, mais qui est réduit à 30 minutes si les échantillons sont incubés dans un bain-marie à 37 °C  $\pm$  1 °C. Notez que les étalons et les échantillons d'une même série doivent être traités simultanément et de la même manière.

##### *e.3. Préparation des blancs réactifs*

133. Deux flacons de 100 ml sont remplis avec respectivement 50 et 47,5 ml d'eau distillée ou d'« eau de surface prélevée en haute mer ».

134. 1 ml de solution tampon et 2 ml de réactif à l'hypochlorite sont ajoutés aux 2 premiers ml de réactif au phénol. 1,5 ml de solution tampon et 3 ml de réactif à l'hypochlorite sont ajoutés aux autres 3 ml de réactif au phénol. Les solutions sont mélangées en les faisant tourbillonner entre les ajouts. Les flacons de réaction sont correctement fermés et conservés dans un endroit sombre pendant le temps de réaction, identique à celui des échantillons et des étalons.

##### *e.4 Mesures spectrophotométriques*

135. On mesure l'absorbance du blanc ( $bl_{c,i}$ ) de chaque cellule du spectrophotomètre ou du colorimètre utilisé pour la lecture par rapport à la cellule de référence, à 630 nm, en les remplissant d'eau sans réactif. L'opération est superflue si une seule cellule est utilisée.

136. Pour chaque flacon, le nombre de cellules utilisées et l'identification du contenu du flacon (échantillon, étalon, blanc) sont notés dans un formulaire. La cellule est rincée avec une partie de son contenu, remplie. L'absorbance à 630 nm est ensuite lue, puis inscrite sur le même formulaire.

*f. Calculs :*

137. Le blanc de réactif (bl) est calculé en tant que différence moyenne entre les valeurs des deux blancs.

138. La corrélation entre les valeurs d'absorbance des 7 étalons et les concentrations supposées est calculée en utilisant la méthode de régression des moindres carrés ordinaires. Le facteur colorimétrique (f) est représenté par la pente. Il couvre une plage de concentration de 0,5 à 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

139. La concentration d'ammoniac dans les échantillons est calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$c(\text{NH}_4) / \mu\text{mol L}^{-1} = (\text{ABS} - \text{bl} - \text{bl}_{c,i}) f$$

où

$c(\text{NH}_4)$  = concentration d'ammoniac

ABS = absorbance de l'échantillon

bl = blanc des réactifs

$bl_{c,i}$  = blanc de la i-ème cellule utilisée

f = facteur colorimétrique

140. Comme nous l'avons déjà mentionné, pour une concentration donnée d'ammonium, la couleur bleue produite dans l'eau de mer est moins intense que dans l'eau distillée. Ainsi, pour chaque échantillon, une correction doit être apportée en ce qui concerne sa salinité et le pH qui en résulte. Dans de nombreux cas, une simple correction (Hansen et Koroleff, 1999) peut être utilisée lorsque la correction est obtenue comme suite :

$$c(\text{NH}_4)_{\text{corr}} / \mu\text{mol L}^{-1} = [1 + 0.0073 S_s] c(\text{NH}_4)_{\text{uncorr}}$$

où

$S_s$  = salinité de l'échantillon.

*g. Remarques importantes :*

141. La méthode est très sensible aux effets d'une éventuelle contamination de la verrerie ou des réactifs. Il est donc recommandé de respecter scrupuleusement les instructions de lavage fournies et d'utiliser les produits chimiques recommandés.

142. L'environnement de travail ne doit jamais être exposé à la fumée. Aucun réactif pouvant libérer de l'ammoniac ne doit se trouver à proximité.

*h. Problèmes éventuels :*

143. Les interférences des acides aminés et de l'urée (dans l'eau de mer) peuvent être négligées. Elles peuvent toutefois être significatives dans les eaux estuariennes ou saumâtres, en particulier si ces dernières sont contaminées par les déchets urbains.

144. Le sulfure d'hydrogène peut être toléré jusqu'à environ 60  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Les échantillons présentant des concentrations plus élevées de  $\text{H}_2\text{S}$  doivent être dilués.

145. La couleur bleue de l'indophénol est toutefois influencée par la salinité, qui doit être compensée par l'application d'un facteur de salinité (voir ci-dessus).

## 4.2. Protocole pour la détermination colorimétrique automatisée de la concentration d'ammonium

### a. Réactifs

#### Tampon

146. Le tampon est composé de 120 g de trisodiocitrate, dissous dans 500 ml de DDW, et ajustés à 1 L. L'hydroxyde de sodium doit être ajouté à cette solution de façon à obtenir un pH de 11. Ce réactif doit être conservé dans une bouteille en verre et reste très stable.

#### Réactif au phénol

147. 35 g de phénol et 0,40 g d'acide dichloroisocyanurique de sodium sont dissous dans 800 ml de DDW et ajustés à 1 000 ml. Ce réactif reste stable pendant 24 heures.

#### Réactif à l'hypochlorite

148. 5 g d'hydroxyde de sodium et 1 g de dichloroisocyanurate sont dissous dans 400 ml de DDW et ajustés à 500 ml. Ce réactif doit être conservé dans une bouteille en verre à une température de + 4 °C. Il reste stable pendant une semaine.

### b. Étalons

149. Environ 2 g de chlorure d'ammonium sont séchés dans un four à une température de 100 °C jusqu'à atteindre un poids constant, puis placés dans un séchoir à gel de silice pendant 24 heures. Le chlorure d'ammonium est dissous dans de la DDW dans une proportion telle qu'une concentration de 2 mmol L<sup>-1</sup> est obtenue. Cet étalon est utilisé au quotidien pour la préparation de 5 solutions étalons à concentration plus faible.

150. La concentration des étalons mineurs est choisie en fonction de la quantité de sel de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> anticipée, de façon à ce que l'ensemble de sous-étalons couvre toute la gamme des concentrations attendues. À partir des 5 étalons, on obtient un facteur de multiplication nécessaire pour calculer les concentrations.

### c. Collecteur

151. Le collecteur (Illu. 4) est constitué de trois injecteurs, de trois bobines de 10 enroulements chacune, d'un bain thermostatique et d'un piège contenant 10 % d'acide chlorhydrique. Le premier injecteur (A) est équipé de trois entrées : la première pour l'échantillon, la deuxième pour les bulles d'air, par lequel le liquide est séparé en trois volumes équivalents, et la troisième pour l'introduction du premier réactif. Immédiatement après, on trouve 2 bobines constituées de 10 bobines chacune : dans la première, le liquide est mélangé au tampon ; dans le second, au point (B), le deuxième réactif est injecté. Au point (C), le troisième réactif est injecté. Pour accélérer la production de bleu d'indophénol, la solution est passée dans une bobine immergée dans un bain thermostat (D) à une température de 75 °C. À la sortie du bain, au point (E), la solution est refroidie en passant dans la dernière bobine. L'air servant à produire les bulles d'air est introduit dans le circuit par un piège (F) contenant 10 % de HCl. Cette mesure est adoptée pour garantir l'élimination de toute vapeur d'ammoniac contenue dans l'air des laboratoires

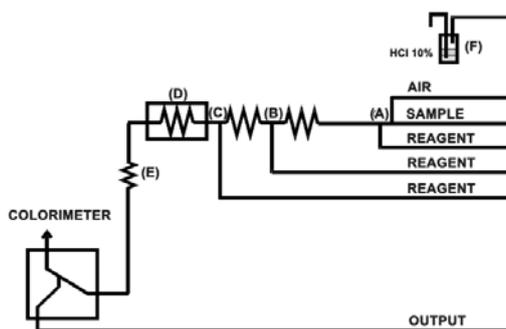


Illustration 4. Collecteur pour la mesure d'ammonium.

a. Remarques importantes

152. Le référentiel doit être stable. Si des fluctuations, même minimales, sont constatées, cela signifie que du floculat s'est formé dans l'échantillon en raison de l'instabilité du phénol ;
153. les réactifs sont insérés un à la fois, dans un ordre strict, du premier au troisième mât ;
154. le circuit doit être lavé lors de l'élimination progressive des réactifs, du troisième au premier ;
155. si l'on observe la formation d'un précipité près de l'injecteur d'hypochlorite, c'est que le circuit est probablement sale ou que le tampon est inefficace ;
156. si un référentiel instable est observé lors de la mise en marche de l'appareil en l'absence de réactif, le circuit doit être lavé avec 10 % de HCl ;
157. si une hausse manifeste du référentiel est constatée au cours de l'analyse, nettoyez immédiatement la cellule de lecture du colorimètre en y injectant directement de l'acide chlorhydrique à 50 %, sans arrêter le circuit ;
158. la DDW est déionisée (si possible), directement dans le réservoir d'eau de l'instrument ;
159. si la température ambiante est supérieure à + 20 °C, un dissipateur thermique doit être installé sur la bobine de refroidissement ;
160. si le remplacement des composants du circuit (injecteurs, barboteurs) est nécessaire, il convient de rééquilibrer le circuit en modifiant les débits des tuyaux ;
161. Utilisez des récipients adaptés pour les différents réactifs. le bouchon du récipient doit être muni de petits trous permettant d'insérer des capillaires (aiguilles, etc.) pour le retrait du réactif ;
162. lorsque des étalons mixtes sont utilisés, les étalons  $\text{NO}_3^-$  (soit  $\text{NH}_4^+$  soit  $\text{NO}_2^-$ ) ne doivent jamais être combinés ;
163. De l'eau pauvre en éléments nutritifs ou de l'eau oligotrophe (OSW) doit être utilisée comme eau de lavage entre les échantillons. Des OSW aux valeurs de salinité similaires à celles de l'échantillon à analyser doivent être utilisées.

a. Symbole, unités et précision

164. Pour le paramètre décrit dans ce protocole, le symbole et l'unité suggérés par le Système international d'unités (SI), la précision attendue, ainsi que les identificateurs de méthode tels que fournis dans la bibliothèque P01 du Lexique d'utilisation des paramètres du BODC sont fournis comme suit :

**Symbole :**  $c(\text{NH}_4^+)$

**Unité :**  $\mu\text{mol L}^{-1}$

**Précision :**  $\pm 0,02$

**Précision :**  $\pm 0,02$

**LOD :** 0,03

**Identificateur de méthode :**

SDN:P01::AMONMATX

Concentration d'ammonium  $\{\text{NH}_4^+$  CAS 14798-03-9} par unité de volume de la masse d'eau [phase particulaire dissoute plus réactive] par analyse colorimétrique manuelle

SDN:P01: AMONAADZ

Concentration d'ammonium  $\{\text{NH}_4^+$  CAS 14798-03-9} par unité de volume de la masse d'eau [dissoute plus particules réactives < phase inconnue] par filtration et auto-analyse colorimétrique

**Annex I**  
**Références**

## Références

Grasshoff, K., Kremling, K., Ehrhardt, M. (eds), 1999. *Methods of Seawater Analysis* 3<sup>rd</sup> Edition Wiley-VCH Weinheim, 634 pp.

Strickland J.J., Parsons T., 1965. *A manual of sea water analysis: with special reference to the more common micronutrients and to particulate organic material*. Fisheries Research Board of Canada, 311 pp.

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*.

### Nitrite

Airey D., Dal Pont G., Sandars G. (1984) A method of determining and removing sulphide to allow the determination of sulphate, phosphate, nitrite and ammonia by conventional methods in small volumes of anoxic waters. *Analytica Chim. Acta*, 166, 79-92.

Bendschneider K., Robinson R.J. (1952) A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *J. Mar. Res.*, 11, 87-96.

Grasshoff, K. (1983) Determination of nitrite. In: "Methods of Seawater Analysis", Grasshoff K., M. Ehrhardt, K. Kremling Eds, Verlag Chemie, Weinheim, 139-142.

Ilosvay L. (1889) Determination of nitrite in saliva and exhaled air. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 2, 388-391.

Shinn M.B. (1941) A colorimetric method for the determination of nitrite. *Ind. Eng. Chem Anal. Ed.*, 13, 33-35.

### Nitrate

Grasshoff K. (1983) Determination of nitrate. In: "Methods of Seawater Analysis", Grasshoff K., M. Ehrhardt, K. Kremling Eds, Verlag Chemie, Weinheim, 143-150.

Morris A.W., Riley J.P. (1963) The determination of nitrate in sea water. *Analytica Chim. Acta*, 29, 272-279.

Nydhal F. (1976) On the optimum conditions for the reduction of nitrate to nitrite by cadmium. *Talanta*, 23, 349-357.

Olsen R.J. (1980) Phosphate interference in the cadmium reduction analysis of nitrate. *Limnol. Oceanogr.*, 25, 758-760.

### Ammonium

Berthelot, M.P. (1859) *Repertoire de Chemie Appliquée*, pp. 284.

Grasshoff K., Johannsen H. (1972) A new automatic and direct method for the automatic determination of ammonia in sea water. *J. Cons. Int. Explor. Mer*, 34, 516-521.

Hansen H.P., Koroleff, F. (1999) Determination of nutrients. In *Methods of Seawater Analysis*. K. Grasshoff, K. Kremling and M. Ehrhardt (eds) 3rd Edition Wiley-VCH Weinheim pp159-228.

Ivancic I., Degobbis D. (1984) An optimal manual procedure for ammonia analysis in natural waters by indophenol blue method. *Water Res.*, 18, 1143-1147.

Koroleff F. (1983) Determination of ammonia. In: "Methods of seawater analysis", Grasshoff K., M. Ehrhardt, K. Kremfing Eds, Verlag Chemie, Weinheim, 150-175.

Mantoura R.F.C., Woodward E.M.S. (1983) Optimization of the indophenol blue method for the automated determination of ammonia in estuarine water. *Eustar. Coast. Shelf, Sci.*, 17, 219-229.

Sasaki K., Sawada Y. (1980) Determination of ammonia in estuary. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 46, 319-321.