NATIONS UNIES

EP

UNEP/MED WG.509/19

ONU programme pour l'environnement

Plan d'action pour la Méditerranée
Convention de Barcelone

29 juillet 2021
Français
Original : anglais

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 : phosphore et composés de silice

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.

PNUE/PAM
Athènes, 2021

Table des matières

1. Introduction 1
2. Note technique pour la détermination de la concentration d'orthophosphate 2
2.1. Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration d'orthophosphate 3
2.2. Protocole pour la détermination colorimétrique automatisée de la concentration d'orthophosphate 7
3. Note technique pour la détermination de la concentration d'orthosilicate 9
3.1. Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration d'orthosilicate 10
3.2. Protocole pour la détermination colorimétrique automatisée de la concentration d'orthosilicate 14
4. Note technique pour une détermination combinée de la concentration d'azote total et de phosphore total 15
4.1. Protocole pour la préparation d'échantillons en vue d'une détermination combinée de la concentration d'azote total et de phosphore total 16
4.2. Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle combinée de la concentration d'azote total et de phosphore total 17
4.3. Protocole pour la détermination colorimétrique automatisée combinée de la concentration d'azote total et de phosphore total 20

Annexes:

Annexe I: Automated methods for determination of concentration of key nutrients in seawater – Calculation of the concentration

Annexe II : 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.

En vue de soutenir les efforts nationaux, les présentes lignes directrices de surveillance pour la détermination de la concentration des principaux nutriments dans l'eau de mer – composés de phosphore et de silice fournissent les sept protocoles regroupés sous l'arborescence des notes techniques pour la détermination de la concentration en nitrite, nitrate et ammonium dans l'eau de mer, comme suit : a) Note technique pour la détermination de la concentration d'orthophosphate, comprenant les éléments suivants : Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration d'orthophosphate, et Protocole pour la détermination colorimétrique automatisée de la concentration d'orthophosphate ; b) Note technique pour la détermination de la concentration d'orthosilicate, comprenant les éléments suivants : Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration d'orthosilicate, et Protocole pour la détermination colorimétrique automatisée de la concentration d'orthosilicate ; et c) Note technique pour une détermination combinée de la concentration d'azote total et de phosphore total, comprenant les éléments suivants : Protocole pour la préparation d'échantillons en vue d'une détermination combinée de la concentration d'azote total et de phosphore total ; Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle combinée de la concentration d'azote total et de phosphore total ; Protocole pour la détermination colorimétrique automatisée combinée de la concentration d'azote total et de phosphore total.

Les lignes directrices/protocoles de surveillance pour les indicateurs communs 13 et 14 de l'IMAP, y compris ceux relatif aux nutriments clés dans l'eau de mer – composés de phosphore et de silice, 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

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

1. Introduction

1. Les lignes directrices pour la surveillance des nutriments clés – composés de phosphore et de silice dans l'eau de mer contiennent des protocoles pour la détermination manuelle et automatisée de la concentration d'orthophosphate et d'orthosilicate ainsi que de phosphore total et d'azote total. La propriété la plus importante de l'eau de mer en termes d'effet sur la vie dans l'environnement marin est probablement la concentration de nutriments dissous. Les plus essentiels de ces nutriments sont l'azote et le phosphore, car ils jouent un rôle majeur dans la stimulation de la production primaire par le 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 du bon état écologique (BEE) au regard de l'objectif écologique 5, relatif à l'eutrophisation, est basé sur la concentration en chlorophylle *a*, comme présenté en détail dans les fiches d'orientation de l'IMAP (PNUE/PAM, 2019)[1]. Dans un avenir proche, il est cependant prévu de compléter ce système par des orientations sur la concentration des principaux nutriments dans l'eau de mer.

2. Les protocoles IMAP élaborés dans le cadre des présentes lignes directrices de surveillance pour la détermination de la concentration des principaux nutriments dans l'eau de mer – composés de phosphore et de silice fournissent des conseils détaillés sur l'équipement nécessaire, les réactifs chimiques, les procédures analytiques ainsi que les méthodologies appropriées pour mesurer la concentration de nitrite, de nitrate et d'ammonium dans l'eau de mer, ainsi que les calculs, la transformation des données si nécessaire et l'identification des points faibles. Tous ces éléments sont étayés par des observations importantes et une description des problèmes éventuels. Toutefois, ces protocoles sont conçus pour être non pas des manuels de formation analytique, mais des lignes directrices pour les laboratoires méditerranéens, qu'il convient de tester et de modifier en conséquence, si nécessaire, afin d'en valider les résultats finaux.

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)[2] et sur les systèmes d'assurance qualité des données (PNUE/PAM, 2019b)[3], 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)[4], tout en fournissant des procédures détaillées qui sont pertinentes pour la mise en œuvre de l'IMAP. Les détails des protocoles de détermination des nutriments clés permettent de répondre aux besoins des mesures tant dans les zones off-shore que dans les zones côtières étroites.

4. Dans les sous-chapitres « Symbole, unités et précision » à la fin de chaque protocole, pour tous les paramètres qui y sont décrits, le symbole et l'unité suggérés par le Système international d'unités (SI) sont présentés. L'exactitude, la précision et, si possible, la limite de détection (LD) attendues sont également présentées. Un identificateur de méthode est par ailleurs présenté tel qu'il est fourni dans la bibliothèque P01 du Vocabulaire d'utilisation des paramètres du British Oceanographic Data Centre (BODC), respectivement inclus dans les Dictionnaires de données et dans les Normes de données pour l'eutrophisation intégrés au Système d'information pilote IMAP.

Le diagramme ci-dessous indique la catégorie des présentes lignes directrices de surveillance relatives à la détermination de la chlorophylle *a* dans l'eau de mer 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.

[1](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.
[2] (UNEP/MAP, 2019a), UNEP/MED WG.463/6. Monitoring Protocols for IMAP Common Indicators related to pollution.
[3] (UNEP/MAP, 2019b), UNEP/MED WG.46710. Schemes for Quality Assurance and Control of Data related to Pollution
[4] (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.

a. Méthodes à flux continu

5. Le principe utilisé par les auto-analyseurs à flux segmenté continu (SFA) est reconnu comme la méthode la plus fiable et la plus précise pour la détermination des nutriments. Différents systèmes sont disponibles et peuvent être configurés de manière à correspondre aux méthodes standard, telles que les normes ISO, EPA, ASTM, etc. Dans la mesure du possible, il est fortement recommandé d'utiliser ces analyseurs en raison de l'augmentation considérable de la précision et du débit d'échantillons qu'ils proposent. Idéalement, de tels analyseurs peuvent être utilisés dans les laboratoires à bord des navires de recherche, ce qui permet d'éviter les problèmes de détérioration des échantillons pendant le stockage.

La multiplicité des méthodes rapportées dans la littérature est davantage liée à l'optimisation des méthodes dans différents environnements qu'à une différence significative des réactions utilisées. Dans les protocoles consacrés aux différentes méthodes, certains aspects spécifiques seront mentionnés. En ce qui concerne les principes généraux des systèmes SFA, en plus de la documentation fournie par les fabricants, il est possible de se référer aux manuels classiques de Strickland et Parsons (1965)[5] et de Grasshoff et al. (1999)[6]. Il existe également de nombreux rapports techniques produits par différents laboratoires pour homogénéiser les méthodes au sein des programmes internationaux, tels que JGOFS ou WOCE. Dans les protocoles, seule l'indication la plus essentielle sur la méthode la plus fréquemment utilisée sera fournie. Des observations importantes sur les parties essentielles des méthodes seront également incluses, pour permettre la réussite de leur application.

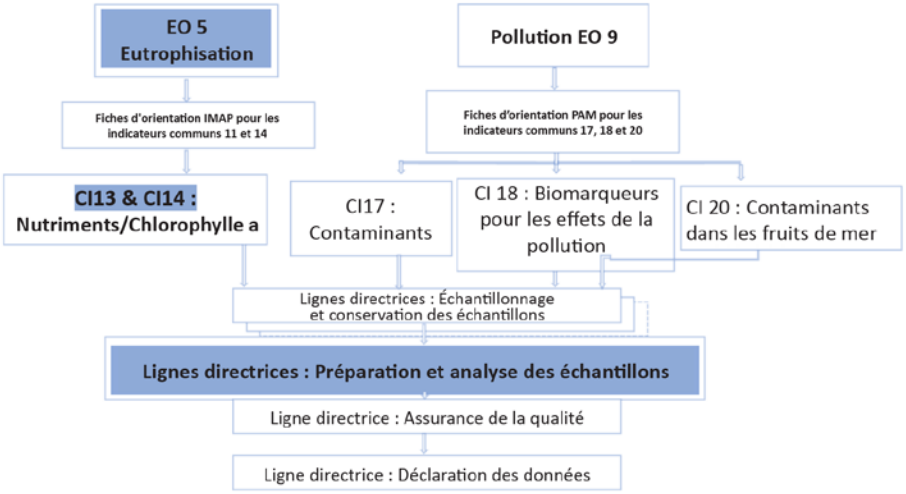

Diagramme de flux : lignes directrices pour la surveillance des objectifs écologiques 5 et 9 de l'IMAP

2. Note technique pour la détermination de la concentration d'orthophosphate

6. Cette méthode est basée sur la formation d'un complexe phosphomolybdique bleu (du groupe du bleu de molybdène) dont la concentration est mesurée par colorimétrie (spectrophotomètre ou colorimètre) (Deniges, 1920)[7]. Les aspects pertinents pour le développement du complexe phosphomolybdique sont résumés ci-dessous : L'ion molybdate et ses polymères forment, dans un environnement acide, des hétéropolyacides stables avec des éléments des groupes IV et V (Boltz et Mellon, 1947[8]). L'acide phosphomolybdique est un complexe jaune. La réduction du molybdate de

[5]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.
[6]Grasshoff, K., Kremling, K., Ehrhardt, M. (eds), 1999. Methods of Seawater Analysis 3rd Edition Wiley-VCH Weinheim, 634 pp.
[7]Deniges M.G. (1920) Reaction de coloration extrêmement sensible des phosphates et des arseniates. Ses applications. C. R. Acad. Sci., Paris, 171, 802-804.
[8]Boltz D.F., Mellon M.G. (1947) Determination of phosphorus, germanium, silicon, and arsenic by the heteropolyblue method. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 19, 873-877.

Mo (VI) à Mo (V) dans ce complexe produit un hétéropolyacide de couleur bleue. Le pic d'absorbance maximum varie selon le type d'agent réducteur utilisé, probablement en fonction de la variation du rapport entre Mo (VI) et Mo (V) dans son ensemble et du type d'agrégation des unités de base dans la solution.

7. Murphy et Riley (1962)[9] ont introduit, dans la procédure de détermination des phosphates dans l'eau de mer, l'utilisation d'un sel d'antimoine trivalent, qui entre dans l'hétéropolyacide selon un rapport d'environ 1:1 avec le phosphore. Cette modification induit un déplacement de l'absorbance maximale vers l'infrarouge, avec une augmentation du coefficient d'extinction molaire et une augmentation drastique du taux de formation. La réduction ultérieure se fait par l'acide ascorbique, ce qui permet d'éliminer les dépendances de la force ionique (effet salin) et de la température (Murphy et Riley, 1958[10], 1962). En vue de minimiser l'interférence d'autres ions qui réagissent de manière similaire avec les molybdates, il est nécessaire de maintenir le pH de la solution finale en dessous de 1, une condition dans laquelle la formation d'hétéro-polyacides avec Si et As est nettement désavantagée (Koroleff, 1983)[11].

8. La présente note fournit une description de la méthodologie de Murphy et Riley (1962), telle que rapportée par Strickland et Parsons (1968).

9. Dans le cadre de la présente note technique, les lignes directrices de surveillance fournissent les protocoles IMAP suivants pour la détermination colorimétrique de la concentration d'orthophosphate :

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

2.1. Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration d'orthophosphate

a. Équipement

10. L'équipement utilisé pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration d'orthophosphate comprend :

1. des cylindres gradués ou des pipettes de 50 ml
2. des récipients en verre borosilicaté de 100 ml (de préférence des flacons avec bouchon)
3. de la verrerie de laboratoire pour les préparations chimiques
4. un distributeur automatique de 5 ml
5. des flacons jaugés de 50, 250 et 500 ml
6. des flacons jaugés de 100 ml de classe A
7. un flacon jaugé d'1 L de classe A
8. des micropipettes de précision pour mesurer des volumes compris entre 10 et 100 µL
9. une balance analytique
10. un poêle
11. un four à micro-ondes
12. un sécheur
13. un spectrophotomètre ou un colorimètre sensible à 880 nm (en retour 705 nm), équipé de cellules d'au moins 50 mm de trajet optique

b. Produits chimiques

11. Les produits chimiques utilisés pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration d'orthophosphate comprennent :

1. un mélange sulfochromique
2. de l'acide sulfurique concentré [H_2SO_4]
3. du tétrahydrate d'heptamolybdate d'ammonium [$(NH_4)\ 6Mo_7O_{24}\text{-}4H_2O$]

[9]Murphy J., Riley J.P. (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Analytica Chim. Acta, 27, 31-36.
[10]Murphy J., Riley J.P. (1958) A single-solution method for the determination of soluble phosphate in sea water. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 37, 9-14.
[11]Koroleff F. (1983) Determination of phosphorus. In: "Methods of Seawater Analysis", Grasshoff K., M. Ehrhardt, K. Kremling Eds, Verlag Chemie, Weinheim, 125-139.

4. du tartrate de potassium et d'antimoine [$K(SbO)c_6H_4O_6$]
5. de l'acide ascorbique [$C_6H_8O_6$]
6. du dihydrogénophosphate de potassium [KH_2PO_4]
7. du chloroforme [$CHCl_3$]

c. Préparation de solutions mères

Acide sulfurique 5 N

12. Verser 140 ml d'acide sulfurique concentré lentement dans un bécher contenant environ 800 ml d'eau de qualité réactif. Laisser refroidir et ajuster le volume à 1 L. La solution, conservée dans une bouteille en verre foncé, est indéfiniment stable.

Solution de molybdate et d'ammonium

13. Dissoudre 15 g d'heptamolybdate d'ammonium cristallin tétrahydraté dans 450 ml d'eau de qualité réactif dans un flacon de 500 ml et ajuster le volume. La solution, conservée dans un flacon en plastique ou en verre borosilicaté, à l'abri de la lumière directe, est utilisable jusqu'à formation d'un précipité blanc.

Solution de tartrate de potassium et d'antimoine

14. Dissoudre 0,34 g de tartrate de potassium et d'antimoine dans 250 ml d'eau de qualité réactif dans un flacon de 250 ml. La solution, conservée dans une bouteille en verre ou en plastique, est stable pendant de nombreux mois, à moins qu'un floculat blanc ne se forme.

Solution étalon de dihydrogénophosphate de potassium 2 mmol L^{-1}

15. Sécher quelques grammes de dihydrogénophosphate de potassium dans un four à 110 °C. Peser 272,18 mg sur une balance analytique et les dissoudre dans 900 ml d'eau de qualité réactif dans un flacon de 1 L (classe A). Ajuster le volume et ajouter quelques gouttes de chloroforme, qui servira d'agent de conservation. La solution, conservée dans une bouteille en verre borosilicaté, est stable pendant quelques mois.

d. Préparation d'un équipement spécifique pour l'analyse

d.1. Traitement des cuves de réaction

16. Laver périodiquement les flacons de réaction contenant le mélange sulfochromique en ébullition. Les maintenir bien fermés, remplis d'eau de qualité réactif et de réactif mélangé (si nécessaire, le résidu de l'échantillon analysé peut être laissé dans le flacon).

e. Procédure analytique

e.1. Réactifs à préparer au moment de l'utilisation

Solution d'acide ascorbique

17. Dissoudre 2,7 g d'acide ascorbique dans 45 ml d'eau de qualité réactif dans un flacon de 50 ml, puis ajuster le volume. La solution, conservée dans une bouteille en plastique ou en verre, est stable pendant 24 heures.

Réactif mixte

18. Dans un récipient en verre, mélanger 100 ml de solution de molybdate d'ammonium, 250 ml d'acide sulfurique 5 N, 100 ml de solution d'acide ascorbique et 50 ml de solution de tartrate de potassium et d'antimoine. La solution est suffisante pour environ 100 échantillons, mais se détériore en quelques heures et doit être remplacée lorsque sa couleur passe du jaune clair au jaune très foncé.

Préparation de solutions étalons

19. Préparer 5 étalons de concentration en phosphate connus en diluant, dans des flacons de 100 ml (classe A), respectivement 10, 25, 50, 75 et 100 µL de solution étalon de dihydrogénophosphate de potassium (mesurée à l'aide d'une pipette de précision) avec de l'eau de mer oligotrophe. Les

concentrations de phosphate se situent donc entre 0,2 et 2 µmol L^{-1}, plus la teneur en orthophosphate de l'eau de mer oligotrophe.

e.2. Traitement analytique

20. Au moment de l'analyse, si l'échantillon a été congelé, le décongeler rapidement, éventuellement au moyen d'un bain à 37 °C ou d'un four à micro-ondes.

21. Pré-rincer les flacons contenant une aliquote d'échantillons ou de solutions étalons de différentes concentrations.

22. Remplir les flacons par 50 ml d'échantillon ou par chacune des solutions étalons (mesurées à l'aide d'un cylindre gradué). Étant donné les concentrations remarquablement faibles de phosphates et la sensibilité relative de la méthode d'analyse, il est conseillé d'effectuer au moins deux déterminations pour chaque échantillon à analyser.

23. Ajouter 5 ml de réactif mélangé à chaque échantillon ou solution étalon avec un distributeur, et agiter.

24. Pour que la réaction ait lieu, il faut au moins 5 minutes, et pas plus de 2 heures.

e.3. Préparation des blancs de réactifs

25. Remplir 4 flacons de 100 ml avec 50 ml d'eau de mer oligotrophe, pauvre en phosphates, après les avoir rincés avec la même eau.

26. Ajouter 5 ml de réactif mélangé à deux flacons et doubler la quantité dans les deux autres.

27. Le temps de réaction nécessaire est le même que pour les échantillons et les solutions étalons.

e.4. Mesures spectrophotométriques

28. Mesurer à 882 nm 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, toutes deux remplies d'eau sans réactifs. L'opération est superflue si une seule cellule est utilisée.

29. Pour chaque flacon, noter le numéro de la cellule utilisée et le contenu du flacon (échantillon, solution étalon, blanc) dans un formulaire. Rincer la cellule avec une partie de son contenu, la remplir et relever l'absorbance à 882 nm, en consignant cette donnée sur le même formulaire. En variante, avec une perte de sensibilité d'environ 30 %, l'absorbance peut être lue à 705 nm.

f. <u>Calculs</u>

30. Calculer le blanc de réactif (bl) comme étant la différence moyenne entre les valeurs des blancs contenant 10 ml et celles des blancs contenant 5 ml de réactif mélangé.

31. Calculer la corrélation entre les valeurs d'absorbance des 5 étalons et les concentrations supposées, en utilisant la régression des moindres carrés ordinaires. Le facteur colorimétrique (f) est représenté par la pente.

32. Considérer un étalon à concentration nulle d'orthophosphates représenté par l'échantillon d'eau de mer oligotrophe auquel on a ajouté une dose unique de réactif mixte. On obtient ainsi un total de 6 étalons, couvrant une plage de concentration de 2,0 µmol L^{-1}.

33. Calculer la concentration d'orthophosphate dans les échantillons à l'aide de l'équation suivante :

$$c(PO_4) / \mu mol\ L^{-1} = (ABS - bl - bl_{c,\,i})f$$

où

$c(PO_4)$ = concentration d'orthophosphates

ABS = absorbance de l'échantillon

bl = blanc des réactifs

$blc_{c,\,i}$ = blanc de la $i^{ème}$ cellule utilisée

f = facteur colorimétrique

34. Pour une cellule ayant un trajet optique de 50 mm, le facteur colorimétrique est égal à environ 9,9 µmol L^{-1}, c'est-à-dire qu'une différence de concentration de 1 µmol L^{-1} (par exemple entre la solution standard 3 et la 5) devrait correspondre à la différence d'absorbance d'environ 0,1.

g. Observations importantes et problèmes éventuels

35. Les cellules du spectrophotomètre (ou colorimètre) doivent être lavées régulièrement avec une solution à 5 % de soude ou d'acide fluorhydrique, car le complexe phosphomolybdique a tendance à adhérer aux parois, ce qui leur donne une légère couleur bleue.

36. Les échantillons ne doivent pas être conservés longtemps dans des récipients en plastique à température ambiante. La concentration de phosphates tend à diminuer, tant en raison de l'activité bactérienne qui se développe sur les parois du récipient qu'en raison des phénomènes d'adsorption.

37. Après la décongélation des échantillons, l'analyse doit être terminée en peu de temps pour éviter les phénomènes d'hydrolyse des phosphates ou polyphosphates organiques.

38. Si la solution étalon a été conservée au réfrigérateur, elle doit être amenée à la température du laboratoire avant le début de la procédure de normalisation.

39. Les mesures au spectrophotomètre doivent être effectuées dans les deux heures suivant l'ajout du réactif pour éviter la formation lente d'hétéropolyacides silicomolybdiques.

40. Les sulfures peuvent interférer avec la réaction, s'ils sont présents en concentrations supérieures à 50 µmol L^{-1} de S^{2-}, car le coefficient d'extinction et l'absorbance maximale sont modifiés (De Jonge et Villerius, 1980)[12]. Dans ce cas, les sulfures des échantillons doivent être éliminés (Airey et al., 1984)[13].

41. Les silicates interfèrent s'ils sont présents à des concentrations supérieures à 150 µmol L^{-1}, car un complexe qui absorbe dans la même bande est développé (Koroleff, 1983).

42. Le blanc de réactif, s'il est préparé à l'aide d'eau distillée, peut avoir une densité optique plus élevée que les échantillons à analyser. Cela peut avoir différentes causes ; il est conseillé de suivre strictement la procédure indiquée dans le paragraphe « Préparation des blancs de réactifs » ou d'appliquer la méthode suggérée par Novoselov et al. (1976)[14].

2.2. Protocole pour la détermination colorimétrique automatisée de la concentration d'orthophosphate

a. Réactifs

Molybdate d'ammonium

43. Dissoudre 10 g de molybdate dans 800 ml de DDW. La solution est stable pendant au moins un mois.

Tartrate d'antimoine et de potassium (KAT)

44. Dissoudre 2,5 g de KAT dans 800 ml de DDW et ajuster le volume à 1 L. La solution, conservée dans une bouteille en verre, est stable pendant au moins un mois.

b. Solutions pour l'utilisation

Réactif mixte

45. Dans un cylindre de verre gradué de 250 ml, qu'il convient d'agiter après chaque addition, mélanger 100 ml de solution mère de molybdate + 25 ml de KAT + 30 ml de H_2SO_4conc. + 1 ml de

[12]De Jonge V.N., Villerius L.A. (1980) Interference of sulphide in inorganic phosphate determination in natural waters. Mar. Chem., 9, 191-197.
[13]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.
[14]Novoselov A.A., Sheremet'Yeva A.I., Danilenko A.F. (1976) Method for simultaneous obtaining silicon-free and phosphate-free sea water aboard ship. Oceanology, 16, 358-359.

SLS (Sodium-Lauryl-Sulfate), puis ajuster le volume à 250 ml. Le réactif est très stable et doit être conservé dans une bouteille en verre.

Acide ascorbique

46. Dissoudre 1,8 g d'acide ascorbique dans 100 ml de DDW.

c. Étalons

47. Sécher environ 2 g de KH_2PO_4 dans un four à une température de 110 °C, en vérifiant que le poids du sel reste constant dans le temps. Placer les sels dans un séchoir à gel de silice pendant 24 heures supplémentaires. Les dissoudre ensuite dans de l'eau de qualité réactif, dans une proportion telle qu'elle permet d'obtenir une concentration de 2 mmol L^{-1}.

48. Utiliser cet étalon dans la procédure quotidienne pour la préparation de 5 étalons de concentration inférieure. Choisir la concentration des étalons mineurs en fonction de la quantité de sels de PO_4^{3-} que l'on s'attend à trouver, de sorte que l'ensemble des 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.

d. Collecteur

49. Le collecteur (figure 1) est composé de deux injecteurs et de quatre bobines de 10 tours chacune. Le premier injecteur (A) est équipé de 3 entrées : la première pour l'échantillon, la deuxième pour l'air et la troisième pour l'introduction du premier réactif. Immédiatement après viennent 3 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.

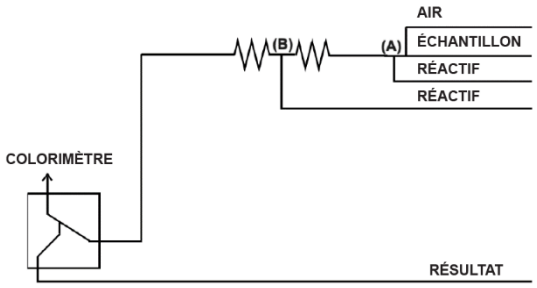

Figure 1. Collecteur pour la mesure des orthophosphates.

e. Calculs

50. Effectuer les calculs conformément aux indications générales de l'annexe I : Méthodes automatisées pour la détermination de la concentration des principaux nutriments dans l'eau de mer – Calcul de la concentration.

f. Observations importantes et problèmes éventuels

51. Si une ligne de base instable se produit lorsque l'appareil est allumé en l'absence de réactifs, laver le circuit avec du NaOH, puis avec du HCl à 10 %.

52. Si, au cours de l'analyse, on observe une augmentation évidente de la ligne de base, nettoyer immédiatement la cellule de lecture du colorimètre en injectant de l'acide chlorhydrique à 50 % directement dans la cellule sans arrêter le circuit.

53. Si possible, désioniser la DDW dans le réservoir d'eau de l'instrument.

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

55. Il est nécessaire d'utiliser des récipients appropriés pour les différents réactifs. Le bouchon du récipient doit être muni de petits trous dans lesquels on peut insérer des capillaires (aiguilles, etc.) pour le retrait du réactif.

56. Il convient d'utiliser une eau pauvre en nutriments, ou eau de mer oligotrophe (OSW), comme eau de lavage entre un échantillon et un autre. L'OSW doit avoir des valeurs de salinité similaires à celles de l'échantillon à analyser.

57. À des températures inférieures à 10 °C, il convient d'ajouter au collecteur un bain thermostaté à une température de 40 °C.

58. Si un précipité se forme dans le molybdate, le réactif doit être jeté.

59. En cas de préparation de mélanges de PO_4 et de SiO_4, les étalons ne doivent jamais être préparés dans le même flacon.

60. Il est nécessaire d'utiliser un colorimètre avec une entrée très étroite de la cellule de lecture pour éviter les perturbations de la réfraction.

61. Il convient d'utiliser des phototubes de lecture à haute sensibilité pour les lectures à 880 nm.

a. Symbole, unités et précision

Symbole : $c(PO_4^{3-})$ **Unité :** µmol L^{-1}

Précision : ± 0,02 **Exactitude :** ± 0,02 **LD :** 0,03

Identificateur de méthode :	SDN:P01: :**PHOSMAZX**	Concentration de phosphate {PO43- CAS 14265-44-2} par unité de volume de la masse d'eau [phase inconnue] par analyse colorimétrique manuelle
	SDN:P01: :**PHOSAAZX**	Concentration de phosphate {PO43- CAS 14265-44-2} par unité de volume de la masse d'eau [phase inconnue] par autoanalyse colorimétrique

3. Note technique pour la détermination de la concentration d'orthosilicate

62. La détermination des silicates dissous est effectuée par l'induction de la formation d'un polyacide silicomolybdique qui est ensuite réduit en bleu de molybdène. Le composé final a une absorbance maximale à 810 nm, et est mesuré par colorimétrie.

63. La chaîne de réaction est fortement influencée par les variations, même minimes, des conditions de réaction en raison de la multiplicité des produits intermédiaires et de leur instabilité. L'acide silicomolybdique se forme à des vitesses différentes selon le degré de polymérisation du silicate.

64. L'acide silicomolybdique existe dans au moins deux isomères α et β (Strickland, 1952[15] ; Morrison et Wilson,1963[16] ; Truesdale et Smith, 1975[17]), dont le premier est thermodynamiquement plus stable, mais cinétiquement désavantagé à des valeurs de pH inférieures à 2. Les deux isomères α et β de l'acide silicomolybdique ont un pic d'absorbance maximale dans la partie bleue du spectre, mais avec des coefficients d'extinction très différents, dont aucun n'est particulièrement élevé. En outre, pour les raisons susmentionnées, ils ne garantissent pas une stabilité suffisante dans le temps. La réduction ultérieure de l'isomère β par le sulfate de p-méthylaminophénol (métol) dans un environnement acide et en présence de sulfite produit un bleu de molybdène stable pendant au moins

[15]Strickland J.D.H. (1952) The preparation and properties of silicomolybdic acid. II. The preparation and properties of alpha silicomolybdic acid. J. Amer. Chem. Soc., 74, 868-871.
[16]Morrison I.R., Wilson A.L. (1963) The absorptiometric determination of silicon in water. Part I. Formation, stability and reduction of [β- and α-molybdosilicic acids. Analyst, 88, 88-99.
[17]Truesdale V.W., Smith C.J. (1975) The formation of molybdosilicic acids from mixed solutions of molybdate and silicate. Analyst, 100, 203-212.

2 heures à partir de la fin de la réaction (Mullin et Riley, 1955)[18]. Dans ce processus, il est également important de contrôler le pH pour éviter une réduction directe de l'excès de molybdène par le métol.

65. Toutes les réactions décrites ci-dessus dépendent à la fois de la force ionique de la solution et de la présence d'ions spécifiques, en particulier les ions divalents ; par conséquent, la concentration du produit final et peut-être aussi son extinction molaire dépendent de la concentration en sel du mélange réactionnel et, par conséquent, de l'échantillon. La formation de polyacides avec le molybdate est, en réalité, également caractéristique d'autres ions, en particulier le phosphate et l'arséniate (Boltz et Mellon, 1947). Pour éviter l'interférence des phosphomolybdates, ceux-ci peuvent être éliminés avec de l'acide oxalique (Strickland et Parsons, 1968).

66. Dans le cadre de la présente note technique, les lignes directrices de surveillance fournissent les protocoles IMAP suivants pour la détermination colorimétrique de la concentration d'orthosilicate :

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

3.1. Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration d'orthosilicate

a. Équipement

67. L'équipement utilisé pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration d'orthosilicate comprend :

1. un cylindre ou une pipette de 25 ml, de préférence en plastique
2. des récipients en plastique de 50 ml (de préférence des flacons ou des bouteilles avec bouchon en polyéthylène ou en polyméthylpentène)
3. de la verrerie de laboratoire pour les préparations chimiques
4. des distributeurs automatiques ou des pipettes de 10 et 15 ml
5. des filtres en papier Whatman n° 1
6. des flacons jaugés de 500 ml
7. des flacons jaugés de 100 ml de classe A
8. un flacon jaugé d'1 L de classe A
9. des micropipettes de précision pour mesurer des volumes compris entre 10 et 100 µL
10. un spectrophotomètre ou un colorimètre sensible à 810 nm, équipé de cellules d'au moins 50 mm de trajet optique
11. un creuset en platine
12. un agitateur
13. une balance analytique
14. un poêle
15. un sécheur

b. Produits chimiques

68. Les produits chimiques utilisés pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration d'orthosilicate comprennent :

1. un mélange sulfochromique
2. de l'acide sulfurique concentré [H_2SO_4]
3. de l'acide chlorhydrique concentré [HCl]
4. du tétrahydrate d'heptamolybdate d'ammonium [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$]
5. de l'acide oxalique [$C_2H_2O_4\text{-}2H_2O$]
6. du sulfate de 4-méthylaminophénol (métol) [$(CH_3NHC_6H_4OH)\text{-}2H_2SO_4$]
7. du sulfite de sodium anhydre [$Na2SO_3$]
8. de la silice en poudre [SiO_2] et du carbonate de sodium anhydre [Na_2CO_3] (ou de l'hexafluorosilicate de sodium [Na_2SiF_6])

c. Préparation de solutions mères

Réactif au molybdate

69. Dissoudre 4,0 g d'heptamolybdate d'ammonium tétrahydraté (de préférence cristallin) dans environ 300 ml d'eau de qualité réactif. Diluer 12 ml d'acide chlorhydrique concentré dans 100-

[18]Mullin J.B., Riley J.P. (1955) The colorimetric determination of silicate with special reference to sea and natural waters. Analytica Chim. Acta, 12, 162-176.

150 ml d'eau de qualité réactif ; bien mélanger. Sous agitation, ajouter la solution de molybdate à la solution d'acide chlorhydrique et ajuster le volume à 500 ml avec de l'eau de qualité réactif. La solution, stockée dans une bouteille en polyéthylène, à l'abri de la lumière directe, est utilisable jusqu'à ce qu'un précipité blanc se forme ou jusqu'à ce qu'elle devienne bleue.

Solution de métol et de sulfite

70. Dissoudre 6 g de sulfite de sodium anhydre dans 400 ml d'eau de qualité réactif et ajouter 10 g de métol, tout en remuant jusqu'à dissolution complète. Filtrer la solution à l'aide d'un filtre Whatman n° 1, préalablement rincé avec de l'eau de qualité réactif, et ajuster le volume à 500 ml. La solution, stockée dans une bouteille en verre borosilicaté hermétiquement fermée, ne doit donc pas être conservée plus d'un mois.

Solution d'acide oxalique

71. Préparer une solution saturée d'acide oxalique en dissolvant 50 g d'acide dans 400 ml d'eau de qualité réactif. Décanter la solution en la séparant des cristaux résiduels et ajuster le volume à 500 ml. La solution, stockée dans une bouteille en polyéthylène, est indéfiniment stable.

Solution d'acide sulfurique à 50 % (en volume)

72. Verser 250 ml d'acide sulfurique concentré dans 250 ml d'eau de qualité réactif, tout en remuant. Refroidir à la température ambiante et ajuster le volume avec de l'eau de qualité réactif dans un tapis de 500 cm^3. La solution, stockée dans un récipient en plastique foncé, est indéfiniment stable.

Solution étalon de silicate (10 mmol L^{-1})

73. Faire chauffer la silice pure à 1 000 °C, la faire refroidir dans un dessiccateur et vérifier son poids constant par des pesées répétées. Peser 601,0 mg de silice (la quantité théorique correspondant à 10 mmol de Si) dans un creuset en platine et ajouter 1,5 g de carbonate de sodium anhydre. Mélanger le tout avec une spatule métallique et faire fondre, jusqu'à homogénéisation complète, à une température de 1 000 °C. Maintenir le produit fondu à 1 000 °C jusqu'à ce qu'il devienne transparent. Le faire ensuite refroidir et le dissoudre dans plusieurs portions d'eau très chaude, puis, après refroidissement, le transférer dans un flacon de 1 L (classe A). Ajuster le volume avec de l'eau de qualité réactif et transférer rapidement le tout dans une bouteille en polyéthylène haute densité. La solution est stable pendant quelques mois.

74. On peut aussi utiliser de l'hexafluorosilicate de sodium. Il doit alors être séché dans un four à 105 °C pendant une heure, dans un creuset métallique. Dans ce cas, étant donné la faible solubilité, il est préférable de préparer des solutions dont les concentrations ne dépassent pas 2 mmol L^{-1} ; les dilutions doivent donc être corrigées proportionnellement. Le produit n'étant pas encore fourni dans une pureté analytique, la quantité à peser doit être calculée sur la base des indications de pureté du fournisseur. Dissoudre l'hexafluorosilicate de sodium dans 700 ml d'eau de qualité réactif, dans un récipient en plastique, sous un chauffage doux, et transférer la solution dans un flacon de 1 L (classe A). Le temps de dissolution dépend de la forme cristalline du produit et quelques heures peuvent être nécessaires. Ajuster le volume à 1 L et transférer rapidement le tout dans une bouteille en plastique pour empêcher le fluorure d'éliminer le silicium du verre. La solution est stable pendant quelques mois.

d. <u>Préparation d'un équipement spécifique pour l'analyse</u>

d.1. Traitement des cuves de réaction

75. Laver les récipients de 50 cm^3 en polyéthylène ou en polyméthylpentène avec un mélange sulfochromique, les rincer soigneusement avec une eau de qualité réactif et les sécher. Pour l'entretien courant, il suffit, après utilisation, de les rincer avec de l'eau de qualité réactif et de les placer à l'envers sur du papier filtre.

e. Procédure analytique

e.1 Réactifs à préparer au moment de l'utilisation

Réactif réducteur

76. Mélanger 100 ml de solution de métol et de sulfite et 60 ml de solution d'acide oxalique. Ajouter lentement 60 ml d'acide sulfurique à 50% et ajuster le volume à 300 ml dans un cylindre avec de l'eau de qualité réactif. Ce réactif doit être préparé immédiatement avant son utilisation.

e.2. Préparation de solutions étalons

77. Préparer 5 solutions de concentration connue de silicate en diluant, dans des flacons de 100 ml (classe A), respectivement 10, 25, 50, 75, 100 µL de solution étalon de silicate (mesurée avec une micropipette de précision) avec de l'eau de mer oligotrophe, ce qui donne des concentrations comprises entre 1 et 10 µmol L^{-1} de silicate, plus la teneur en silicate de l'eau oligotrophe.

e.3. Traitement analytique

78. Au moment de l'analyse, si l'échantillon a été congelé, le décongeler lentement en le tenant à l'abri de la lumière. L'analyse doit être effectuée après 12 heures afin de permettre aux formes polymères des silicates de se dépolymériser.

79. Verser 10 ml de réactif molybdique (à l'aide d'un distributeur) dans le récipient et, tout en remuant, ajouter 25 ml d'échantillon ou de chacune des solutions étalons (mesurées à l'aide d'un cylindre gradué).

80. En respectant les mêmes temps pour tous les échantillons et les normes d'étalonnage, laisser la réaction s'opérer pendant au moins 15 minutes, mais pas plus de 30 minutes.

81. À l'aide d'un distributeur, ajouter 15 ml de réactif réducteur et laisser la réaction se dérouler pendant au moins une heure. Pour l'ensemble du groupe d'échantillons, les mêmes temps de réaction doivent être respectés.

e.4. Préparation des blancs de réactifs

82. Il convient de préparer au moins deux réplicats de blancs de réactifs dans des récipients en polyéthylène de 50 ml, en utilisant 25 ml d'eau de mer oligotrophe, et de les traités en suivant la même procédure analytique que celle appliquée aux échantillons et aux étalons.

83. Dans certains cas, en raison d'une forte concentration de silicates dans l'eau de mer oligotrophe, une valeur à blanc trop élevée peut être observée. Dans ce cas, il est conseillé de les retirer (Novoselov et al., 1976) ou de préparer les blancs avec de l'eau de qualité réactif.

e.5. Mesure spectrophotométrique

84. Mesurer à 810 nm l'absorbance du blanc ($bl_{c,i}$) de chaque cellule du spectrophotomètre ou du colorimètre utilisée pour la lecture par rapport à la cellule de référence, toutes deux remplies d'eau sans réactifs. L'opération est superflue si une seule cellule est utilisée.

85. Pour chaque flacon, noter le numéro de la cellule utilisée et le contenu du flacon (échantillon, solution étalon, blanc) dans un formulaire. Rincer la cellule avec une partie de son contenu, la remplir et relever l'absorbance à 810 nm, en consignant cette donnée sur le même formulaire.

f. Calculs

86. Calculer le blanc de réactif (bl) comme la différence moyenne entre les valeurs des deux blancs.

87. Calculer la corrélation entre les valeurs d'absorbance des 5 étalons et les concentrations supposées, en utilisant la régression des moindres carrés ordinaires. Le facteur colorimétrique (f) est représenté par la pente.

88. Calculer la concentration d'orthosilicate dans les échantillons à l'aide de l'équation suivante :

$$c(SiO_4) / \mu mol\ L^{-1} = (ABS - bl - bl_{c,i}) \cdot f$$

où

$c(SiO_4)$ = concentration d'orthosilicates
ABS = l'absorbance de l'échantillon
bl = blanc des réactifs
$bl_{c,\,i}$ = blanc de la $i^{ème}$ cellule utilisée
f = facteur colorimétrique

89. Pour une cellule ayant un trajet optique de 50 mm, le facteur colorimétrique est égal à environ 19 µmol L^{-1}, c'est-à-dire qu'une différence de concentration de 10 µmol L^{-1} (par exemple entre l'eau utilisée pour diluer les solutions étalons et l'étalon 5) devrait être d'environ 0,52 dans le cas d'échantillons ayant une salinité de 37.

g. Observations importantes et problèmes éventuels

90. Comme cela a déjà été mentionné, après décongélation, l'échantillon doit être conservé dans l'obscurité pendant au moins 12 heures à température ambiante pour favoriser la dépolymérisation des silicates. De fait, la polymérisation est favorisée par la congélation et une sous-estimation de la concentration des silicates réactifs sera observée (Burton et Leatherland, 1970[19] ; MacDonald et McLaughlin, 1982[20] ; MacDonald et al., 1986[21]).

91. L'échantillon doit être ajouté au réactif molybdique, et non l'inverse, afin de garantir une valeur de pH correcte.

92. Pendant l'analyse, tous les échantillons doivent être maintenus à la même température, si possible autour de 20 °C, pour éviter une variabilité en fonction du coefficient thermique de la réaction.

93. Il convient de préparer des étalons d'étalonnage en utilisant de l'eau de mer dont la salinité est égale à celle des échantillons. Si l'on travaille dans un environnement estuarien, il convient de préparer un ensemble de normes qui couvrent la gamme des valeurs de salinité trouvées dans les échantillons. Le coefficient de salinité (rapport entre la valeur du facteur colorimétrique dans l'eau de qualité réactif et dans l'eau salée) est assez variable : pour une eau dont la salinité est d'environ 35, on observe une valeur d'environ 0,85 (Bien, 1958[22] ; Fanning et Pilson, 1973[23] ; Koroleff, 1983).

94. Un rendement anormal de la réaction est presque toujours lié à des valeurs de pH différentes de 2 ou à une mauvaise manipulation. Le pH dans le mélange final doit être compris entre 1,8 et 2,2. Parfois, un mauvais mélange du mélange réactionnel ainsi qu'une valeur de pH incorrecte sont responsables de la formation d'une couleur bleue due à la réduction directe du molybdate et non à celle des polyacides.

95. La méthode proposée est généralement sans interférence pour l'eau de mer. Cependant, on peut observer une interférence de cations tels que le cuivre, le fer, le cobalt et le nickel avec la couleur de leurs ions. Dans ce cas, il est nécessaire de mesurer l'absorbance de l'échantillon à la même longueur d'onde sans ajouter les réactifs et d'ajouter la valeur de cette lecture au blanc de réactif. Si des ions de fer sont présents et forment du molybdate ferrique pendant la réaction, une solution de chlorhydrate d'hydroxylamine (Mullin et Riley, 1955) doit également être ajoutée aux échantillons avant l'analyse.

[19]Burton J.D., Leatherland T.M. (1970) The reactivity of dissolved silicon in some natural waters. Limnol. Oceanogr., 15, 473-476.
[20]MacDonald R.W., McLaughlin F.A. (1982) The effect of storage by freezing on dissolved inorganic phosphate, nitrate and reactive silicate for samples from coastal and estuarine waters. Water Res., 16, 95-104.
[21]MacDonald R.W., McLaughlin F.A., Wong C.S. (1986) The storage of reactive silicate samples by freezing. Limnol. Oceanogr., 31, 1139-1142.
[22]Bien G.S. (1958) Salt effect correction in determining soluble silica in sea water silicomolybdic acid method. Anal. Chem., 30, 1525-1526.
[23]Fanning K.A., Pilson M.E.Q. (1973) On the spectrophotometric determination of dissolved silica in natural waters. Anal. Chem., 45, 136-140.

Le développement de la couleur n'est pas observé si la concentration des sulfures présents est inférieure à 5 mg L^{-1} ; sinon, ils doivent être oxydés avec de l'eau de brome (Koroleff, 1983).

3.2. Protocole pour la détermination colorimétrique automatisée de la concentration d'orthosilicate

a. Réactifs

Chlorure stanneux

96. Dissoudre 20 g de chlorure stanneux dans 12,5 ml de HCl concentré + 27,5 ml de DDW. Dissoudre le réactif à une température de 70 °C.

Acide tartrique

97. Dissoudre 100 g d'acide tartrique dans 1 L de DDW.

Molybdate d'ammonium

98. Dissoudre 40 g de molybdate dans 800 ml de DDW, puis ajuster le volume à 1 L.

b. Solutions pour l'utilisation

Molybdate

99. Mélanger 50 ml de HCl à 10 % + 40 ml de molybdate + 15 ml de DDW.

Chlorure stanneux

100. Mélanger 2,5 ml de chlorure stanneux + 48 ml de HCl à 10 % + 50 ml de DDW.

c. Étalon

101. Sécher environ 2 g de Na_2SiF_6 dans un four à une température de 105 °C jusqu'à obtention d'un poids constant dans le temps. Placer le sel dans un dessiccateur à gel de silice pendant 24 heures supplémentaires. Dissoudre ensuite le sel dans de l'eau de qualité réactif, dans une proportion telle qu'elle permet d'obtenir une concentration de 10 mmol L^{-1}.

102. Utiliser cette norme dans la procédure quotidienne pour la préparation de 5 normes de concentration inférieure. Choisir la concentration des sous-normes en fonction de la quantité de SiO_4 que l'on s'attend à trouver, de manière à couvrir toute la gamme des concentrations attendues. Le facteur de multiplication pour le calcul des concentrations est obtenu à partir des 5 normes.

d. Collecteur

Le collecteur (figure 2) est composé de trois injecteurs et de six bobines de 10 tours chacune. Le premier injecteur (A) est équipé de 3 entrées : la première pour l'échantillon, la deuxième pour les bulles d'air et la troisième pour l'introduction du premier réactif. Immédiatement après viennent 6 bobines composées de 10 bobines chacune : dans les deux premières, le premier réactif est mélangé ; dans les deux autres, le deuxième réactif est injecté au point (B) ; enfin, dans les deux dernières, le troisième réactif est injecté au point (C).

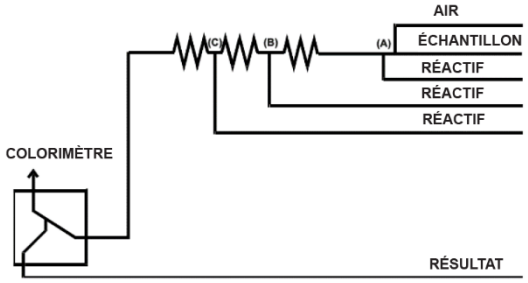

Figure 2. Collecteur pour la mesure des orthosilicates.

e. Calculs

103. Effectuer les calculs conformément aux indications générales de l'annexe I : Méthodes automatisées pour la détermination de la concentration des principaux nutriments dans l'eau de mer – Calcul de la concentration.

f. Observations importantes et problèmes éventuels

104. Si une ligne de base instable se produit lorsque l'appareil est allumé en l'absence de réactifs, laver le circuit avec du NaOH, puis avec du HCl à 10 %.

105. Si, au cours de l'analyse, on observe une augmentation évidente de la ligne de base, nettoyer immédiatement la cellule de lecture du colorimètre en injectant de l'acide chlorhydrique à 50 % directement dans la cellule sans arrêter le circuit.

106. Si possible, désioniser la DDW dans le réservoir d'eau de l'instrument.

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

108. Il est nécessaire d'utiliser des récipients appropriés pour les différents réactifs. Le bouchon du récipient doit être muni de petits trous dans lesquels on peut insérer des capillaires (aiguilles, etc.) pour le retrait du réactif.

109. Il convient d'utiliser de l'eau pauvre en nutriments, ou eau de mer oligotrophe (OSW), comme eau de lavage entre un échantillon et un autre. L'OSW doit avoir des valeurs de salinité similaires à celles de l'échantillon à analyser.

110. Si un précipité se forme dans le molybdate, le réactif doit être jeté.

111. En cas de préparation d'étalons mixtes de PO_4 et de SiO_4, les étalons ne doivent jamais être préparés dans le même flacon.

112. Il est nécessaire d'utiliser un colorimètre avec une entrée très étroite de la cellule de lecture pour éviter les perturbations de la réfraction.

113. Il convient d'utiliser des phototubes de lecture à haute sensibilité pour les lectures à 820 nm.

114. Si, lors de l'insertion des réactifs, une couleur bleue est observée dans l'échantillon, à la sortie de la deuxième série de bobines, l'acide tartrique doit être éliminé.

Symbole, unités et précision

Symbole : $c(SiO_4^{4-})$ **Unité :** µmol L^{-1}

Précision : ± 0,05 **Exactitude :** ± 0,05 **LD :** 0,10

Identificateur de méthode :	SDN:P01::**SLCAMAZX**	Concentration de silicate {SiO44- CAS 17181-37-2} par unité de volume de la masse d'eau [phase inconnue] par analyse colorimétrique manuelle
	SDN:P01::**SLCAAAZX**	Concentration de silicate {SiO44- CAS 17181-37-2} par unité de volume de la masse d'eau [phase inconnue] par auto-analyse colorimétrique

4. Note technique pour une détermination combinée de la concentration d'azote total et de phosphore total

115. La concentration d'azote ou de phosphore total dans un échantillon d'eau est représentée par la somme des moles de l'élément en question présentes sous forme d'espèces organiques et inorganiques, dissoutes et particulaires. Dans la présente procédure analytique, les deux éléments sont déterminés après oxydation et hydrolyse de la plupart des composés initialement présents dans l'échantillon dans le même mélange réactionnel avec production, respectivement, de nitrate et d'orthophosphate. La procédure pour la minéralisation commune des deux éléments est présentée ci-après.

116. L'agent oxydant utilisé est le persulfate de potassium $K_2S_2O_8$, qui se décompose à chaud selon la réaction :

$$K_2S_2O_8 + H_2O \rightarrow 2KHSO_4 + 1/2O_2$$

117. au cours de la réaction d'oxydation, il y a production de H + qui détermine une variation du pH. Le comportement des différents composés azotés dans la réaction d'oxydation est différent. Ceux qui contiennent des liaisons N-N sont plus difficilement oxydés tandis que ceux qui ont des liaisons N = N sont plutôt réfractaires à l'oxydation des nitrates. En outre, une période d'au moins 30 minutes est nécessaire pour assurer la disparition complète du persulfate de la solution d'oxydation, ce qui permet d'éviter d'éventuelles interférences dans les phases ultérieures de l'essai analytique, en particulier pour la détermination du nitrate.

118. L'apparition dans le mélange réactionnel, même en milieu alcalin, de Cl_2, qui interfère avec la réduction ultérieure des nitrates par le cadmium, est due à la soustraction d'OH- par le magnésium sous la forme d'un précipité, qui ne neutralise pas facilement l'ion H^+ produit par la réaction (Nydhal, 1978)[24]. Il est donc suggéré d'ajouter du OH^- au mélange réactionnel ou d'agiter les récipients de réaction. Koroleff (1968[25] ; 1983) a toutefois soutenu que, dans un environnement alcalin, alors que l'hydrolyse complète du phosphore lié en composés organiques est réalisée, on observe un rendement de décomposition des polyphosphates d'environ 60 %. Cependant, la concentration de ce dernier est généralement d'importance secondaire par rapport au phosphore lié dans les composés organiques ; Koroleff (1968 ; 1983b[26]) et Valderrama (1981)[27] estiment dès lors qu'une méthode unique de détermination de l'azote et du phosphore total dans l'eau de mer est tout aussi fiable.

119. Dans la méthode rapportée par Valderrama (1981), grâce à l'utilisation d'un tampon basé sur le couple acide borique/borate et en fonction des réactions impliquées, le pH du mélange commence à environ 9,7 et atteint la fin du processus à environ 4-5, créant ainsi les conditions appropriées pour l'oxydation-hydrolyse de l'azote et du phosphore et la décomposition nécessaire de l'excès de persulfate. La méthode présentée est la méthode de Valderrama (1981) dans la version de Koroleff (1983a, b).

120. Dans le cadre de la présente note technique, les lignes directrices de surveillance fournissent les protocoles IMAP suivants pour la détermination colorimétrique combinée de la concentration d'azote total et de phosphore total :

- Protocole pour la préparation d'échantillons en vue d'une détermination combinée de la concentration d'azote total et de phosphore total ;
- Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle combinée de la concentration d'azote total et de phosphore total ;
- Protocole pour la détermination colorimétrique automatisée combinée de la concentration d'azote total et de phosphore total.

4.1. Protocole pour la préparation d'échantillons en vue d'une détermination combinée de la concentration d'azote total et de phosphore total

a. Équipement

121. L'équipement utilisé pour la préparation des échantillons en vue de la détermination de la concentration d'azote total et de phosphore total comprend :

1. des cylindres gradués de 50 ml

[24]Nydahl F. (1978) On the peroxidisulphate oxidation of total nitrogen in waters to nitrate. Talanta, 12, 1123-1130.
[25]Koroleff F. (1968) Determination of total phosphorus in natural waters by means of persulphate oxidation. ICES C.M./C, 33, 209-212.
[26]Koroleff, F. (1983b) Total and organic nitrogen. In: "Methods of Seawater Analysis", Grasshoff K., M. Ehrhardt, K. Kremlin Eds, Verlag Chemie, Weinheim, 162-173.
[27]Valderrama J.C. (1981) The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. Mar. Chem., 10, 109-122.

2. des récipients de 100 ml en verre borosilicaté, polypropylène, TPX ou téflon avec bouchon à vis hermétique muni d'une bride ou d'un joint en téflon Il est recommandé d'utiliser des bouteilles en polyéthylène si les échantillons doivent être congelés.

b. Produits chimiques

122. Les produits chimiques utilisés pour la préparation des échantillons en vue de la détermination de la concentration d'azote total et de phosphore total comprennent :

1. du persulfate de potassium [K_2S_2O8] (teneur en azote < 0,001 %)
2. de l'hydroxyde de sodium [NaOH] (teneur en azote < 0,001 %)

c. Préparation des réactifs

Solution oxydante

123. Dissoudre 50 g de persulfate de potassium (faible teneur en N) et 30 g d'acide borique dans 1 L d'hydroxyde de sodium 0,375 mol L^{-1} (15 g de NaOH sont dissous et dilués avec de l'eau distillée pour atteindre un volume de 1 L, puis conservés dans une bouteille en polyéthylène). Le réactif, s'il est conservé dans une bouteille en polyéthylène bien fermée et enveloppée dans une feuille d'aluminium, est stable pendant au moins une semaine.

d. Procédure d'échantillonnage

124. À l'aide d'une bouteille de 50 ml, rincée au moins deux fois avec l'échantillon, verser directement 50 ml d'eau pour chaque sous-échantillon de la bouteille de prélèvement dans les récipients de réaction, également rincés au préalable avec l'échantillon.

125. Si l'échantillon est particulièrement trouble (ce qui est fréquent dans les eaux côtières), un double échantillonnage est nécessaire pour déterminer la turbidité.

126. Comme dans toutes les déterminations qui incluent des particules, il convient de prélever les sous-échantillons après avoir soigneusement secoué le flacon de prélèvement ou dans des délais très courts, empêchant une sédimentation importante des particules.

e. Stockage des échantillons

127. En ce qui concerne la conservation, l'une des trois méthodes indiquées ci-dessous peut être utilisée, garantissant des résultats acceptables :

1. Conserver les échantillons, au moment de la collecte, dans les récipients de réaction hermétiquement fermés. L'analyse peut également être effectuée après une longue période. En effet, suite à la réaction d'oxydation, les nitrates et les phosphates produits restent constants.
2. Immédiatement après le prélèvement, ajouter 5 ml de solution oxydante et fermer hermétiquement les récipients des échantillons. Dans ces conditions, les échantillons sont stables pendant au moins 48 heures. Si la réaction d'oxydation a lieu dans ce laps de temps, les nitrates et les phosphates produits restent constants même pendant 2 ÷ 3 mois (Nydhal, 1978).
3. Congeler rapidement les échantillons dans une bouteille en polyéthylène, sans filtrage.

4.2. Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle combinée de la concentration d'azote total et de phosphore total

a. Équipement

128. L'équipement utilisé pour la détermination colorimétrique manuelle combinée de la concentration d'azote total et de phosphore total comprend :

1. tout ce qui est indiqué pour la détermination des nitrates et des orthophosphates
2. une autoclave ou un autocuiseur normal (dans ce dernier cas, il peut être plus pratique d'utiliser pour récipients d'échantillons des tubes à essai d'environ 50 ml avec des bouchons à vis et des joints en téflon et d'utiliser un petit volume)

b. Produits chimiques

129. Les produits chimiques utilisés pour la détermination colorimétrique manuelle combinée de la concentration d'azote total et de phosphore total comprennent :

1. tout ce qui est indiqué pour la détermination des nitrates et des orthophosphates
2. de l'eDTA disodique [$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$]

c. Préparation de solutions mères

130. Pour la ***détermination de l'azote total***, il convient de préparer les solutions mères indiquées dans le Protocole pour la détermination des nitrates ainsi qu'une solution d'azote organique.

Solution d'azote organique (10 mmol L^{-1})

131. Dissoudre 186,2 mg d'EDTA disodique dans 90 ml d'eau de qualité réactif, ajuster le volume à 100 ml dans un flacon jaugé (100 ml, classe A) et conserver la solution au réfrigérateur, dans une bouteille en verre foncé. La solution est stable pendant quelques mois.

132. Pour la ***détermination du phosphore total***, il convient de préparer les solutions énumérées ci-dessous :

Acide sulfurique (4,5 mol L^{-1})

133. Ajouter avec précaution 250 ml d'acide sulfurique concentré à 750 ml d'eau de qualité réactif, laisser refroidir et ajuster le volume à 1 L. La solution, stockée dans une bouteille de réactif, est indéfiniment stable.

Réactif mixte

134. Dissoudre 12,5 g d'heptamolybdate d'ammonium cristallin tétrahydraté dans 125 ml d'eau de qualité réactif. Dissoudre séparément 0,5 g de tartrate de potassium et d'antimoine dans 20 ml d'eau de qualité réactif. Ajouter la solution de molybdate, sous agitation, à 350 ml d'acide sulfurique à 4,5 mol L^{-1}, puis ajouter la solution de tartrate de potassium et d'antimoine et mélanger. La solution, conservée dans un flacon en verre foncé, est stable pendant plusieurs mois.

d. Procédure analytique

d.1. Réactifs à préparer au moment de l'utilisation

Solution acidifiée d'acide ascorbique

135. Dissoudre 10 g d'acide ascorbique dans 50 ml d'eau de qualité réactif et ajouter 50 ml d'acide sulfurique à 4,5 mol L-1. Conserver la solution au réfrigérateur, dans une bouteille en verre foncé. La solution peut être utilisée tant qu'elle reste incolore (environ une semaine), mais il est préférable de la préparer au moment de l'utilisation.

d.2. Préparation de solutions étalons

136. Il convient de suivre le Protocole pour la détermination des concentrations de nitrate et d'orthophosphate.

d.3. Préparation de la solution visant à vérifier l'efficacité du réactif oxydant

Solution d'azote à 10 µmol L^{-1}

137. Dans un flacon de 100 ml (classe A), diluer 100 µl (mesurés à l'aide d'une pipette de précision) de solution mère d'azote organique avec de l'eau de qualité réactif. Diviser la solution en deux sous-échantillons de 50 ml et ajouter 5 ml de réactif oxydant. La quantité totale d'azote présente dans la solution (10 µmol L^{-1}) doit être déterminée. Si cela ne se produit pas, une nouvelle solution oxydante doit être préparée.

d.4. Préparation des blancs de réactifs

138. Transférer 50 ml d'eau de qualité réactif dans 3 récipients de réaction et inoculer chacun avec 5 ml de réactif oxydant.

139. Passer les blancs préparés à l'autoclave selon la procédure indiquée pour le traitement analytique des échantillons.

Pour préparer les blancs des réactifs liés à l'analyse de l'azote total (blN) :

140. Prélever 5 ml de chacun des 3 récipients à l'aide d'une pipette automatique et transférer ces 5 ml dans des béchers de 100 ml ; ajouter à chaque bécher 45 ml d'eau de qualité réactif.

141. Pour les blancs des réactifs azotés, appliquer la même procédure que celle appliquée aux échantillons et illustrée en détail dans le Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration de nitrate (tampon d'ammonium, colonne de réduction, sulfanilamide, NNEDDC, essai spectrophotométrique).

Pour préparer les blancs des réactifs liés à l'analyse du phosphore total (blP) :

142. À chacun des 50 ml restants dans les 3 récipients indiqués pour le traitement analytique des échantillons, ajouter les réactifs (solution acidifiée d'acide ascorbique et réactif mixte).

143. Effectuer les mesures spectrophotométriques indiquées dans le Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration d'orthophosphate.

d.5. Traitement analytique

144. Placer les récipients contenant les échantillons et les solutions à analyser dans un autoclave ou un autocuiseur et cuire à l'autoclave/au four pendant au moins 30 minutes à 120 °C.

145. Porter les récipients à température ambiante et vérifier que le volume de l'échantillon est resté inchangé. Si nécessaire, réajuster le volume à 55 ml avec de l'eau de qualité réactif, en consignant toutefois la modification du volume, qui peut avoir entraîné une contamination parallèle de l'échantillon.

146. À la fin de l'étape d'oxydation, l'intégralité de l'azote de l'échantillon doit avoir été converti en nitrate et l'intégralité du phosphore en phosphate.

147. Suivre les procédures indiquées dans les Protocoles pour la détermination des nitrates et des phosphates, en tenant compte des ajouts et modifications ci-après.

Pour l'analyse de l'azote

148. Prélever 5 ml de chacun des échantillons et des deux échantillons de contrôle avec de l'EDTA à l'aide d'une pipette automatique et transférer ces 5 ml dans des béchers de 100 ml ; ajouter à chacun de ces béchers 45 ml d'eau de qualité réactif.

149. Appliquer la même procédure que celle illustrée en détail dans le Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration de nitrate (tampon d'ammonium, colonne de réduction, sulfanilamide, NNEDDC, essai spectrophotométrique).

Pour l'analyse du phosphore

150. Utiliser les 50 ml d'échantillon restants et ajouter 1 ml de solution acidifiée d'acide ascorbique à l'aide d'un distributeur.

151. Agiter la solution et, après environ 30 secondes, ajouter 1 ml de réactif mélangé (mesuré à l'aide d'un distributeur)tout en continuant d'agiter.

152. Applique la même procédure que celle illustrée en détail dans le Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle de la concentration d'orthophosphate pour la mesure spectrophotométrique.

e. Calculs

153. Calculer les blancs des cellules ($bl_{c,i,N}$ et $bl_{c,i,P}$) comme indiqué dans les Protocoles pour la détermination colorimétrique manuelle des nitrates et des orthophosphates.

154. Calculer le blanc des réactifs (réactif oxydant plus réactif de développement de la couleur), tant pour le phosphate (bl_P) que pour le nitrate (bl_N), comme la moyenne des valeurs d'absorbance des trois solutions avec de l'eau de qualité réactif.

155. Calculer les facteurs colorimétriques des deux composants selon la procédure indiquée dans les Protocoles pour la détermination colorimétrique manuelle des nitrates (f_N) et des orthophosphates (f_P).

156. Calculer les concentrations selon les équations suivantes :

$$c(\mathrm{TN}) / \mu\mathrm{mol\ L^{-1}} = (ABS_N - bl_N - bl_{c,i,N}) \cdot f_N$$

$$c(\mathrm{TP}) / \mu\mathrm{mol\ L^{-1}} = (ABS_P - bl_P - bl_{c,i,P}) \cdot f_P$$

où :

ABS_N = absorbance de l'échantillon à 553 nm
ABS_P = absorbance de l'échantillon à 882 nm
$bl_{c,i,N}$ = blanc de la i^{ème} cellule à 553 nm
$bl_{c,i,P}$ = blanc de la i^{ème} cellule à 882 nm
bl_N = blanc de réactifs à l'azote
bl_P = blanc de réactifs au phosphore
f_N = facteur colorimétrique pour le nitrate
f_P = facteur colorimétrique pour le phosphate

f. Observations importantes et problèmes éventuels

157. Les récipients doivent être rincés avec de l'eau de qualité réactif au moins deux fois. Entre les déterminations, les récipients doivent être maintenus remplis d'une solution de HCl d'environ 0,1 mol L^{-1}.

158. La solution d'essai ne doit pas être utilisée pour corriger le rendement de la réaction, mais seulement pour vérifier grossièrement l'efficacité de l'oxydation, car une réduction du pouvoir oxydant peut se produire en fonction des différents types de composés azotés impliqués dans la réaction.

159. En ce qui concerne la détermination de l'azote, il convient de noter que certains problèmes peuvent être dus aux impuretés des réactifs. Il est important d'utiliser du persulfate à faible teneur en azote ou de suivre la technique de recristallisation décrite dans Nydhal (1978). Il est également important de toujours vérifier la qualité de l'eau de qualité réactif utilisée. En effet, de l'ammoniac est presque toujours présent dans les milieux fermés et se dissout facilement dans l'eau ; il faut donc utiliser l'eau dès sa sortie de l'épurateur, même si cela n'élimine pas le risque de substances libérées par les résines d'échange.

4.3. Protocole pour la détermination colorimétrique automatisée combinée de la concentration d'azote total et de phosphore total

160. Le présent Protocole ne diffère pas du Protocole pour la détermination colorimétrique manuelle combinée de l'azote total et du phosphore total (4.2) en ce qui concerne le traitement analytique des échantillons, car il repose sur la même méthodologie. Le même équipement et les mêmes réactifs chimiques doivent être préparés. Les échantillons doivent être préparés et traités de la même manière, de même que les blancs de réactifs et les étalons préparés. Lorsqu'il est nécessaire de déterminer les concentrations de nitrate et d'orthophosphate, il convient d'appliquer le Protocole pour la détermination colorimétrique automatisée des concentrations de nitrate et d'orthophosphate pour chacun des composés analysés. Les problèmes pouvant survenir sont les mêmes que ceux identifiés pour les méthodes automatisées de détermination des concentrations de nitrate et d'orthophosphate, et il convient de les traiter de la manière indiquée dans lesdites méthodes. Effectuer les calculs conformément aux indications générales de l'annexe I : Méthodes automatisées pour la détermination de la concentration des principaux nutriments dans l'eau de mer – Calcul de la concentration.

a. Symbole, unités et précision

Symbole : *c*(TN)	**Unité :** µmol L^{-1}	
Précision : ± 0,02	**Exactitude :** ± 0,02	**LD :** 0,03
Identificateur de méthode :	SDN:P01::**NTOTWCTX**	Concentration d'azote total {total_N} par unité de volume de la masse d'eau [phase particulaire dissoute et réactive] par oxydation et auto-analyse colorimétrique
Symbole : *c*(TP)	**Unité :** µmol L^{-1}	
Précision : ± 0,02	**Exactitude :** ± 0,02	**LD :** 0,05
Identificateur de méthode :	SDN:P01::**TPHSPP01**	Concentration de phosphore total {total_P CAS 7723-14-0} par unité de volume de la masse d'eau [phase particulaire dissoute et réactive] par oxydation et analyse colorimétrique

Annexe I (en Anglais)

Automated methods for determination of concentration of key nutrients in seawater – Calculation of the concentration

Automated methods for determination of concentration of key nutrients in seawater – Calculation of the concentration

1. Many automatic nutrient analysis systems are equipped with software that allows, with more or less sophisticated algorithms, to determine the height of the peak and to provide the concentration of the individual samples having previously determined the calibration and the reagent blank value. Although the software may be sophisticated, it is not always able to manage anomalous events, so it is advisable to continuously monitor the operation of the instrument.

3. Considering the current availability of calculation programs such as spreadsheets, the best solution is to obtain from the analyser the values of the three components necessary to calculate the concentrations, i.e. the blank value, that of the baseline near the samples and that of the individual samples. The procedure suggested below is certainly not the only one possible and, once again, it will be up to the operator to decide which paths to follow.

4. Operationally: The instrument is stabilized with the reagents and ultrapure water (DDW) for 15-20 minutes. It is verified that the hydraulics are stable (regular bubbles and stable baseline). The refractive index is then determined by continuously sampling first the ultrapure water (DDW) and then the washing water (OSW), having replaced one of the reagents, usually the one with lower flow rate, with ultrapure water. The difference in reading is recorded which corresponds to the false absorption due to refraction. The replaced reagent is reinserted, and the baseline is re-stabilized with DDW. For the analysis of the samples the DDW is replaced with OSW (the drawing needle is moved from one container to another) and waited for the baseline to re-stabilize. Then the sampler is activated by arranging the samples in groups (usually one or more stations) and taking care to combine the groups with an OSW reading. In this way each group of samples is sandwiched between two OSW readings, which allow a good control of baseline drift. It is also good practice to periodically analyze a series of solutions of known concentration (standards) which must always be prepared daily. Usually, at least one series of standards with increasing concentration is inserted at the beginning of the series of samples and one at the end. If the series of samples is very long, further series of intermediate standards can be inserted. Standards must be in increasing concentrations so that the difference between the lowest and highest includes the range of concentrations expected for the samples to be analysed. This procedure allows both to determine the linearity of response to the Lambert-Beer law (i.e. to determine the slope of the extinction / concentration line of the increasing standards which, in the absence of blank, should pass through the origin of the axes) in the expected concentration range, and to determine any variations in the efficiency of the method (gain) which would be highlighted by significant variations of this slope with the progress of the analysis. In fact, the slope of the initial standardization line, ie its angular coefficient and its reciprocal value F, will almost never coincide with those of the final and / or intermediate standards. The simplest solution to this problem is to take the average between initial, final and / or intermediate F and use this average F_m in the calculation. The most correct, but more complicated, procedure consists in determining the sequential reading "gain" sample by sample, similar to what is done for the calculation of the baseline drift and multiplying the reading value of each sample by its own F so determined. Once the samples have been analysed, it is good practice to re-measure the DDW reading and wash the circuit without the reagents.

5. To calculate the concentrations, the following quantities (the values are in the unit in use, cm if you read on the trace of a recorder or digital counts if you work on the outputs of the A / D converter) must be obtained:

V_{DDW} = value of the DDW reading at the time of blank determination

V_{OSW0} = value of the OSW reading after the blank (DDW)

R = OSW baseline variation in mm by refractive index

V_{OSWi} = value of the OSW reading that precedes the first of the samples of the group

N_{OSWi} = sequential number of the OSW reading that precedes the group of samples

V_{OSWn} = value of the OSW reading that follows the last of the group samples

N_{OSWn} = sequential number of the OSW reading after the last sample of the group

V_s = value of the sample reading

N_s = sequential number of the sample reading

D = drift

F_m = average factor obtained from the standard curves (the reciprocal of the slope or angular coefficient of the straight-line reading-concentration of the calibration samples)

c = concentration of the sample

the concentration of the sample is given by the equation:

$$c(\text{Nut.})/\ \mu\text{mol L}^{-1} = [V_s - D\ (N_s - N_{OSWi}) - V_{OSWi} + (VOSW0 - V_{DDW}) - R]\ F_m$$

where the drift (D) is given by:

$$D = (V_{OSWn} - V_{OSWi}) / (N_{OSWn} - N_{OSWi})$$

6. The refractive index refers to the shift of the baseline in the absence of reactants due to the difference in salinity between deionized distilled water (DDW) and oligotrophic water (OSW).

Annexe II
Références

Références

Grasshoff, K., Kremling, K., Ehrhardt, M. (eds), 1999. Methods of Seawater Analysis 3rd 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.

Orthophosphate

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.

Boltz D.F., Mellon M.G. (1947) Determination of phosphorus, germanium, silicon, and arsenic by the heteropolyblue method. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 19, 873-877.

De Jonge V.N., Villerius L.A. (1980) Interference of sulphide in inorganic phosphate determination in natural waters. Mar. Chem., 9, 191-197.

Deniges M.G. (1920) Reaction de coloration extrêmement sensible des phosphates et des arseniates. Ses applications. C. R. Acad. Sci., Paris, 171, 802-804.

Koroleff F. (1983a) Determination of phosphorus. In: “Methods of Seawater Analysis”, Grasshoff K., M. Ehrhardt, K. Kremling Eds, Verlag Chemie, Weinheim, 125-139.

Murphy J., Riley J.P. (1958) A single-solution method for the determination of soluble phosphate in sea water. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 37, 9-14.

Murphy J., Riley J.P. (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Analytica Chim. Acta, 27, 31-36.

Novoselov A.A., Sheremet’Yeva A.I., Danilenko A.F. (1976) Method for simultaneous obtaining silicon-free and phosphate-free sea water aboard ship. Oceanology, 16, 358-359.

Orthosilicate

Bien G.S. (1958) Salt effect correction in determining soluble silica in sea water silicomolybdic acid method. Anal. Chem., 30, 1525-1526.

Burton J.D., Leatherland T.M. (1970) The reactivity of dissolved silicon in some natural waters. Limnol. Oceanogr., 15, 473-476.

Fanning K.A., Pilson M.E.Q. (1973) On the spectrophotometric determination of dissolved silica in natural waters. Anal. Chem., 45, 136-140.

MacDonald R.W., McLaughlin F.A. (1982) The effect of storage by freezing on dissolved inorganic phosphate, nitrate and reactive silicate for samples from coastal and estuarine waters. Water Res., 16, 95-104.

MacDonald R.W., McLaughlin F.A., Wong C.S. (1986) The storage of reactive silicate samples by freezing. Limnol. Oceanogr., 31, 1139-1142.

Morrison I.R., Wilson A.L. (1963) The absorptiometric determination of silicon in water. Part I. Formation, stability and reduction of [β- and α-molybdosilicic acids. Analyst, 88, 88-99.

Mullin J.B., Riley J.P. (1955) The colorimetric determination of silicate with special reference to sea and natural waters. Analytica Chim. Acta, 12, 162-176.

Strickland J.D.H. (1952) The preparation and properties of silicomolybdic acid. II. The preparation and properties of alpha silicomolybdic acid. J. Amer. Chem. Soc., 74, 868-871

Truesdale V.W., Smith C.J. (1975) The formation of molybdosilicic acids from mixed solutions of molybdate and silicate. Analyst, 100, 203-212.

Total Nitrogen and total Phosphorous

Koroleff F. (1968) Determination of total phosphorus in natural waters by means of persulphate oxidation. ICES C.M./C, 33, 209-212.

Koroleff, F. (1983b) Total and organic nitrogen. In: “Methods of Seawater Analysis”, Grasshoff K., M. Ehrhardt, K. Kremlin Eds, Verlag Chemie, Weinheim, 162-173.

Nydahl F. (1978) On the peroxidisulphate oxidation of total nitrogen in waters to nitrate. Talanta, 12, 1123-1130.

Valderrama J.C. (1981) The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. Mar. Chem., 10, 109-122