

NOTES TECHNIQUES
SCIENCES DE LA MER
OCÉANOGRAPHIE

N° 2

1995

Manuel d'analyses chimiques dans l'eau de mer

Sylvain BONNET

NOTES TECHNIQUES
SCIENCES DE LA MER
OCÉANOGRAPHIE

N° 2

1995

Manuel d'analyses chimiques dans l'eau de mer

Sylvain BONNET



L'INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE
POUR LE DÉVELOPPEMENT EN COOPÉRATION

CENTRE DE NOUMÉA

© ORSTOM, Nouméa, 1995

/Bonnet, S.

Manuel d'analyses chimiques dans l'eau de mer

Nouméa : ORSTOM. Décembre 1995. 45 p.

Notes Tech. : Sci. Mer ; Océanogr. ; 2

Ø20PHYCHI

ANALYSE CHIMIQUE ; CHIMIE DE L'EAU ; COLORIMETRIE ; CAMPAGNE OCEANOGRAPHIQUE
; PRELEVEMENT ; METHODE D'ANALYSE

Imprimé par le Centre ORSTOM
Décembre 1995

 ORSTOM Nouméa
REPROGRAPHIE

TABLE DES MATIERES

I INTRODUCTION

II ANALYSES COLORIMETRIQUES

1) PHOSPHATE

2) NITRATE + NITRITE

3) NITRITE

4) AMMONIUM

5) SILICATE

6) AZOTE ET PHOSPHORE ORGANIQUE DISSOUS

7) AZOTE ET PHOSPHORE PARTICULAIRE

8) ANNEXE

III DOSAGE DE L'OXYGENE DISSOUS

IV DOSAGE DE L'ADENOSINE TRIPHOSPHATE

I INTRODUCTION

Le but de ce manuel est de faire le point sur les méthodes d'analyses utilisées par le Laboratoire de Chimie Océanographique du Centre ORSTOM de Nouméa, dans le cadre du programme PROPPAC (PROduction Pélagique dans le PACifique ouest) terminé en 1992 et du programme FLUPAC (FLUx dans l'ouest du PACifique) actuellement en cours.

La plupart de ces méthodes d'analyses s'appuient sur les ouvrages de Strickland et Parsons(1972), Grasshoff et al.(1983), Aminot et Chaussepied(1983).

Ces méthodes ont évolué depuis le début de ces programmes et évolueront encore.Elles ont été testées au laboratoire et en mer, lors des campagnes océanographiques suivantes :

PROPPAC	01	du 09/09/87 au 08/10/87
SURTROPAC	09	du 15/01/88 au 11/02/88
PROPPAC	02	du 27/03/88 au 27/04/88
SURTROPAC	10	du 13/06/88 au 11/07/88
PROPPAC	03	du 11/09/88 au 11/10/88
PRG LAGON		du 24/10/88 au 18/11/88
SURTROPAC	11	du 05/01/89 au 04/02/89
SURTROPAC	12	du 28/06/89 au 27/06/89
PROPPAC	04	du 30/10/89 au 26/11/89
SURTROPAC	13	du 01/12/89 au 28/12/89
PRG LAGON		du 10/07/90 au 04/08/90
ALIZE	02	du 02/01/91 au 06/03/91
EQUALIS		du 03/11/92 au 12/12/92
FLUPAC		du 02/10/94 au 07/11/94

Pour les méthodes colorimétriques, depuis Janvier 1994, l'acquisition des données se fait à l'aide du logiciel "ACQUIS" qui enregistre le signal sous forme numérique et le dépouillement est réalisé grâce au logiciel "ASTECH "(Lechauve et al.1992) .L'introduction de l'informatique a modifié, en amont, les méthodes de travail et a permis une plus grande précision dans les mesures et une rapidité accrue dans l'obtention des résultats.

II ANALYSES COLORIMÉTRIQUES: système TECHNICON d'analyse en flux continu.

1) PHOSPHATE

Principe : Les ions orthophosphates réagissent avec le molybdate pour former un complexe phospho-molybdique jaune. Les arsénates et les silicates réagissent également mais l'acide ascorbique réduit spécifiquement le complexe phospho-molybdique pour donner une forme bleue permettant un dosage colorimétrique sensible.

Il nous a été impossible de trouver, dans la littérature, la description de la réaction colorimétrique. Tout ce que nous pouvons écrire concerne les formules chimiques des réactifs de départ et des produits de la réaction.

* Ammonium heptamolybdate tétrahydraté $6\text{NH}_4, \text{Mo}_7 \text{O}_{24}, 4\text{H}_2\text{O}$

* Acide phospho-molybdique

$\text{H}_7[\text{P}(\text{Mo}_2\text{O}_7)_6], 28\text{H}_2\text{O}$ où $(12 \text{ MoO}_3, \text{H}_3\text{PO}_4)$

* Oxytartrate d'antimoine(III) et de potassium hydraté

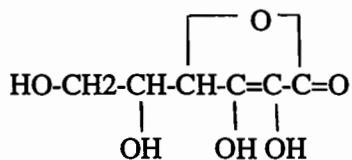
$\text{K}(+), \text{SbO}(+), \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6(2-)$

* Acide tartrique $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$

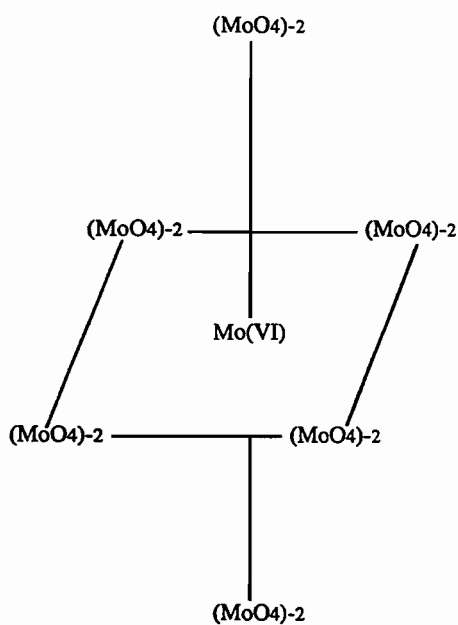


* Acide ascorbique, réducteur du complexe phospho-molybdique

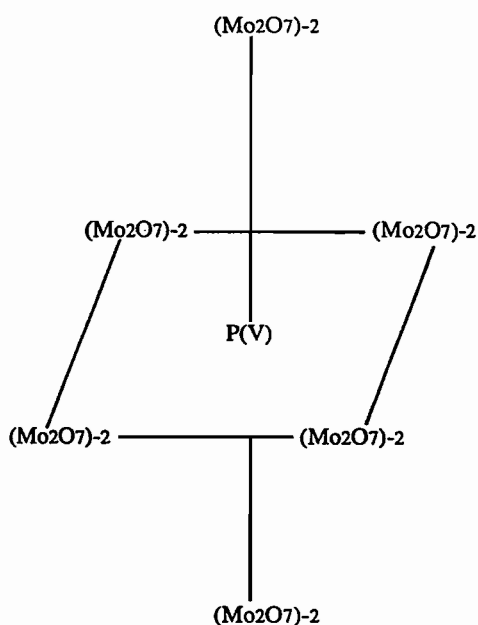
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$



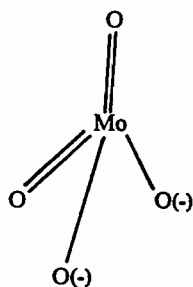
Le complexe Hepta-molybdique
[Mo(MoO₄)]₆⁻⁶



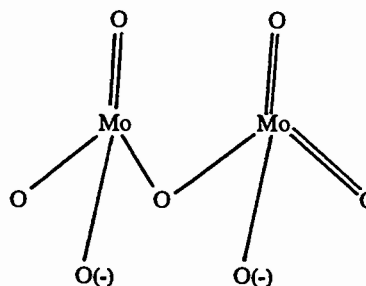
Le complexe phospho-molybdique
[P(Mo₂O₇)]₇⁻⁷



L'ion molybdate (MoO₄)⁻²



L'ion bimolybdate (Mo₂O₇)⁻²



Commentaire: Pour le complexe hepta-molybdique, l'ion central "Mo" a le degré d'oxydation "VI". Il développe une hybridation "d²sp³" et a une structure octaédrique. L'ion phosphore du complexe phospho-molybdique, a un degré d'oxydation "V" et une hybridation "sp³d²" qui correspond à une structure octaédrique. Les complexes phospho-molybdiques ont un rapport stœchiométrique de 1/12 entre les atomes P et Mo.

MANIFOLD

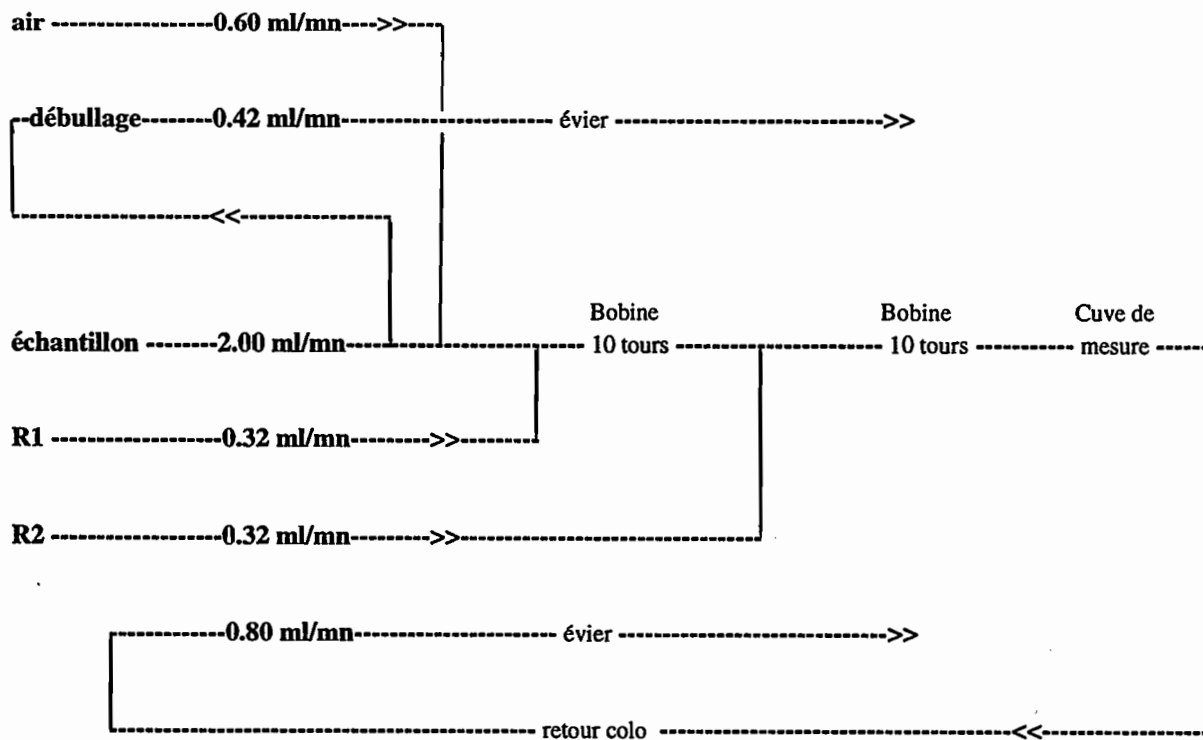
échantillon	: 2,00 ml/mn	vert
débullage	: 0,42 ml/mn	orange
R1	: 0,32 ml/mn	noir
R2	: 0,32 ml/mn	noir
air	: 0,60 ml/mn	blanc
	0,42 ml/mn	orange
retour colo	: 0,80 ml/mn	rouge
	1,00 ml/mn	gris

ECHANTILLONNEUR

came	: 20 2/1
rinçage	: eau de mer synthétique, NaCl 35 g/L

COLORIMETRE

faisceau A	: Cuve L=50 mm ; O=2 mm
faisceau B	: air
filtre interférentiel	: 880 nm
phototube	: 199 B021 04
Damp	: 2
calibration utilisée pour	
le logiciel ACQUIS	: 5
gamme utile	: 0 - 1,5 μ M



MANIFOLD PHOSPHATE

Réactifs

La préparation des réactifs n'est valable que pour les débits utilisés dans le schéma de la page précédente.

SOLUTION D'ANTIMOINE

oxytartrate d'antimoine et de potassium3 g
eau déminéralisée q.s.p1000 ml

REACTIF N°1 - R1 :Solution d'acide ascorbique

acide ascorbique6,64 g
eau déminéralisée q.s.p500 ml

REACTIF N°2 - R2 :Préparation du réactif molybdique

acide sulfurique concentré (d=1,83).....67 ml
heptamolybdate d'ammonium10 g
solution d'antimoine15 ml
eau déminéralisée q.s.p1000 ml

SOLUTION ETALON à 1000 µM.

potassium dihydrogénophosphate KH_2PO_4 0,1362 g
eau déminéralisée q.s.p1000 ml

Gamme étalons (voire p 30)

REMARQUE : Le réactif molybdique se garde environ 1 mois. La solution d'acide ascorbique doit être changée dès que la pente d'étalonnage commence à augmenter.

Sortie imprimante des données sur le logiciel de traitement "ASTECH"

ETALONNAGE test28 P04

Table des etalons		Modele lineaire		Modele exponentiel	
U	Conc.	C.cal	delta	C.cal	delta
1.	.00	.08	.08	.00	.00
238.	2.00	1.99	-.01	1.88	-.12
600.	5.00	4.91	-.09	4.77	-.23
1226.	10.00	9.96	-.04	9.82	-.18
1857.	15.00	15.05	.05	14.98	-.02

Seuil = 15.00

F = .008069 r2 = .99988

Fn1 = 381.41 A = 48200. r2 = .99974

CONCENTRATIONS CALCULEES test28 P04

Dernier modele experimental calcule

F	r2	Seuil	Fn1	A	r2
.008069	.99988	15.00	381.41	48200.	.99974

Modele utilise pour le calcul des concentrations

F	Seuil	Fn1	A	Eff.sel
.008069	15.00	381.41	48200.	.00

Table des concentrations calculees			Concentrations injectees
Lib.	U	Conc.	
1	611.	4.93	0,500 µM
2	616.	4.97	0,500 µM
3	613.	4.95	0,500 µM
4	1207.	9.74	1,000 µM
5	1225.	9.88	1,000 µM
6	1222.	9.86	1,000 µM
7	1846.	14.90	1,500 µM
8	1845.	14.89	1,500 µM
9	1853.	14.95	1,500 µM

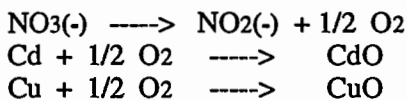
REMARQUE:Le logiciel " ASTECH " n'admet que des nombres à 2 décimales.Pour les dosages nécessitant plus de précision (c'est le cas de l'analyse des phosphates), il faut multiplier par dix la valeur des étalons introduits et diviser les concentrations des échantillons et pente d'étalonnage calculées par un facteur dix.Les concentrations de la gamme étalon sont respectivement de: 0,200 µM; 0,500 µM; 1,000 µM; 1,500 µM.

Commentaire:En utilisant le calibre 5, la dispersion des valeurs de 3 répliquats d'un même échantillon est de l'ordre de 0,010 µM ce qui correspond à une tension de 12 mV.La précision de la mesure est inférieure à 0,005 µM.La limite de détection est fixée à 0,010 µM.

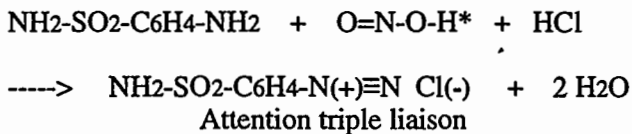
2) NITRATE + NITRITE

Principe : Les ions nitrates sont réduits en ions nitrites par le passage sur une colonne de cadmium cupérisé en présence de chlorure d'ammonium. Les ions nitrites sont ensuite déterminés par diazotation avec le sulfanilamide et copulation avec le naphthyl-éthylène-diamine pour former un composé fortement coloré en rouge, dosé au colorimètre. Les nitrites initialement présents dans l'échantillon réagissent également.

Réaction (d'oxydo)- réduction des ions nitrates.



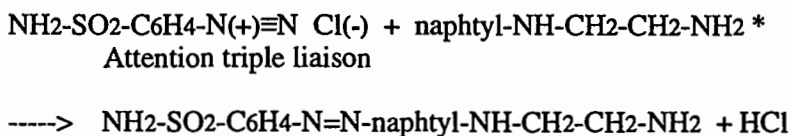
Formation du diazonium entre le sulfanilamide et l'ion nitrite.



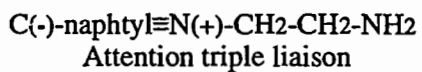
* $\text{O}=\text{N-O-H}$, acide nitreux (instable) formé avec $\text{NaNO}_2 + \text{HCl}$



Réaction de copulation avec le N-naphtyl éthylène diamine.



* forme mésomère du N,naphtyl éthylène diamine



MANIFOLD

échantillon	: 2,50 ml/mn	violet/■	(haute sensibilité)
	: 0,60 ml/mn	blanc	(basse sensibilité)
débullage	: 1,00 ml/mn	gris	
NH ₄ CL	: 2,50 ml/mn	violet	(basse sensibilité)
	: 0,10 ml/mn	orange/vert	(haute sensibilité)
R1	: 0,10 ml/mn	orange/vert	
R2	: 0,05 ml/mn	orange/bleu	
air	: 0,60 ml/mn	blanc	
	: 0,42 ml/mn	orange	
retour colo	: 0,60 ml/mn	blanc	
	: 0,80 ml/mn	rouge	

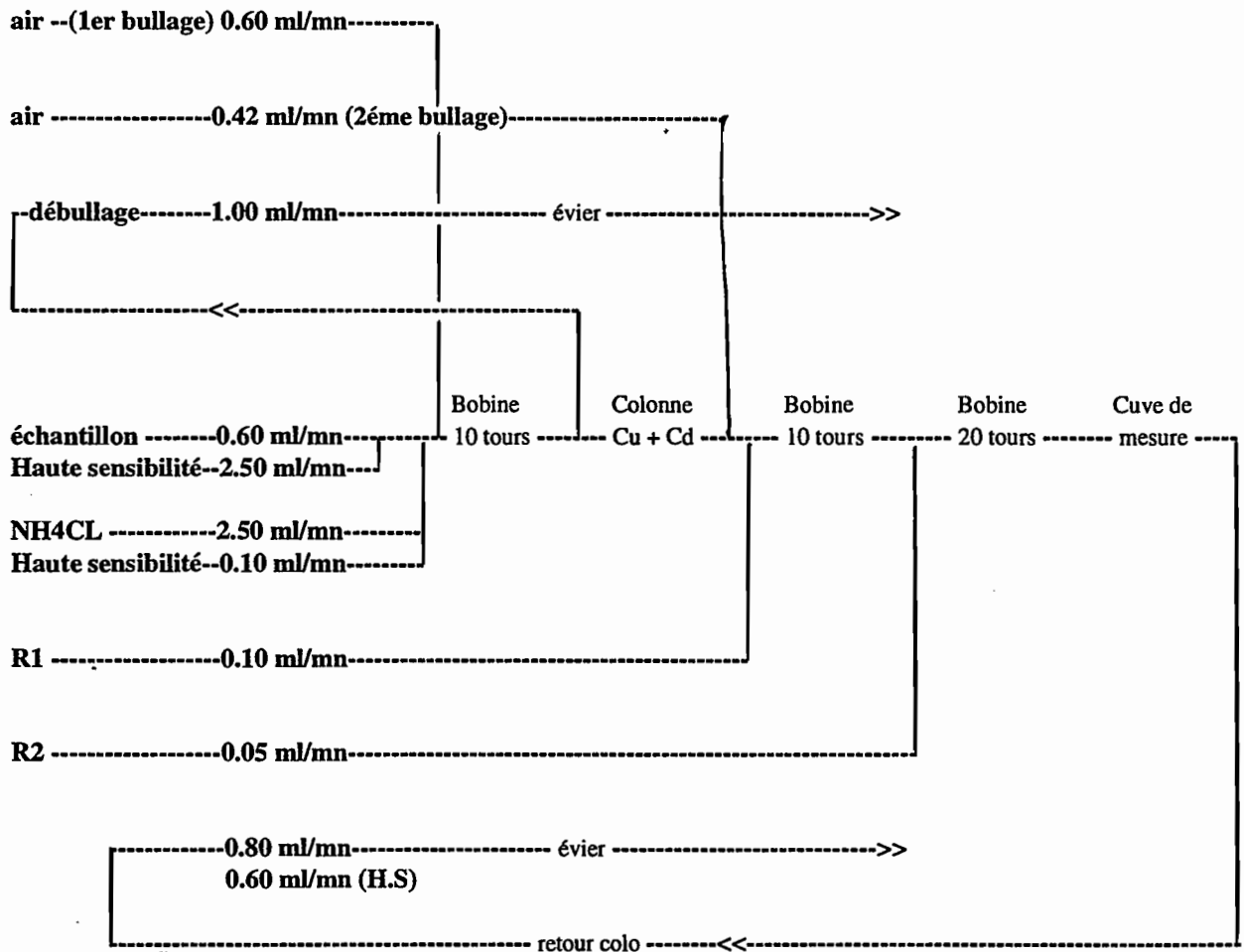
ECHANTILLONNEUR

came	: 20 2/1
rinçage	: eau de mer synthétique

COLORIMETRE

faisceau A	: Cuve L=50 mm ; O=2 mm
faisceau B	: air
filtres interférentiels	: 525 nm ou 550 nm
phototubes	: 199 B021 01 ou 199 B021 03
Damp	: 2
Basse sensibilité	
calibration utilisée pour	
le logiciel ACQUIS	: 2
gamme utile	: 0 - 15 µM
Haute sensibilité	
calibration utilisée pour	
le logiciel ACQUIS	: 6
gamme utile	: 0 - 1 µM

Pour les concentrations de nitrates + nitrites < à 1 µM, la méthode "Haute sensibilité" (Oudot et Montel 1988) permet d'obtenir des mesures nano-molaires.



MANIFOLD NITRATE + NITRITE
Haute et Basse sensibilité

Réactifs

La préparation des réactifs n'est valable que pour les débits utilisés dans le schéma de la page précédente.

SOLUTION DE CHLORURE D'AMMONIUM

1) Basse sensibilité

chlorure d'ammonium10 g
eau déminéralisée q.s.p1000 ml

2) Haute sensibilité

chlorure d'ammonium50 g
eau déminéralisée q.s.p250 ml

REACTIF N°1 - R1 : Solution de chlorure de sulfanilamide

sulfanilamide10 g
acide chlorhydrique concentré (d=1,19)100 ml
eau déminéralisée q.s.p500 ml

REMARQUE : N'ajouter l'acide chlorhydrique qu'après avoir mis le sulfanilamide en suspension dans 300 ml d'eau environ.

REACTIF N°2 - R2 : Solution de naphthyl

naphthyl éthylène diamine2 g
eau déminéralisée q.s.p500 ml
Brij 35 ou Levor IV (éventuellement)1 ml

SOLUTION ETALON à 10000 µM

nitrate de potassium1,0112 g
eau déminéralisée q.s.p1000 ml
chloroforme1 ml

Gamme étalons (voire p 30)

Préparation de la colonne réductrice

a) Préparation du cadmium

Réactifs

SOLUTION D'ACIDE CHLORHYDRIQUE 2 N

acide chlorhydrique concentré (d=1,19)170 ml
eau déminéralisée q.s.p1000 ml

SOLUTION D'ACIDE NITRIQUE 0,3 N

acide nitrique concentré (d=1,50)20 ml
eau déminéralisée q.s.p1000 ml

SOLUTION DE SULFATE DE CUIVRE à 2 %

sulfate de cuivre20 g
eau déminéralisée q.s.p1000 ml

Opérations

Utiliser du cadmium en poudre: 0,3 - 1,5 mm de diamètre (Ref MERCK art.2001).

Le tamiser à l'aide d'un vibreur électrique (type Analysette FRISCH Modèle 03.502) ou manuellement, avec des tamis de 0,90 mm et 0,56 mm de diamètre. Eliminer la fraction fine et la fraction grossière.

Mettre 50 g de cadmium dans un flacon étanche (type flacon à oxygène de 250 ml) et laver avec la solution d'acide chlorhydrique (dégagement d'hydrogène).

Rincer à l'eau déminéralisée.

Laver avec la solution d'acide nitrique et rincer à l'eau déminéralisée.

Relaver avec la solution d'acide chlorhydrique et rincer à l'eau déminéralisée.

Traiter le cadmium par environ 100 ml de la solution de sulfate de cuivre.

Prendre soin de fermer hermétiquement le flacon pour éviter la formation de bulles d'air.

Agiter le flacon jusqu'au virage de la solution, du bleu au noir.

Rincer abondamment à l'eau déminéralisée.

Renouveler l'opération en secouant énergiquement de manière à ce que tout le cuivre colloïdal en excès passe en suspension.

A la fin, l'eau de rinçage doit être claire.

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

b) préparation de la colonne réductrice

Prendre un tuyau plastique de diamètre interne 4 mm et de longueur comprise entre 20 et 25 cm (tube PVC polylabo, Ref.8001-0406).

Coller à l'aide de cyclohexanone, à l'une des extrémités, un tube manifold Technicon de diamètre inférieur (Ref.116-0536-18, débit 3,90 ml/mn) et de 2 cm de long. Introduire de la laine de verre de façon à former un filtre de 1 cm à cette extrémité. Obstruer le tube manifold entre le filtre et l'extrémité en utilisant une pince de Mohr.

A l'aide d'une seringue de 10 ml, remplir la totalité du tuyau de chlorure d'ammonium sans laisser de bulles d'air.

Faire pénétrer le cadmium traité (cf. schéma) à l'autre extrémité (celle où il n'y a pas de tube manifold) sans laisser d'espace, jusqu'à environ 2 cm. Coller une autre longueur de tube manifold et former un second filtre avec la laine de verre.

Relier les deux extrémités par un "nipple".

Orienter le flux en dessinant plusieurs flèches sur la colonne.

Avant de l'utiliser, brancher la colonne sur le circuit analytique et faire passer une solution de nitrate à 30 μM (300 μl de la solution étalon à 10000 μM dans 100 ml d'eau de mer synthétique) pendant 20 mn.

La colonne est désormais utilisable.

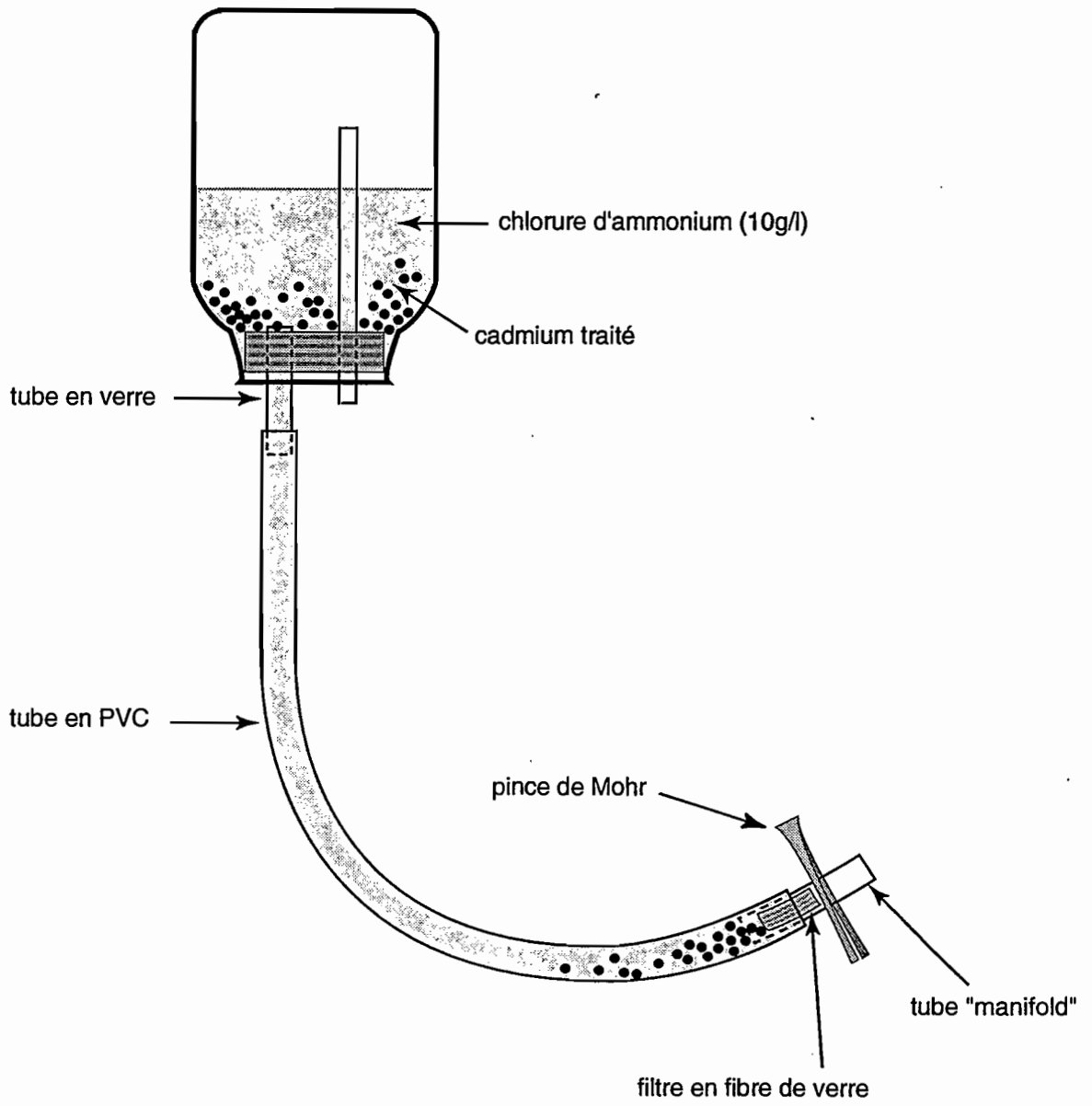
REMARQUE : Les colonnes se conservent dans la solution de chlorure d'ammonium.

Avant de brancher la colonne, vérifier que le chlorure d'ammonium passe dans le circuit analytique.

Lors du branchement de la colonne, éviter la formation de bulles d'air.

La colonne réductrice permet environ l'analyse de 500 échantillons.

Utiliser une colonne différente pour les analyses Basse et Haute sensibilité.



Sortie imprimante des données sur le logiciel de traitement "ASTECH"

ETALONNAGE		test16		NO3hs	

Table des etalons		Modele lineaire		Modele exponentiel	
U	Conc.	C.cal	delta	C.cal	delta
400.	1.00	1.00	.00		
831.	2.00	2.06	.06		
1997.	5.00	4.90	-.10		
4098.	10.00	10.04	.04		

Seuil = 10.00

F = .002443

r2 = .99972

CONCENTRATIONS CALCULEES test16 NO3hs

Dernier modele experimental calcule

F	r2	Seuil	Fn1	A	r2
.002443	.99972	10.00	.00	0.	.00000

Modele utilise pour le calcul des concentrations

F	Seuil	Fn1	A	Eff.sel
.002443	10.00	.00	0.	.00

Table des concentrations calculees

Concentrations injectees

Lib.	U	Conc.	
1	95.	.23	0,025 µM
2	96.	.23	0,025 µM
3	74.	.18	0,020 µM
4	73.	.18	0,020 µM
5	57.	.14	0,015 µM
6	60.	.15	0,015 µM
7	37.	.09	0,010 µM
8	36.	.09	0,010 µM
9	32.	.08	0,005 µM
10	30.	.07	0,005 µM

REMARQUE:Le logiciel " ASTECH " n'admet que des nombres à 2 décimales.Pour les dosages nécessitant plus de précision (c'est le cas de l'analyse des nitrates "Haute sensibilité"), il faut multiplier par dix la valeur des étalons introduits et diviser les concentrations des échantillons et pente d'étalonnage calculées par un facteur dix.Les concentrations de la gamme étalon sont respectivement de: 0,100 µM; 0,200 µM; 0,500 µM; 1,000 µM.

Commentaire:En utilisant le calibre 6, la dispersion des valeurs de 2 répliquats d'un même échantillon est de l'ordre de 0,002 µM ce qui correspond à une tension de 10 mV.La précision de la mesure est inférieure à 0,002 µM.La limite de détection est fixée à 0,005 µM.

3) NITRITE

Principe : Les ions nitrites sont déterminés par diazotation avec le sulfanilamide et copulation avec le naphthyl éthylène diamine pour former un composé fortement coloré en rouge, dosé au colorimètre. Les réactions chimiques sont identiques à celles décrites pour l'analyse des nitrates.

MANIFOLD

échantillon	: 2,00 ml/mn	vert
débullage	: 0,42 ml/mn	orange
R1	: 0,10 ml/mn	orange/vert
R2	: 0,05 ml/mn	orange/bleu
air	: 0,32 ml/mn	noir
	0,42 ml/mn	orange
retour colo	: 0,80 ml/mn	rouge
	1,00 ml/mn	gris

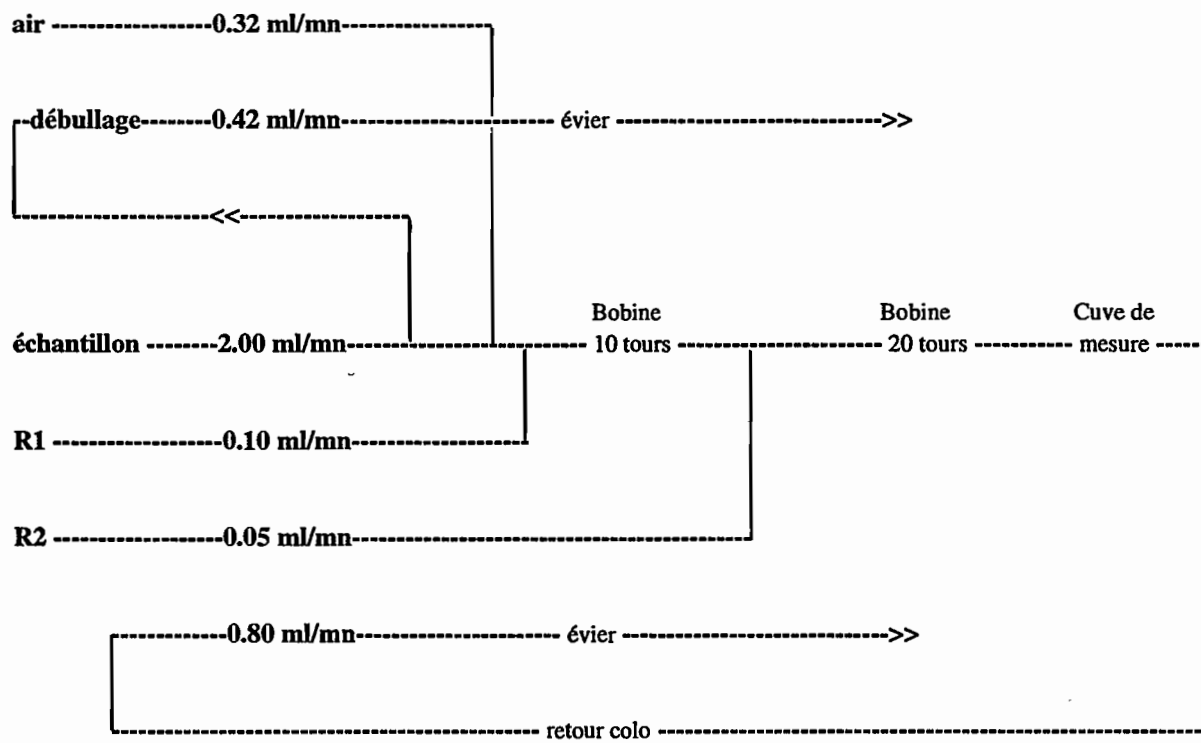
ECHANTILLONNEUR

came	: 20 2/1
rinçage	: eau de mer synthétique

COLORIMETRE

faisceau A	: cuve L=50 mm ; O=2 mm
faisceau B	: air
filtres interférentiels	: 550 nm ou 525 nm
phototubes	: 199 B021 01 ou 199 B021 03
Damp	: 2
Haute sensibilité	
calibration utilisée pour	
le logiciel ACQUIS	: 7
gamme utile	: 0 - 1 μ M

Pour les concentrations de nitrites $< 1 \mu\text{M}$, la méthode "Haute sensibilité" (Oudot et Montel 1988) permet d'obtenir des mesures nano-molaires.



MANIFOLD NITRITE
Haute sensibilité

Réactifs

La préparation des réactifs n'est valable que pour les débits utilisés dans le schéma de la page précédente.

REACTIF N°1 - R1 : Solution de chlorure de sulfanilamide

sulfanilamide	10 g
acide chlorhydrique concentré (d=1,19)	100 ml
eau déminéralisée q.s.p	500 ml

REMARQUE: N'ajouter l'acide chlorhydrique qu'après avoir mis le sulfanilamide en suspension dans 300 ml d'eau environ.

REACTIF N°2 - R2 : Solution de naphtyl

naphtyl éthylène diamine	2 g
eau déminéralisée q.s.p	500 ml
Brij 35 ou Levor IV (éventuellement).....	1 ml

SOLUTION ETALON à 5000 μ M

nitrite de sodium	0,3450 g
eau déminéralisée q.s.p	1000 ml
chloroforme	1 ml

Gamme étalons (voire p 30)

Sortie imprimante des données sur le logiciel de traitement "ASTECH"

ETALONNAGE test39 NO2hs

Table des étalons		Modele lineaire		Modele exponentiel	
U	Conc.	C.cal	delta	C.cal	delta
2.	.00	-.04	-.04	.00	.00
503.	1.00	1.01	.01	1.01	.01
1255.	2.50	2.59	.09	2.56	.06
2372.	5.00	4.93	-.07	4.90	-.10
3603.	7.50	7.52	.02	7.56	.06

Seuil = 7.50
F = .002099 r2 = .99961
Fn1 = 87.67 A = 43600. r2 = .99956

CONCENTRATIONS CALCULEES test39 NO2hs

Dernier modele experimental calcule
F r2 Seuil Fn1 A r2
.002099 .99961 7.50 87.67 43600. .99956

Modele utilise pour le calcul des concentrations
F Seuil Fn1 A Eff.sel
.002099 7.50 87.67 43600. .00

Table des concentrations calculees			Concentrations injectées
Lib.	U	Conc.	
1	2366.	4.97	0,500 µM
2	2369.	4.97	0,500 µM
3	2378.	4.99	0,500 µM
4	2370.	4.97	0,500 µM
5	2366.	4.97	0,500 µM
6	2367.	4.97	0,500 µM
7	1254.	2.63	0,250 µM
8	1256.	2.64	0,250 µM
9	1252.	2.63	0,250 µM
10	1254.	2.63	0,250 µM
11	1257.	2.64	0,250 µM
12	1259.	2.64	0,250 µM

REMARQUE:Le logiciel " ASTECH " n'admet que des nombres à 2 décimales.Pour les dosages nécessitant plus de précision (c'est le cas de l'analyse des nitrites "Haute sensibilité"), il faut multiplier par dix la valeur des étalons introduits et diviser les concentrations des échantillons et pente d'étalonnage calculées par un facteur dix.

Commentaire:Suite à de nombreux tests, la précision des analyses de nitrites "Haute sensibilité", à l'aide du logiciel "ASTECH", sur une étendue de mesures de 0 à 1,000 µM (Cal.7) est de 0,002 µM.La limite de détection est fixée à 0,005 µM.La dispersion des répliquats sur les différents étalons de même concentration (Test39) est inférieure à 10 mV soit 0,002 µM.

La valeur des concentrations des étalons, recalculée à partir de la droite de régression linéaire est et doit être au maximum comprise dans un intervalle de 0,010 µM.

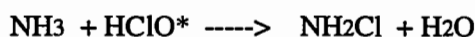
4) AMMONIUM

Principe : les ions ammonium réagissent avec le dichlorocyanurate de sodium, en milieu alcalin, pour donner une monochloramine qui, en présence de phénol et d'un excès d'oxydant (le dichlorocyanurate), conduit à la coloration bleue d'indophénol.

La réaction est catalysée par l'ion nitroprussiate et aussi par la température (80 °C).

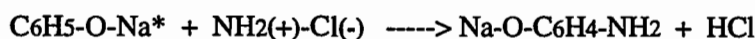
Le citrate sert à la fois de tampon à la réaction (pH 10,5) et de complexant pour les ions métalliques donants des hydroxydes insolubles à ce pH (Mg⁺⁺ et Ca⁺⁺).

Formation de la monochloramine



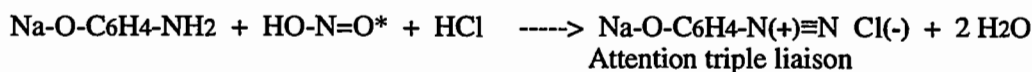
* l'ion hypo-chloreux est fourni par le dichlorocyanurate de sodium, (auparavant l'hypochlorite de sodium était utilisé)

Etape 1, formation d'une amine aromatique.

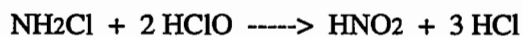


* O=C₆H₅(-) (en position para)
(forme mésomère)

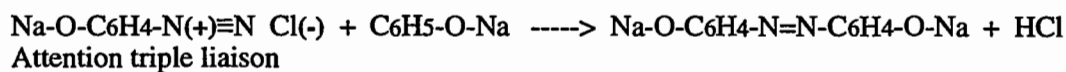
Etape 2, formation d'un sel de diazonium.



* Acide nitreux, composé instable, provenant de la réaction:



Etape 3, colorant diazoïque.



MANIFOLD

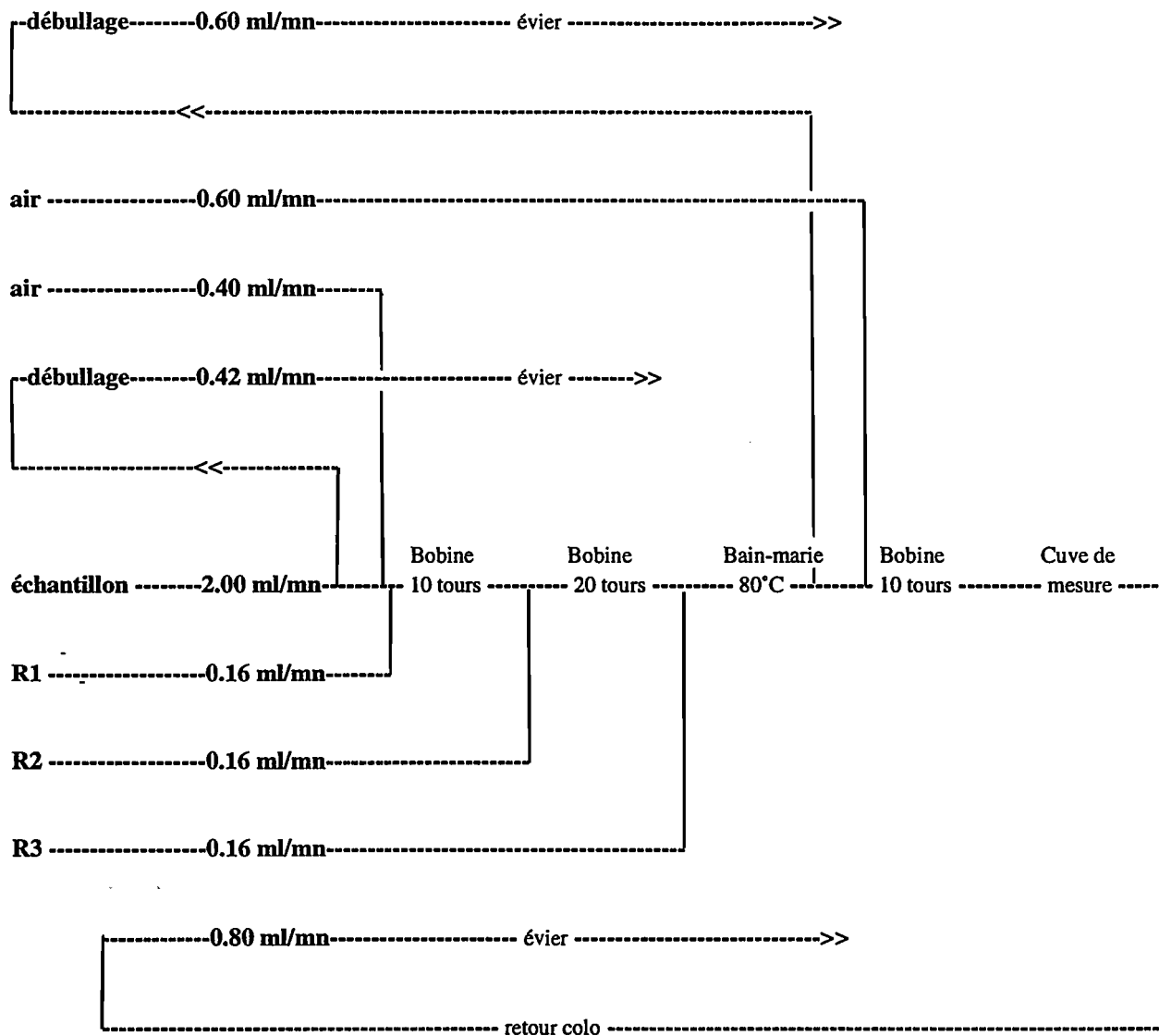
échantillon	: 2,00 ml/mn	vert
débullage	: 0,42 ml/mn	orange
R1	: 0,16 ml/mn	orange/jaune
R2	: 0,16 ml/mn	orange/jaune
R3	: 0,16 ml/mn	orange/jaune
air	: 0,60 ml/mn	blanc
	0,42 ml/mn	orange
retour colo	: 0,80 ml/mn	rouge
	1,00 ml/mn	gris

ECHANTILLONNEUR

came	: 20 2/1
rinçage	: eau de mer synthétique

COLORIMETRE

faisceau A	: Cuve L=50 mm ; O=2 mm
faisceau B	: air
filtre interférentiel	: 660 nm
phototubes	: 199 B021 01 ou 199 B021 03
Damp	: 2
calibration utilisée pour le logiciel ACQUIS	: 2
gamme utile	: 0 - 12,5 μ M



MANIFOLD AMMONIUM

Réactifs

La préparation des réactifs n'est valable que pour les débits utilisés dans le schéma de la page précédente.

REACTIF N°1 - R1 : Solution de citrate tri-sodique

citrate tri-sodique.....70 g
eau déminéralisée q.s.p250 ml

REACTIF N°2 - R2 : Solution de phénol

phénol35 g
nitroprussiate de sodium.....0,4 g
eau déminéralisée q.s.p1000 ml

REACTIF N°3 - R3

hydroxyde de sodium.....4,5 g
dichlorocyanurate de sodium.....1 g
eau déminéralisée q.s.p250 ml

SOLUTION ETALON à 5000 μ M

sulfate d'ammonium0,330 g
eau déminéralisée q.s.p1000 ml
chloroforme1 ml

Gamme étalons (voire p 30)

REMARQUE : Avant chaque dosage, il est très important de rincer le circuit avec une solution d'acide chlorhydrique à 10 % pendant 10 mn. Ensuite, brancher le bain-marie et attendre au moins 30 mn avant que la température de 75-80°C soit stabilisée en rinçant le circuit avec de l'eau de mer synthétique. Connecter les réactifs les uns à la suite des autres en prenant soin de vérifier que le premier ait atteint le circuit principal avant de brancher le second (pour éviter la précipitation des hydroxydes). L'air contenu dans les flacons des réactifs et celui provenant du tuyau de bullage doit être décontaminé par un flacon-laveur contenant une solution d'acide sulfurique à 10 % .

Sortie imprimante des données sur le logiciel de traitement "ASTECH"

ETALONNAGE test46 NH4

Table des etalons		Modele lineaire		Modele exponentiel	
U	Conc.	C.cal	delta	C.cal	delta
-2.	.00	.04	.04	.00	.00
312.	1.00	.84	-.16	.75	-.25
1998.	5.00	5.17	.17	4.90	-.10
4829.	12.50	12.44	-.06	12.39	-.11

Seuil = 12.50

F = .002568 r2 = .99939

Fn1 = 78.79 A = 33200. r2 = .99967

CONCENTRATIONS CALCULEES test46 NH4

Dernier modele experimental calcule

F	r2	Seuil	Fn1	A	r2
.002568	.99939	12.50	78.79	33200.	.99967

Modele utilise pour le calcul des concentrations

F	Seuil	Fn1	A	Eff.sel
.002568	12.50	78.79	33200.	.00

Table des concentrations calculees Concentrations injectees

Lib.	U	Conc.	
1	2009.	5.16	5,00 µM
2	2007.	5.15	5,00 µM
3	2011.	5.16	5,00 µM
4	2005.	5.15	5,00 µM
5	1991.	5.11	5,00 µM
6	2000.	5.14	5,00 µM
7	1993.	5.12	5,00 µM
8	4851.	12.46	12,50 µM
9	4831.	12.40	12,50 µM
10	4816.	12.37	12,50 µM
11	4827.	12.39	12,50 µM
12	4826.	12.39	12,50 µM
13	4801.	12.33	12,50 µM

Commentaire: Suite à de nombreux tests, la précision des analyses de l'ammonium, à l'aide du logiciel "ASTECH", sur une étendue de mesures de 0 à 12,5 µM (Cal.2) est de 0,05 µM, ce qui correspond à une tension de 20 mV. La limite de détection est fixée à 0,20 µM.

5) SILICATE

Principe : Les silicates réagissent avec le molybdate pour donner un complexe silico-molybdique jaune. Les phosphates et les arsénates réagissent également, mais les complexes formés sont décomposés par l'acide oxalique. Le métol agit sur le complexe silico-molybdique pour donner une forme réduite bleue permettant un dosage colorimétrique sensible.

Il nous a été impossible de trouver, dans la littérature, la description de la réaction colorimétrique. Tout ce que nous pouvons écrire concerne les formules chimiques des réactifs de départ et les produits de la réaction.

* Ammonium heptamolybdate tétrahydraté $6\text{NH}_4, \text{Mo}_7 \text{O}_{24}, 4\text{H}_2\text{O}$

* Acide silico-molybdique



* Acide oxalique $\text{HOOC-COOH}, 2 \text{H}_2\text{O}$

Réducteur du complexe silico-molybdique

* Sulfate de para-méthyl-amino-phénol (où metol)

* Sulfite de sodium Na_2SO_3

MANIFOLD

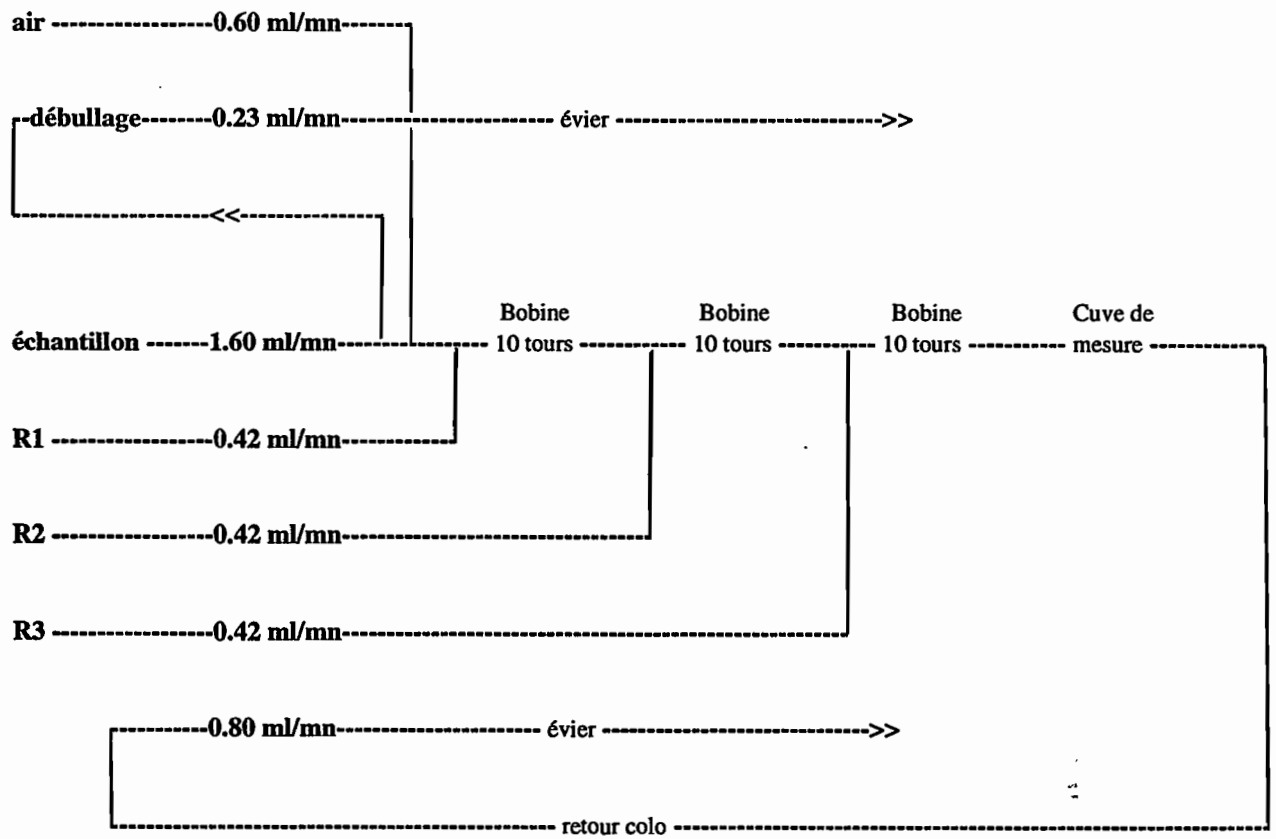
échantillon : 1,60 ml/mn jaune
débullage : 0,23 ml/mn orange/blanc
R1 : 0,42 ml/mn orange
R2 : 0,42 ml/mn orange
R3 : 0,42 ml/mn orange
air : 0,60 ml/mn blanc
0,42 ml/mn orange
retour colo : 0,80 ml/mn rouge
1,00 ml/mn gris

ECHANTILLONNEUR

came : 20 2/1
rinçage : eau de mer synthétique

COLORIMETRE

faisceau A : Cuve L=50 mm ; O=2 mm
faisceau B : air
filtres interférentiels : 880 nm où 660 nm
phototubes : 199 B021 04 où 199 B021 03
Damp : 2
calibration utilisée pour
le logiciel ACQUIS : 7
gamme utile : 0 - 12,5 μ M



MANIFOLD SILICATE

Réactifs

La préparation des réactifs n'est valable que pour les débits utilisés dans le schéma de la page précédente.

REACTIF N°1 - R1 :Solution de molybdate d'ammonium

molybdate d'ammonium	10 g
acide sulfurique 4,9 N.....	41 ml
(136 ml d'acide sulfurique concentré dans 1 L)	
eau déminéralisée q.s.p	1000 ml

REACTIF N°2 - R2 :Solution d'acide oxalique

acide oxalique.....	7 g
acide sulfurique concentré(d=1,84).....	50 ml
eau déminéralisée q.s.p	1000 ml

REACTIF N°3 - R3 :Solution de methyl amino phenol où Photo-rex

sulfite de sodium.....	12 g
sulfate de methyl amino phenol	10 g
eau déminéralisée q.s.p	1000 ml

SOLUTION ETALON à 5000 µM

silico fluorure de sodium Na ₂ SiF ₆	0,940 g
eau déminéralisée q.s.p	1000 ml
chloroforme	1 ml

Gamme étalons (voire p 30)

REMARQUE : La solution molybdique se garde environ 1 mois.

GAMMES ETALONS

PHOSPHATE:solution mère à 1000 μ M

Concentration	Volume dans 100 ml
0,2 μM	20 μ l
0,5 μM	50 μ l
- 1,0 μ M	100 μ l
1,5 μ M	150 μ l
2,0 μ M	200 μ l

0,4 μ M

NITRATE:solution mère à 10000 μ M

Concentration	Volume dans 100 ml
0,1 μ M	1 μ l
0,2 μ M	2 μ l
0,3 μ M	3 μ l
0,5 μ M	5 μ l
1,0 μ M	10 μ l
2,0 μ M	20 μ l
5,0 μ M	50 μ l
10,0 μ M	100 μ l

3 μ M

30 μ l

NITRITE:solution mère à 5000 μ M

Concentration	Volume dans 100 ml
0,10 μ M	2 μ l
0,25 μ M	5 μ l
0,50 μ M	10 μ l
1,00 μ M	20 μ l

SILICATE et AMMONIUM:solution mère à 5000 μ M

Concentration	Volume dans 100 ml
0,50 μM	10 μ l
- 1,00 μ M	20 μ l
- 5,00 μ M	100 μ l
- 20,00 μ M	400 μ l

0,25 μ M

A propos d' ASTECH:

La droite calculée lors des étalonnages ne prend pas en compte l'ordonnée à l'origine. Pour une meilleure précision, il est souhaitable de "forcer" la courbe pour qu'elle passe par l'origine. Lors de la saisie des étalons, il faut "cliquer" la ligne de base et introduire la concentration 0 μ M.

Le modèle "exponentiel" est calculé sous certaines conditions de corrélation.

6) AZOTE ET PHOSPHORE ORGANIQUE DISSOUS

6-1) OXYDATION AUX ULTRA-VIOLETS

Principe : La matière organique dissoute, en présence de peroxyde d'hydrogène, est oxydé par les rayons ultra-violet. Les nitrates, nitrites et phosphates ainsi formés sont dosés au Technicon avec les méthodes décrites précédemment. Les concentrations trouvées avant oxydation sont à soustraire de celles trouvées après oxydation pour obtenir les concentrations de l'azote et du phosphore organique dissous.

Mode opératoire :

Dans un tube en quartz:

- Verser 100 ml d'échantillon et 100 µl d'eau oxygénée à 110 volumes (30 %).
- Boucher.
- Agiter et bien nettoyer les parois du tube avec de l'alcool.
- Laisser 1 h 1/2 sous rayonnement U.V (appareil La Jolla Scientific).
- Refroidir et passer à l'auto-analyseur.

Il est nécessaire, pour éliminer la matière organique susceptible de se trouver sur les parois des tubes en quartz, de nettoyer ceux-ci avec le mélange sulfo-chromique où tout autre produit moins toxique mais aussi efficace.

Vérifier que le peroxyde d'hydrogène ne contient ni de nitrates, ni de phosphates. Pour cela, verser 100 µl de H₂O₂ dans une fiole de 100 ml et analyser.

Détermination d'un "blanc".

Nécessaire pour déterminer le rendement de minéralisation des différentes molécules organiques. Inutile pour l'analyse de M.O.D dans l'eau de mer.

Peut être un test de propreté des tubes en quartz.

Utiliser de l'eau de mer synthétique et procéder selon la méthode décrite ci-dessus.

REMARQUE: La composition qualitative et quantitative de la matière organique dissoute est mal connue et variable. Certaines molécules organiques sont réfractaires à la minéralisation.

Pour l'azote, en utilisant différentes molécules, nous avons montré que le taux de minéralisation dépendait de la nature des liaisons qu'avait l'atome d'azote avec le reste de la molécule (cf Tableau).

Si l'atome d'azote est inclus dans une chaîne linéaire (ex fonction amine R-NH₂), le taux de minéralisation est proche de 100 %. Si l'atome d'azote est inclus dans un cycle où dans une chaîne linéaire avec des doubles liaisons (ex fonction pyridine où diène), le taux de minéralisation est très variable. A cet égard, la molécule de thymine est très révélatrice de ce phénomène.

Les 2 atomes d'azote sont inclus dans un cycle mais la molécule a 2 isomères de constitution (tautomérie). Les 2 atomes d'azote sont reliés soit par des doubles, soit par des simples liaisons. Le rendement de la minéralisation se situe entre l'urée et la bipyridine.

L'augmentation du temps d'irradiation modifie à peine cette tendance. La technique de minéralisation de la matière organique aux U.V est facile à mettre en oeuvre mais le nombre d'échantillons est limité à douze par temps d'irradiation.

Tableau des rendements de minéralisation

Temps d'irradiation	N,N'Bipyridine		Thymine	Urée	
	1 h 1/2	3 h	3 h	3 h	6 h
Concentration					
2 μ M	52 %	68 %	83 %	95 %	100 %
8 μ M	53 %	57 %	83 %	95 %	95 %
20 μ M	43 %	47 %	73 %	83 %	84 %

6-2) OXYDATION HUMIDE au persulfate

Une nouvelle méthode est utilisée selon le protocole décrit par Pujot-Pay et Raimbault (1994). L'oxydation se fait grâce à un mélange de persulfate et d'acide borique, après cuisson à l'auto-clave.

Mode opératoire:

Dans un flacon* en téflon d'une capacité de 30 ml ou en verre (Flacon SCHOTT Duran), Verser 20 ml d'échantillon et 2,5 ml de réactif oxydant.

Boucher.

Passer à l'auto-clave à 115°C pendant 30 mn.

Refroidir et passer directement à l'auto-analyseur.

Réactif oxydant:

persulfate de potassium	15 g
acide borique	7,5 g
soude 1,5 M.....	70 ml
eau déminéralisée q.s.p	250 ml

Tableau des rendements de minéralisation

	Hydroxy8,Quinoleine	Thymine	Acétanilide	Urée
Concentration				
13,33 μ M	89 %	93 %		92 %
22,22 μ M	95 %	96 %	98 %	90 %

L'avantage de cette méthode, par rapport à l'oxydation aux U.V, est qu'elle est plus rapide à mettre en oeuvre (un grand nombre d'échantillons peut être traité à la fois) .Le milieu, qui est basique au départ, devient acide en fin de cuisson.Le rendement de molécules réfractaires comme l'hydroxy8,Quinoleine est particulièrement bon.

Pour le dosage du phosphore organique dissous sous forme de phosphates, la gamme de mesure s'étend jusqu'à 5 μM avec le même manifold.

En ce qui concerne l'azote organique dissous, la gamme peut s'étendre jusqu'à 35 μM avec un tube manifold pour l'échantillon de 0,30 ml/mn.

Il est indispensable de réaliser un "blanc de réactif" lors de chaque cuisson.

Procéder comme suit:

Mettre 2,5 ml de réactif oxydant dans un flacon SCHOTT, passer à l'auto-clave 30 mn, refroidir et compléter avec 20 ml d'eau de mer synthétique.Doser à l'auto-analyseur.La valeur est à déduire pour le calcul de l'azote et du phosphore organique dissous dans les échantillons (respectivement de l'ordre de 0,50 μM et 0,05 μM).

7) PHOSPHORE et AZOTE PARTICULAIRE OXYDATION HUMIDE au persulfate

Principe :Les particules sont recueillies, sur un filtre en fibre de verre (Whatman GF/F), traité à l'acide chlorhydrique 10 %, puis passé au four à 450°C pendant 1 h 1/2.

Pour le dosage du phosphore et de l'azote particulaire, le mode opératoire est identique à celui de l'azote et du phosphore organique dissous.Le filtre est mis dans un flacon* contenant 20 ml d'eau distillée avec 2,5 ml de réactif oxydant.

- Procéder de même pour les blancs (de réactifs, de filtres).

- Filtrer les échantillons sur filtre en fibre de verre avant le passage à l'auto-analyseur.

IMPORTANT:Il est nécessaire d'ajuster au pH 8,5 la solution de chlorure d'ammonium (10 g/l) pour le dosage des nitrates.

L'avantage est de doser aussi l'azote particulaire qui, normalement, est mesuré au CHN.Il est important de réaliser une intercalibration entre les deux méthodes.

REMARQUE: Le dosage du phosphore dans le zooplancton, par ce protocole, n'a pas donné des résultats satisfaisants.

Dans le zooplancton

Principe :Les organismes sont recueillis, soit sur une soie de 200 μm ou 35 μm rincée à l'eau distillée, soit sur des nacelles en aluminium lavées à l'éthanol, pesées vides et avec du zooplancton. (poids compris entre 100 et 2000 μg)

Tout le phosphore est oxydé en phosphate grâce à l'action conjuguée du persulfate de potassium et de la température (Menzel et Corwin 1965).Le phosphate est ensuite dosé au Technicon selon la méthode déjà décrite.

Pour cette méthode, l'azote particulaire est mesuré au CHN.

Mode opératoire :

- Déposer la soie ou la nacelle dans un flacon hermétique*.
- Ajouter 35 ml de persulfate de potassium à 5 g/l.
- Procéder de même pour les blancs (de réactifs, de soies et nacelles).
- Boucher. Passer à l'autoclave à 115°C pendant 1 h 1/2.

Pour la gamme étalon,

- Utiliser des concentrations de 1 - 2 - 5 - 10 μM de KH_2PO_4 , en remplaçant l'eau de mer synthétique par la solution de persulfate à 5 g/l.
- Verser environ 35 ml de chaque étalon dans un flacon.
- Boucher. Passer à l'autoclave à 115°C pendant 1 h 1/2.

Pour le manifold, le réglage du colorimètre et les réactifs, se reporter au dosage des phosphates. Il est possible de faire une dilution automatique en remplaçant, dans le manifold, le tube d'échantillon de 2,00 ml/mn par un tube de dilution de 1,20 ml/mn et un tube d'échantillon de 1,40 ml/mn.

* Les flacons sont en verre boro-silicaté, d'un volume de 50 ml et les bouchons en polyéthylène résistants aux conditions de cuisson (Flacon SCHOTT Duran Ref:21801 175). Les bouchons en bakélite sont à proscrire car ils se déforment et se fendent au bout de quelques cuissons.

8) ANNEXE

Réglage de l'auto-analyseur Technicon AAI

a) Réglage des fentes

- Réactifs branchés avec eau de mer filtrée ou synthétique
- Sur le colorimètre:
 - Régler le " ZERO " et le " FULL SCALE ".
 - Mettre le commutateur display sur " NORMAL ".
 - Bouton " BASELINE " à fond à droite, puis 5 fois sur la gauche.
 - Mettre le potentiomètre " STD. CAL. " sur 1.
- A l'aide de l'enregistreur, sur le colorimètre:
 - Tourner les deux mollettes de réglage (A) et (B) des diaphragmes à fond dans le sens horaire.
 - Fermer la mollette de réglage (B) du diaphragme de référence de façon à amener la plume sur la graduation " zéro " du papier enregistreur.
 - Fermer la mollette de réglage (A) du diaphragme de mesure de façon à amener la plume sur la graduation " 30 ".
 - Fermer la mollette de réglage (B) du diaphragme de référence de façon à amener la plume sur la graduation " zéro ".
 - Mettre le commutateur display sur "DAMP 2".
 - et le potentiomètre " STD. CAL. " sur la calibration usuelle.
 - Avec le bouton " BASELINE ", affiner le zéro.

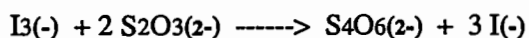
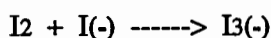
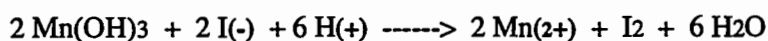
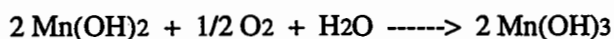
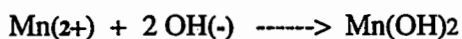
b) Focalisation de l'optique

- Sur le colorimètre:
 - Mettre le commutateur display sur " NORMAL ".
 - Mettre le potentiomètre " STD. CAL " sur 1.
- A l'aide de l'enregistreur, sur le colorimètre:
 - Tourner la mollette de réglage (A) du diaphragme de mesure à fond dans le sens des aiguilles d'une montre,
 - puis celle (B) du diaphragme de référence, pour amener la plume à mi-échelle.
 - Ouvrir le capot du colorimètre.
 - Faire tourner la vis de focalisation du phototube (A) de mesure pour amener la valeur affichée au minimum.
 - Faire tourner la vis de focalisation du phototube (B) de référence pour amener la valeur affichée au maximum.
 - Dévisser les 2 vis captives à tête moletée qui maintiennent l'écran en place et soulever l'écran.
 - Déplacer la lentille mobile le long de la glissière sur le canal de mesure pour amener la valeur affichée à son maximum.
 - Remettre l'écran en place.
 - Refaire les 2 réglages de focalisation.

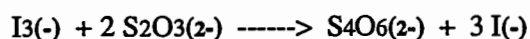
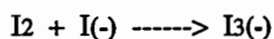
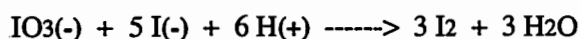
III DOSAGE DE L'OXYGENE DISSOUS

Principe : La détermination de l'oxygène dissous dans l'eau de mer est basée sur la méthode de WINKLER. La réaction du chlorure de manganèse sur la potasse produit l'hydroxyde de manganèse $Mn(OH)_2$. Cet hydroxyde forme avec l'oxygène dissous dans l'eau, en milieu alcalin, un autre hydroxyde. L'ion $Mn(2+)$ est oxydé en ion $Mn(3+)$. Le mélange des deux hydroxydes est dissous en milieu acide ($pH < 2,5$) et l'ion $Mn(3+)$ ainsi libéré, en présence d'iodure, est réduit en ion $Mn(2+)$. Lors de cette réaction d'oxydo-réduction, l'iodure se transforme en iode qui réagit avec l'excès d'iodure pour former un complexe $I_3(-)$. Dans la dernière étape, le complexe est dosé par le thiosulfate de potassium. Si nous faisons le bilan stoechiométrique de la réaction, il faut 1 mole de thiosulfate pour doser 1/4 de mole d'oxygène.

Réactions chimiques



Dosage du iodate



Réactifs

La préparation des réactifs n'est valable que pour les volumes utilisés dans le dosage.

REACTIF N°1 - R1 : Solution de chlorure de manganèse

chlorure de manganèse.....500 g
eau déminéralisée q.s.p1000 ml

REACTIF N°2 - R2 : Solution de potasse iodurée

hydroxyde de potassium.....336 g
iodure de potassium.....500 g
eau déminéralisée q.s.p1000 ml
Dissoudre d'abord l'hydroxyde de potassium dans 500 ml d'eau déminéralisée. La réaction est exothermique. Dissoudre ensuite l'iodure de potassium. Laisser refroidir avant d'ajuster.

REACTIF N°3 - R3 : Solution d'acide sulfurique

acide sulfurique (d=1.84).....225 ml
eau déminéralisée q.s.p1000 ml

SOLUTION DE THIOSULFATE 0,01 N

ampoule de thiosulfate 0,01 N Titrisol1
eau déminéralisée q.s.p1000 ml

SOLUTION DE IODATE DE POTASSIUM 0,005 N

SOLUTION Mère :

ampoule de iodate 0,1 N Titrisol1
eau déminéralisée q.s.p1000 ml

SOLUTION Fille :

solution Mère.....50 ml
eau déminéralisée q.s.p1000 ml

Prélevements des échantillons

Les échantillons d'eau de mer sont prélevés directement au robinet de la bouteille NISKIN, et versés dans des erlenmeyers au moyen d'un tuyau de petit diamètre. Éviter la formation de bulles dans le tuyau plastique de prélèvement et dans l'erien. Après un certain trop-plein, fermer les erlens avec les bouchons rodés.

Éviter l'emprisonnement de bulles d'air dans l'erien lors de sa fermeture.

L'addition des réactifs doit se faire sans délai et dans l'ordre suivant :

- 1 ml de réactif 1 : Chlorure de manganèse
- 1 ml de réactif 2 : Potasse iodurée
- Agiter vigoureusement.
- Laisser décanter entre 1/2 heure et 1 heure 1/2, agiter de nouveau.

REMARQUE : Pour chacun des réactifs, immerger la pointe de la pipette dans la solution.

En rebouchant l'échantillon, veiller à ne pas emprisonner de bulles ; si cela arrive, ajouter un peu d'eau distillée et reboucher en chassant la bulle.

Les échantillons sont ensuite stockés à l'abri de la lumière. Le délai minimum entre la fixation des échantillons et le dosage, est de l'ordre de 2 à 3 heures.

Mesures de routine

- Agiter le flacon de thiosulfate de l'unité interchangeable.
- Purger plusieurs fois la burette automatique de 5 ml à l'aide de la commande manuelle.
- Vérifier qu'il n'y a pas de bulles d'air dans le circuit.
- Ouvrir le trou de remplissage de l'électrode.

1°) Vérification de la reproductibilité du dosage.

- Verser 50 ml d'eau distillée dans le récipient de dosage
- Introduire les réactifs dans l'ordre inversé (3-2-1) en agitant après chaque ajout de réactif.
- Mettre le barreau magnétique.
- Introduire 2 ml de la solution de Iodate 0.005 N.
- Effectuer le dosage sur le Titroprocesseur 686 METROHM.

Paramètres du dosage sur le Titroprocesseur 686 METROHM:

- * Mode GET.
- * Vitesse de rotation du barreau aimanté : position 2 à 3.
- * Titration rate : 1.00 ml/mn.
- * Anticipation : 60
- * Stop V : 5 ml
- * Stop EP : 1
- * Start V : Retrancher 15 mV au potentiel de départ.
- * Temp : 23.5 °C
- * EP crit : 7

REMARQUE : La reproductibilité du volume de thiosulfate versé doit être comprise entre + ou - 5 µl. Pendant l'étalonnage supprimer le start V.

2°) Dosage des échantillons.

Premier échantillon :

- Enlever délicatement le bouchon rodé.
- Ajouter le réactif 3 : 1 ml d'acide sulfurique.
- Reboucher l'erlenmeyer sans faire de bulles.
- Agiter vigoureusement jusqu'à la dissolution complète.
- Enlever lentement le bouchon rodé.
- Prélever l'échantillon avec la Kimax de 50 ml.
- Verser dans le récipient spécial METROHM.
- Mettre celui-ci en position sur la burette automatique.
- Appuyer sur la touche "GO" du Titroprocesseur.

Le dosage démarre.

Deuxième échantillon :

Pendant le dosage de l'échantillon précédent,

- Refaire la première opération.
- Prélever les 50 ml de l'échantillon au dernier moment.

Une fois le dosage terminé, noter sur la feuille de calcul le volume de thiosulfate versé (seulement dans le cas où le programme de calcul n'aurait pas été introduit).

Calcul des concentrations en oxygène dissous

$$O2 \text{ ml/l} = (EP1 * CO1 * CO2) / CO3 * CV$$

* EP1 : volume en ml, de thiosulfate versé jusqu'au point d'équivalence.

* CO1 : 0.01 N, concentration du thiosulfate.

* CO2 : 5598 ml, volume gazeux occupé par 1/4 de molécule d'oxygène.

Dans le bilan global des réactions, 1 mole de thiosulfate correspond à 1/4 de mole d'oxygène.

* CO3 : 50 ml, volume d'échantillon prélevé.

Correction de volume CV :

$$CV = CO4 / (CO4 - CO5)$$

* CO4 : volume moyen des erlenmeyers soit 117 ml.

* CO5 : volume des réactifs 1 et 2 ajoutés soit 2 ml.

PROGRAMME DE CALCUL SUR LE TITROPROCESSEUR

$$F1 = (EP1 * CO1 * CO2) / CO3 ; 3;$$

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

$$F3 = RS1 * RS2 ; 3; ml$$

$$CO1 = 0.01$$

$$CO2 = 5598$$

$$CO3 = 50$$

$$CO4 = 117$$

$$CO5 = 2$$

IV DOSAGE DE L'ADENOSINE TRIPHOSPHATE

Principe :Le dosage de l'ATP extrait, s'effectue grâce à la réaction lumineuse produite par le mélange luciférine-luciférase en présence d'ATP (O.Holm-Hansen et Booth 1966). L'ATP (adénosine triphosphate), en tant qu'intermédiaire majeur de tous les processus de transfert d'énergie, joue un rôle essentiel dans le métabolisme cellulaire. De plus, subissant une dégradation rapide à la mort de la cellule, sa présence caractérise donc les organismes vivants. Ces deux raisons principales font donc de l'ATP, un composé privilégié lors des estimations de biomasse.

Filtration

Les prélèvements sont tamisés sur une soie de 50 μm (élimination des métazoaires du zooplankton) puis filtrés sur acétate de cellulose Millipore HA (porosité 0,45 μm , diamètre 2,5 cm) sous une dépression comprise entre 125 et 300 mm de mercure (ceci évite l'éclatement des cellules).

REMARQUE : La filtration doit dans tous les cas, s'effectuer le plus rapidement possible après le prélèvement. Ceci évitera de placer les cellules dans des conditions de stress prolongé pouvant amener des variations notables du taux d'ATP intracellulaire.

a) Filtres employés :

Le choix des filtres a été fait après diverses expériences réalisés avec les filtres Whatman GF/F (porosité 0,45 μm , diamètre 2,5 cm) et les filtres Millipore HA. Le meilleur rendement et la meilleure reproductibilité sont obtenus avec ces derniers.

b) Volume de filtration :

Le volume adopté actuellement est de 1 litre ; ce volume, assez important est nécessaire pour compenser la relative pauvreté en organismes vivants du milieu étudié (eaux oligotrophes).

Extraction

Les différentes conditions à respecter pour obtenir une solubilisation satisfaisante de l'ATP sont :

- L'ATPase et les autres enzymes intracellulaires doivent être rapidement inhibés pour éviter une dégradation de l'ATP.
- La technique d'extraction doit provoquer l'éclatement des cellules.
- La composition du milieu solubilisant doit permettre la conservation de l'ATP (pH = 7 à 8) et ne pas perturber le dosage enzymatique ultérieur.
- La technique doit être de manipulation simple, l'extraction étant réalisée aussitôt après le prélèvement (donc à bord d'un bateau ou aux environs immédiats du point de prélèvement).

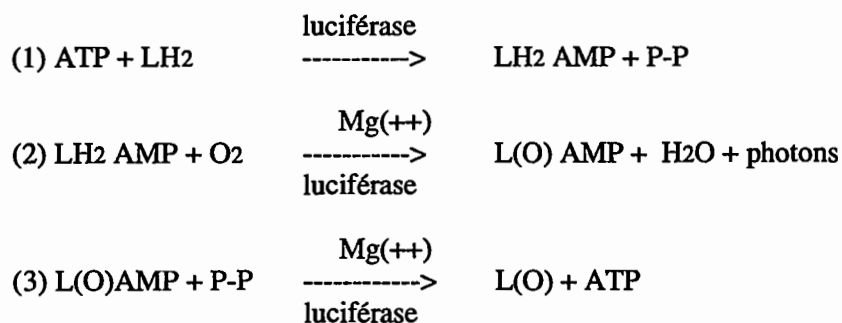
La méthode adoptée le plus souvent, dans le cas de prélèvements d'eau, est la technique d'extraction au Tris bouillant (concentration 0,02 N; pH 7,75).

Conservation des extraits

L'extraction proprement dite est réalisée dans un tube à essai contenant le filtre et 5 à 7 ml de Tris bouillant. L'ensemble est placé dans un bain-marie à 100°C pendant 1 mn. En fin d'extraction, le filtre est récupéré, à l'aide d'un agitateur en verre, transvasé avec le Tris dans un pillulier en pyrex et congelé aussitôt à - 20°C. Les extraits sont dosés dès la fin des campagnes en mer et ne séjournent donc pas plus de 15 à 20 jours au congélateur .

Dosage enzymatique

Réaction de l'ATP, en présence de luciférine-luciférase.



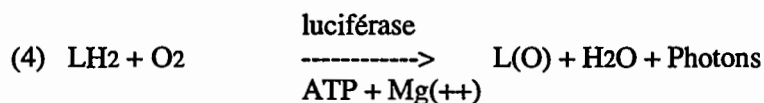
LH₂: Luciférine réduite

L(O) : Luciférine oxydée

LH₂ AMP : Adényl-luciférine

L(O) AMP : Adényl-oxyluciférine

En résumé : (1) + (2) + (3) = (4)



L'ATP se retrouve donc en fin de réaction, ce qui explique la durée de l'émission lumineuse. Bien que l'ATP ne représente pas le substrat oxydé, l'émission de photons est proportionnelle à la quantité d'ATP présente dans l'échantillon ; il est donc possible de doser l'ATP en mesurant l'intensité de l'émission lumineuse à l'aide d'un photomultiplicateur.

La quantité de photons émise est maximale moins d'une seconde après le mélange des réactifs, puis décroît avec le temps. La mesure du pic ainsi produit nécessite donc un système d'injection automatique permettant un mélange des réactifs dans la cuve de mesure simultanément avec le début de l'enregistrement. Dans le cas présent, la mesure s'effectue à l'aide d'un Luminomètre 1250 L.K.B. Wallac capable de détecter, selon le constructeur, jusqu'à 20 picomoles d'ATP dans une prise d'essai.

1°) Préparation de la solution enzymatique :

Le mélange luciférine-luciférase nécessaire au dosage est acheté lyophilisé chez SIGMA (flacon de 50 mg d'extrait de post-abdomens de lucioles *Photinus pyralis*). La conservation s'effectue à une température inférieure à 0°C. La réhydratation de cet extrait à l'aide de 15 ml de Tris (0,02 N; pH 7,75) fournit une solution permettant environ 60 dosages.

Après l'ajout du Tris, attendre 15 à 20 mn en agitant de temps en temps, puis filtrer la solution sur Whatman GF/C (porosité 0,7 µm, diamètre 2,5 cm). La solution obtenue est à conserver à + 4°C. Lors du dosage, il est préférable de la placer dans un récipient contenant de la glace pilée. La solution enzymatique peut servir pendant huit jours sans perte d'activité; il semble cependant préférable de préparer quotidiennement cette solution avant chaque série de dosage.

2°) Préparation d'une solution étalon d'ATP :

Solution d'ATP à 0,04 µg/ml (S)

afin que 50 µl de cette solution correspondent à un poids de 2 ng (nanogramme).

- Ajouter 10 ml TRIS au flacon contenant 10 µg d'ATP Standard.
- Congeler 10 aliquotes de 1 ml de cette solution Mère dans des pilluliers de 50 ml soit 1 µg/ml d'ATP.

Pour obtenir 25 ml d'ATP à 0,04 µg/ml,

- verser 24 ml de Tris 0.02 N pH = 7,75 dans 1 aliquote de 1 ml.

3°) Dosage proprement dit : Méthode de l'étalon interne

- Plonger le tube en silicone de l'injecteur automatique dans la solution enzymatique. L'injecteur a été réglé pour délivrer environ 200 µl de luciférine-luciférase.
- Injecter dans un tube à essai jetable, 200 µl d'échantillon + 50 µl d'ATP à 0.04 µg/ml soit 2 ng.
- Positionner le tube dans la tourelle.
- Tourner pour faire apparaître l'indication "SAMPLE IN".
- Appuyer sur "START".
L'appareil intègre les mesures pendant une période de 10 s.
- Noter la valeur ES en mV.
- Recommencer l'opération en utilisant 200 µl d'échantillon + 50 µl de Tris 0,02 N pH = 7,75
- Noter la valeur E en mV.

Pour le "blanc de réactifs"

- Injecter dans un tube à essai jetable, 250 µl de Tris 0,02 N; pH = 7,75.
- Noter la valeur B en mV.

Calcul

Calcul de C 1, concentration d'ATP en ng/ml dans l'échantillon

$$\frac{(2 + X)}{(ES - B)} = \frac{X}{(E - B)}$$

$$C 1 = \frac{X}{0,250} = 8 * \frac{(E - B)}{(ES - E)}$$

- X : quantité d'ATP en ng, présent dans l'échantillon
 2 : quantité d'étalon interne en ng (nanogramme)
 0,250 : volume total en ml, injecté pour la mesure
 ES : réponse en mV, échantillon + étalon
 E : réponse en mV, échantillon + Tris
 B : réponse en mV, du blanc

Calcul de C 2, concentration dans l'eau de mer en ng/l.

$$C 2 = 8 * \frac{(E - B)}{(ES - E)} * 5 * (1000/V)$$

- 5 : volume de Tris à l'extraction, soit 5 ml
 V : volume eau de mer filtrée en ml

REMARQUE : La principale source de variabilité provient de l'extraction, il est donc souhaitable de faire 2 à 3 extractions par échantillon jusqu'à ce que l'on sache la variabilité du dosage.

Utilisation du luminomètre

- Mettre l'appareil sous tension.
- Attendre 30 mn.
- Tourner la tourelle jusqu'à "STANDARD IN".
- Mettre le bouton "Background sub" sur 0.
- Ajuster le bouton "Gain" pour obtenir 10 mV (environ un gain de 8,44).
- Tourner la tourelle pour faire apparaître "SAMPLE IN".
- Ajuster le bouton "Background sub" pour obtenir 0 mV.
- Tourner la tourelle jusqu'à "STANDARD IN" et régler le gain jusqu'à obtenir 10 mV.
- L'appareil est prêt.

Utilisation de l'intégrateur

- Mettre l'appareil sous tension.
- Sélectionner le temps d'intégration : 10 s(econdes).
- Mettre le bouton sur "ON PRINT".
- Mettre le compteur à zéro.
- Mettre le bouton "CONT PRINT OFF".
- Seule la valeur d'intégration 10 s + 1, est attribuée.
- Appuyer sur "START" : déclenchement de l'injection et intégration pendant 10 s.

Utilisation de l'injecteur

Etalonnage : Pour obtenir le volume de 200 μ l de solution enzymatique, il faut utiliser à la fois le réglage de la mollette située en haut de l'injecteur automatique (graduée de 0 à 10) et le nombre de cycles. Recueillir le volume dans une éprouvette graduée de 10 ml et répéter l'opération au moins dix fois pour avoir une quantité mesurable.

REMERCIEMENT:

Je tiens à remercier Robert LE BORGNE (responsable du programme FLUPAC) et Martine RODIER (responsable du laboratoire de chimie marine) pour l'aide apportée lors de la correction de ce manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE succincte:

A.Aminot, M.Chaussepied (1983) Manuel des analyses chimiques en milieu marin.*CNEXO*.

K.Grasshoff, M.Ehrhardt, K.Kremling (1983) Methods of seawater analysis, second édition.*Verlag chemie*.419pp.

O.Holm-Hansen, C.R.Booth (1966) The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance.*Limnology and Oceanography*.Vol.11,510-519.

JJ.Lechauve, F.Baurand, C.Oudot (1992) ASTECH, analyse du signal Technicon.*Document technique du centre de Brest n°67 - ORSTOM*.35pp.

C.Oudot, Y.Montel (1988) A high sensitivity method for determination of nanomolar concentrations of nitrate and nitrite in seawater with a Technicon Auto-analyser II.*Marine chemistry*,24,239-252.

P.Pascal (1960) Nouveau traité de chimie minérale - Tome X - Azote et Phosphore.*Masson éditeurs*.

P.Pascal (1960) Nouveau traité de chimie minérale - Tome XIV - Chrome, complexes du Chrome, Molybdène, Tungstène, Hétéropolyacides.*Masson éditeurs*.

M.Pujo-Pay, P.Raimbault (1994) Improvement of wet-oxidation procedure for simultaneous determination of particulate organic nitrogen and phosphorus collected on filters.*Marine ecology progress series*.Vol.105,203-207.

J.Strickland, T.Parsons (1972) A practical handbook of seawater analysis. *Fisheries Research Board of Canada Bulletin*.Vol.167,1-310.

