

H2 62110 - 2^e Bdy - non numérisé

F20 / B20
Boull 100/12

Traçages à la Rhodamine B

NOTE TECHNIQUE

1.
Localité : Bafécao
Rivière : Bandama
Pays : Côte d'Ivoire
Date : 31.01.1985

2.
Localité : Titira
Rivière : Kéran
Pays : Togo
Date : 07.10.1985

3.
Localité : Bafécao
Rivière : Bandama
Pays : Côte d'Ivoire
Date : 01.11.1984



A. GIODA L. LE BARBE
G. DELFIEU

Laboratoire d'Hydrologie
Département Eaux
Continental

ORSTOM
B.P. 5045
34032 MONTPELLIER CX

1989
Cette étude a bénéficié
d'un financement de
l'Organisation Mondiale
de la Santé
OMS
Programme de lutte
contre l'Onchocercose



Clichés Le Barbé

F 31760

AVERTISSEMENT

Le document entre vos mains est une note technique destinée à vous aider dans la réalisation de mesures de fluorescence à partir d'épandages ou d'injections faits à la Rhodamine B.

Ce document comporte de nombreuses redites, indispensables dans notre esprit, afin d'insister sur certains points qui nous paraissent importants.

Ce document ne saurait être que provisoire. Faites-nous part de vos remarques et de vos critiques à la lumière de votre expérience. Nous en tiendrons compte dans toute nouvelle rédaction.

REMERCIEMENTS

Notre savoir-faire sur les traçages à la Rhodamine B a été acquis lors d'une étude sur la propagation des insecticides. Cette étude a bénéficié d'un financement de l'Organisation Mondiale de la Santé (Onchocerciasis Control Program).



Ø 52
SIMONC Ø 4
G10

F 31760

INTRODUCTION

Afin de caler un modèle de dispersion d'un insecticide dans une rivière, nous avons été amenés à substituer deux insecticides, l'Abate (Biothion) et le Teknar ou B.t. (*Bacillus thuringiensis*) par un traceur fluorescent.

Notre choix s'est porté sur la Rhodamine B pour une série de raisons.

- L'un des grands avantages de la Rhodamine est son absence de toxicité pour la flore et la faune environnantes. Cet avantage est partagé par l'ensemble des colorants xanthéniques (de *xanthos*, jaune). Parmi ceux-ci, citons : la fluorescéine dite, sous la forme soluble, uranine, la Rhodamine WT et les sulfo-Rhodamines B et G.
- Elle est quasiment insensible aux variations de pH dans la solution tampon qui est un chenal à ciel ouvert. Ces variations sont dues à celles de l'activité biologique et notamment chlorophyllienne qui obéit à des cycles diurnes et nocturnes en faisant abstraction du cycle saisonnier.
- Elle est peu sensible à la photodégradation par la lumière naturelle à l'inverse de la fluorescéine. Quelques précautions seront toutefois conseillées.
- Elle est d'un meilleur rapport qualité/coût que la Rhodamine WT,
- Son usage est bien maîtrisé depuis les années soixante.

1. RAPPEL DE L'INTERET DES TRACEURS FLUORESCENTS

Ce type de colorants a vu son intérêt beaucoup se développer avec l'apparition des problèmes de pollution chimique des eaux.

Les colorants fluorescents sont très utilisés en hydrologie de surface pour les applications suivantes :

- outre les traçages afin de calculer des temps de propagation et les études de dispersion qui étaient notre préoccupation ;
- les jaugeages chimiques où ils ont supplanté les bichromates, produits hautement toxiques à fortes concentrations.

Rappelons l'intérêt des traceurs fluorescents :

- en limnologie, avec les études de circulation et de stratification des eaux ;
- en océanologie, où la présence de sels minéraux (ions salins) impose toutefois quelques précautions au niveau de la mesure ;
- en hydrogéologie, domaine où leur utilisation est plus classique. Dès le début du XXe siècle, la fluorescéine est employée. Aujourd'hui, elle tend à être remplacée par la Rhodamine WT.

2. UNE TECHNIQUE DE TERRAIN

C'est un autre intérêt de l'utilisation des traceurs fluorescents. La préparation de la solution mère, les dilutions nécessaires pour la calibration fluorescence/concentration et la qualité des mesures ne sont pas altérées dans le cadre d'un petit laboratoire de terrain alimenté par un groupe électrogène 4 temps d'1,5 kw.

Ainsi nous parlerons plusieurs fois d'eau distillée, d'eau permutée mais notre expérience nous a montré que l'eau distribuée par les réseaux africains permettait un travail correct. Avoir 30 litres d'eau distillée reste toutefois très recommandé.

De même nous utilisons dans un premier temps que des gants du laboratoire, de qualité médicale. Nous sommes passés ensuite la plupart du temps aux gants de ménage.

Enfin, tous nos échantillons avant la mesure au fluorimètre étaient filtrés afin d'en éliminer les troubles, l'une des causes principales d'erreurs dans les mesures de fluorescence / concentration.

Au total, nous disposions pour le laboratoire de terrain :

- d'un groupe électrogène HONDA 4 temps d'1,5 KW ;
- d'un fluorimètre TURNER Model 111, avec un transformateur 110-220 V ;
- d'une série de filtres pour le fluorimètre ;
- de deux rampes de filtration en verre fritté ;
- d'un petit matériel de verrerie (éprouvettes, pipettes, béchers, agitateurs).

3. PREPARATION DE LA SOLUTION MERE

Elle présente deux difficultés causées par :

- le caractère très salissant de la Rhodamine en poudre,
- la mauvaise dilution de la Rhodamine dans l'eau.

Ces deux écueils peuvent être contournés par l'achat de solutions de Rhodamine prêtes à l'emploi. Toutefois, il faudrait convoier par avion des dizaines ou des centaines de litres de solution mère dont l'essentiel est constitué d'eau !

3.1. Conseils pour la propreté

Ils sont nécessaires du fait du caractère très pulvérulent de la poudre qui, une fois fixée sur la peau, tache celle-ci à la moindre trace de sueur.

Fig. 1 : Sans commentaires.



- ① Travailler toujours à l'extérieur et, si possible, dans un espace type terrain vague. Ceci a l'avantage de soustraire, en partie, les opérateurs aux vapeurs de l'acide utilisé dans la solution et de ne pas contaminer le laboratoire d'analyse.
- ② Utiliser des vêtements couvrants :
 - une blouse blanche à manches longues en coton, facile à laver avec de l'eau javalisée ;
 - un pantalon long ayant les mêmes caractéristiques ;
 - des bottes en caoutchouc noir -une fois fixée sur le plastique et les bottes bien lavées, la Rhodamine ne tache plus de façon sensible- ;
 - des gants de ménage en plastique qui sont à la fois résistants et d'un faible coût. Il faudra en jeter une paire après chaque manipulation ;
 - un chapeau ;
 - un masque éventuellement, sinon, éviter de se toucher le visage.
- ③ Diviser les tâches. L'opérateur manipulant la Rhodamine doit être assisté par un aide préparant les diluants.

3.2. Conseils pour la dilution

Il s'agit d'éviter la formation de grumeaux dans la solution qui pourrait à la fois fausser les concentrations et boucher, lors de l'injection, les pulvérisateurs.

Trois produits sont à manipuler :

- de l'eau -il est souhaitable mais il n'est pas indispensable qu'elle soit permutée-.
- de l'acide acétique 100% (CH_3COOH) cristallisable. Fabricant : MERCK. Il joue le rôle de diluant principal.
- de la Rhodamine B ($\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{ClN}_2\text{O}_3$). Fabricant : MERCK.

Attention : Toujours utiliser, pour la préparation, lors du travail de terrain et lors des manipulations de dépouillements, des récipients et des éprouvettes en verre. La Rhodamine est sujette à adsorption sur tous les plastiques.

- ① Préparer les récipients pour faire la solution-mère. Nous avons utilisé des béciers où la solution présente l'avantage de pouvoir être bien agitée du fait de leur large ouverture.
- ② Dans les béciers, verser les produits en respectant, de façon absolue, l'ordre suivant :
 - l'eau ,
 - l'acide ,
 - la Rhodamine.

La Rhodamine est donc versée en dernier, doucement, tandis que la solution est sans cesse agitée avec un agitateur en verre. Ne pas respecter ces prescriptions entraîne la formation de gros grumeaux qui peuvent boucher le dispositif d'épandage ou d'injection.

Nous devons dans le cadre des expérimentations "Lutte contre l'Onchocercose" satisfaire aux exigences suivantes qui sont contradictoires :

- utiliser relativement peu d'acide afin de ne pas endommager, ou le moins possible, l'ensemble réservoir-dispositif d'épandage embarqué sur l'hélicoptère ;
- utiliser de fortes concentrations de Rhodamine pour la solution mère afin de suivre le traceur sur plusieurs kilomètres.

Les proportions et les quantités retenues sont de cet ordre :

<u>Diluant</u>		<u>Rhodamine</u>
eau	: 70%	200 g/l
acide	: 30%	

Dans la littérature scientifique, des auteurs ont travaillé avec des solutions à 300 g/l. Toutefois, les grandes quantités de Rhodamine à injecter lors de chaque expérimentation -de l'ordre de 15 à 20 kg- nous ont obligés à agiter manuellement la solution mère. Aller au-delà du seuil de 200 g/l nous paraît difficile dans ces conditions.

La solution idéale afin de se salir le moins possible est de vider en une seule fois le contenant de la poudre. La Rhodamine se trouve contenue dans les emballages suivants :

- bouteille en verre (500 g) ;
- sachet plastique (1 kg), lui-même contenu dans une boîte en fer-blanc.

Toujours en respectant la concentration de 200 g/l, dissoudre la Rhodamine, pour le premier cas, dans un bécher contenant 2,5 litres de diluant (acide + eau) et, pour le deuxième cas, dans un bécher de 5 litres.

- ③ Verser ensuite la solution dans son contenant définitif pour son transport sur le terrain. Nous avons choisi des dames-jeannes en verre fumé d'une capacité de 30 litres. L'opacité du verre interdit toute photodégradation.

Afin d'empêcher toute formation de grumeaux, nous prenons les précautions suivantes :

- 1 litre d'acide est versé avant la solution mère ; au fond du récipient se trouve ainsi, au moins au début du transvasement, une forte concentration de diluant actif ;
 - les dames-jeannes remplies, les laisser au soleil pendant plusieurs heures afin d'activer la dissolution.
- ④ Stocker les dames-jeannes à l'abri. Nous avons préparé la solution 6 jours avant son utilisation, sans rencontrer de problèmes de dépôts.
 - ⑤ Laver toute la verrerie avec un produit sulfo-chromique ou du méthanol ou, à défaut, du TEEPOL et rincer à l'eau distillée.

4. MESURES DE FLUORESCENCE

4.1. Principe de la mesure

Quelques notions sur la diffusion de la lumière doivent être rappelées.

Quand une solution est éclairée par un faisceau parallèle de lumière monochromatique, une partie non négligeable du rayonnement incident se trouve dispersée dans toutes les directions de

l'espace. La diffusion classique provient d'interactions de caractère "élastique" qui ne provoquent pas de modification de la longueur d'onde de la lumière diffusée. Il est classique de désigner, par effet RAYLEIGH, l'interaction entre photons et solvant, et par effet TYNDALL, l'interaction entre ces mêmes photons et des particules de grandes dimensions (micelles ou colloïdes).

Il existe aussi dans le rayonnement diffusé, des radiations d'intensité beaucoup plus faibles, appelées émissions RAMAN, qui résultent de "collisions inélastiques" et dont les longueurs d'onde diffèrent de celles de la radiation excitatrice. Les écarts entre les longueurs d'onde de la radiation excitatrice et de l'émission RAMAN dépendent de la nature du solvant et de la longueur d'onde d'excitation.

Au contraire des phénomènes de diffusion qui viennent d'être passés en revue, pour que la fluorescence puisse exister, il faut que l'énergie du photon satisfasse à certaines règles.

Il est possible de décrire d'une façon élémentaire le processus d'absorption : une "collision" d'un photon avec les électrons d'un atome ou d'une molécule entraîne la promotion d'un électron dans une orbitale inoccupée telle que l'énergie qui la sépare de l'état fondamental représente justement l'énergie du photon :

$$E_{\text{accueil}} - E_{\text{départ}} = h\nu = h \frac{c}{\lambda}$$

où les symboles suivants représentent : h la constante de PLANCK (égale à $6,6262 \cdot 10^{-34}$) ; c la vitesse de la lumière ; ν la fréquence de la radiation ; et λ la longueur d'onde de la radiation excitatrice.

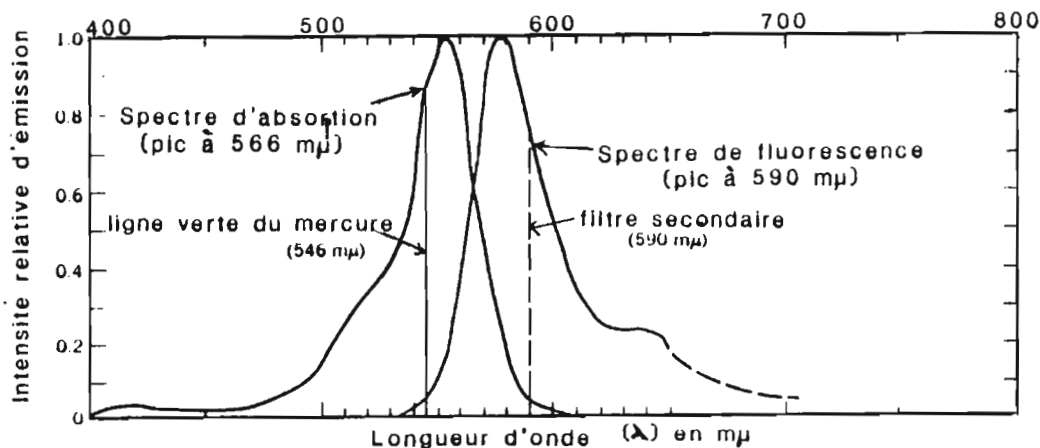
Par ailleurs, l'énergie totale de la molécule rend compte des interactions de l'ensemble des électrons et des noyaux. Supposons que la molécule, dans son état fondamental S_0 , soit dans l'état d'énergie la plus basse (absence d'excès d'énergie de vibration-rotation), lors de l'absorption, la transition à l'état excité S_1 , est si rapide qu'elle ne permet pas le changement des positions relatives des noyaux de la molécule (principe de FRANCK-CONDON). La géométrie la plus stable dans l'état excité ne correspondant pas toujours à celle de l'état fondamental, il y aura en général de ce fait désactivation ultérieure de l'excès d'énergie par collisions, jusqu'au niveau vibrationnel le plus bas, celui de la forme S_1 . Cette non-instantanéité des processus a des conséquences dont il faudra tenir compte.

Spectre d'absorption

Les transitions qui interviennent lors de l'absorption peuplent des états excités électroniques et vibrationnels de la molécule. Or, comme plusieurs états voisins de vibration peuvent être atteints, il n'y aura pas absorption pour une seule longueur d'onde. Toutefois généralement, en solution, il est observé une seule bande large d'absorption.

Spectre de fluorescence ou spectre d'émission (de fluorescence)

La fluorescence correspond à une désexcitation radiative de S_1 . D'après le principe de FRANCK-CONDON, la géométrie de la molécule ne change pas lors de l'émission. Or, l'énergie de la molécule après émission de fluorescence ne peut être que supérieure ou égale à celle de l'état fondamental pour des raisons analogues à celles qui ont été énoncées plus haut. *Ce résultat explique donc que les spectres de fluorescence et d'absorption ne se recouvrent pratiquement pas (Fig.1).*



SPECTRES D'ABSORPTION ET DE FLUORESCENCE DE LA RHODAMINE B

Figure 1 - Spectres d'absorption et de fluorescence de la Rhodamine B

4.2. Influence du milieu sur la mesure de fluorescence.

Les six facteurs suivants peuvent influencer sur les traceurs fluorescents.

- ① Les fortes concentrations peuvent impliquer la polymérisation des molécules des traceurs. Cette réaction n'est pas irréversible. Nous verrons par la suite comment remédier à ce phénomène.
- ② Le pH influe sur les spectres d'absorption et d'émission des Rhodamines B et WT. Toutefois, cet effet est quasi nul sur la Rhodamine B pour les pH supérieurs à 7. Si l'utilisateur veut s'affranchir de toute influence du pH, en milieu très acide, la sulfo-Rhodamine G est à conseiller. A l'inverse, la fluorescéine est à écarter.
- ③ La température est, sur la Rhodamine B, le facteur du milieu pouvant avoir le plus d'influence sur la mesure. Nous reviendrons sur ce point ci-dessous.
- ④ Les troubles, dans les eaux très chargées, imposent le filtrage des échantillons ou quelques précautions. Comme pour la température, nous reviendrons sur ce point.
- ⑤ La présence de sels minéraux impose des précautions mais les traceurs fluorescents peuvent néanmoins être utilisés en milieu marin ou saumâtre ainsi que dans les formations aquifères à forte salinité. En effet, les eaux salines d'origine naturelle ne renferment pratiquement que des ions chlorure, peu inhibiteurs de fluorescence. L'iodure de sodium, également un bon traceur en hydrologie, a un très fort effet d'inhibition mais des techniques existent pour obtenir des mesures quantitatives dans ce milieu.
- ⑥ La photo-dégradation est particulièrement sensible pour la fluorescéine. Elle est provoquée essentiellement par l'oxygène dissous et par les ions ferriques. Il s'agit d'une dégradation irréversible. L'utilisateur ne mesure qu'une concentration résiduelle d'autant plus faible que le traceur a séjourné longtemps à la lumière.

4.3. Description générale du fluorimètre

Il s'agit d'un instrument qui fournit une mesure relative de l'intensité de la lumière émise par un échantillon contenant une substance fluorescente ; l'intensité de la lumière est proportionnelle à la quantité du colorant. Dans ce chapitre, il ne sera abordé que la description et le fonctionnement d'un fluorimètre à filtres. L'appareil utilisé est certainement à la fois le plus simple et le plus répandu sur le marché : le TURNER Model 111.

Il est à signaler qu'il existe une autre famille de fluorimètres dits à prismes.

Un fluorimètre à filtres se compose essentiellement des six composants de la figure 2.

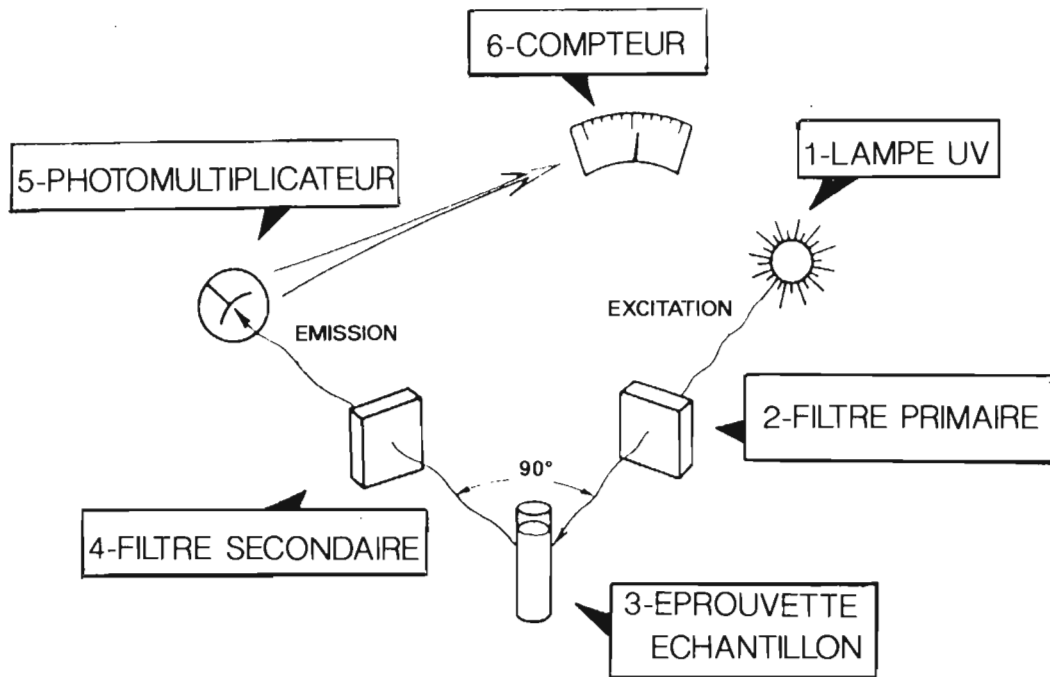
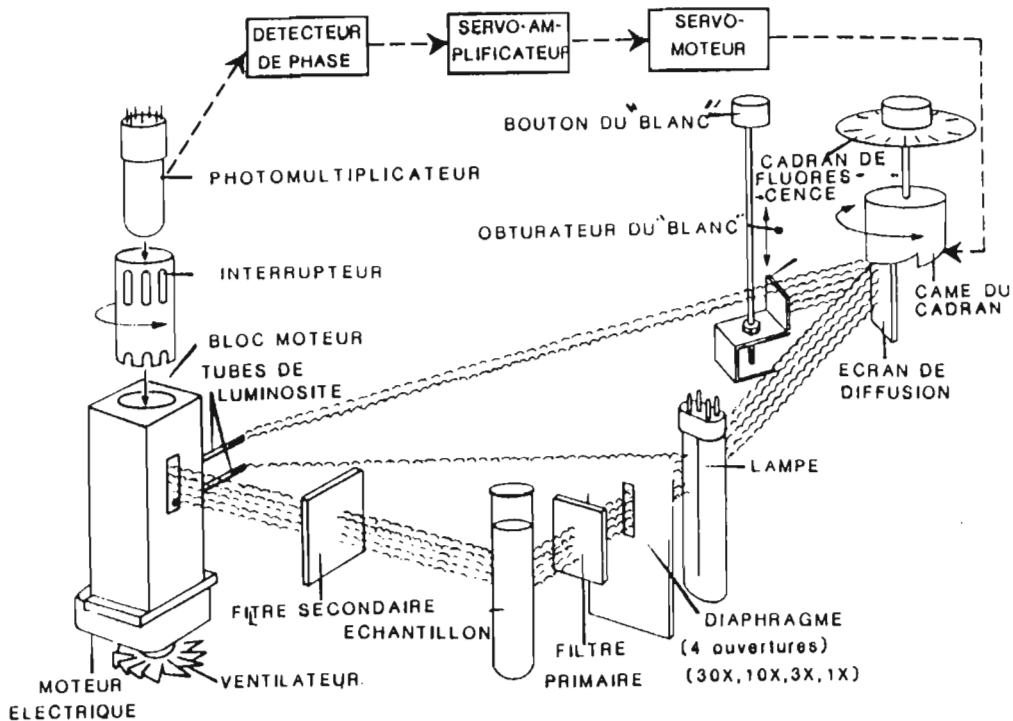


Fig. 2 PRINCIPALES PIÈCES DU TURNER MODEL 111



Nous détaillerons lampes, filtres, éprouvettes, bâton noir, photomultiplicateur, diaphragme, c'est-à-dire les pièces sur lesquelles l'utilisateur peut intervenir de façon routinière (à l'exception du photomultiplicateur).

① Lampes

Trois types de lampes peuvent être utilisées :

- a) la lampe standard à ultra-violets (UV) travaillant dans le proche UV ;
- b) la lampe à UV éloignée (c'est la plus utilisée) ;
- c) la lampe T-5 (peu utilisée).

Nous n'avons utilisé que la lampe (b) sans aucun problème. Il est à noter qu'en cas de "claquage" sa substitution n'est pas très aisée.

Prévoir toujours une lampe de rechange.

② Filtres

Trois types de filtres existent :

- les filtres N-D (*Neutral-Density*),
- les filtres primaires,
- les filtres secondaires.

Les filtres primaires et secondaires sont dits filtres de couleur.

- Les filtres N-D sont utilisés avec les filtres de couleur pour réduire la quantité de lumière transmise quand les lectures au fluorimètre sont hors échelle. De très fortes concentrations de colorants nécessitent l'utilisation de filtres N-D.

Il est à noter qu'une alternative à l'utilisation de ce type de filtres est possible par la dilution des solutions. Toutefois, cette dernière est mal commode sur le terrain et donc source d'erreurs.

Il faut donc disposer de 1 ou de 2 filtres N-D. Un filtre N-D de 1 % qui occulte 99 % de la lumière transmise est indispensable. Un filtre N-D de 10 % est également conseillé en deuxième choix.

Le filtre N-D est mis sur le filtre secondaire à l'intérieur du fluorimètre.

- Les filtres de couleur vont par paire : un filtre primaire et un filtre secondaire.

Le couple de filtres doit répondre aux conditions suivantes :

- pour le filtre primaire : pic de couleur à 546 nm ou m μ ,
- pour le filtre secondaire : pic à 590 nm ou m μ .

La combinaison 546/590 est particulièrement adaptée aux conditions suivantes :

- présence de troubles dans l'eau,
- bonne excitation pour la Rhodamine B, un peu moins bonne pour la Rhodamine WT, mais satisfaisante.

Les caractéristiques des bandes spectrales de la combinaison des filtres 546/590 est illustrée par la figure 3.

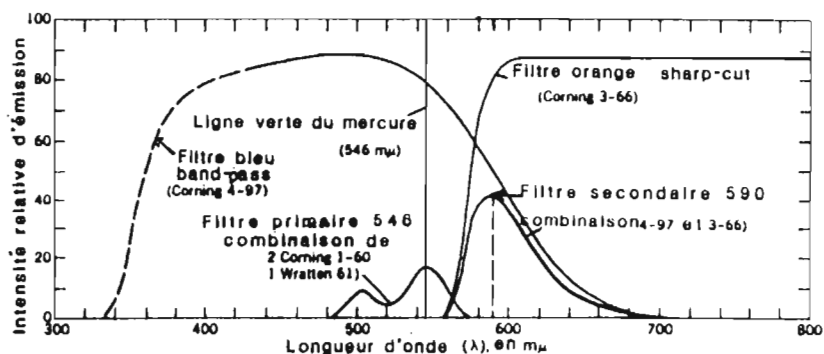


Figure 3 - Caractéristiques spectrales des filtres recommandés (546/590)

Note : La combinaison pour le filtre primaire n'est pas illustrée

Sur cette figure, le filtre secondaire (590 nm) a un spectre qui n'interfère pas du tout avec la ligne verte du mercure bien qu'il y ait une légère superposition des spectres des filtres primaire et secondaire. Le but recherché est d'éliminer toute fluorescence de la part des filtres eux-mêmes.

La superposition des spectres serait gênante avec une lampe T-5 dont l'usage est ici déconseillé.

Le filtre orange (CORNING 3-66) est toujours placé du côté du photomultiplicateur et celui de couleur bleue (4-97) du côté de l'éprouvette. Ces deux filtres sont collés ensemble et constituent le filtre secondaire.

③ Eprouvettes

Toujours en verre, elles doivent être toutes identiques et, pour le vérifier, il faudra les tester avec le fluorimètre.

④ Bâton noir

Il s'agit d'un petit bâton noir en plastique à mettre à l'intérieur d'une éprouvette pour régler le fluorimètre avant toute mesure. Le bâton noir permet de caler le zéro du fluorimètre.

⑤ Photomultiplicateur

Un photomultiplicateur est un tube à vide qui détecte des radiations incidentes et amplifie le signal électronique résultant.

Le photomultiplicateur standard monté sur le TURNER Model 111 est essentiellement sensible dans le spectre du bleu et de l'UV alors que les colorants fluorescents sont particulièrement nets dans l'orange. Des disparités de fabrication font que des photomultiplicateurs standards sont particulièrement sensibles aux longueurs d'ondes du rouge.

En conséquence, nous conseillerons d'utiliser toujours le même fluorimètre pour toute une série d'expérimentations.

⑥ Ouvertures du diaphragme

La commande d'ouverture est manuelle. Elle se fait en faisant coulisser (de droite à gauche ou vice-versa) l'ergot visible sur la droite lorsque la porte du fluorimètre est ouverte. L'utilisateur dispose de quatre positions qui sont inscrites au-dessus de l'ergot : 30X, 10X, 3X et 1X. Elles indiquent approximativement le degré de sensibilité. Par exemple, l'ouverture 30X donne une lecture environ trois fois plus grande que celle du 10X pour le même échantillon.

⑦ Options possibles

Les options sont les suivantes :

- cellule thermostatée ;
- kit de haute définition comprenant un prisme ;
- kit avec alimentation d'échantillons en continu ;
- enregistreur de lecture ;
- etc.

4.4. Opérations préliminaires

① Mettre en place les filtres, ici, le couple 546/590.

- le vert (filtre primaire) sur la droite par rapport à l'emplacement de l'éprouvette,
- l'orange et bleu (filtre secondaire) sur la gauche. Le côté bleu doit être tourné vers l'extérieur, du côté de l'éprouvette.

Les filtres de forme carrée, lorsqu'ils sont mis en place, doivent présenter leurs numéros d'identification inscrits en bas et à droite.

Attention ! Le filtre secondaire est fragile. Il se raye facilement. De plus, des modifications de couleurs et des traces de doigts apparaissent. Prévoir un filtre de rechange.

② Contrôler l'emplacement du fluorimètre.

L'appareil doit être protégé des rayons directs et fortement réfléchis du soleil. Il doit être éloigné de toute source pouvant modifier de façon brutale la température.

Placer l'appareil sur une base solide en s'assurant que la ventilation interne sera suffisante.

③ Si l'on dispose d'un fluorimètre thermostaté, brancher l'adaptateur. Nous ne bénéficions pas de cette option très utile.

④ Brancher le fluorimètre sur le réseau ou le groupe électrogène.

Tous les boutons du tableau de commande doivent être en position OFF c'est-à-dire basculés vers le bas.

Il est à noter que la prise du fluorimètre nécessite un adaptateur. Elle est en effet aux normes américaines. De même, l'appareil utilisé fonctionnait sur 110 V, donc prévoir un transformateur 220-110 V.

⑤ Basculer le bouton "power". La lumière de contrôle proche du compteur doit s'allumer. Il est à signaler que cela ne veut pas dire que la lampe à UV fonctionne.

- ⑥ Basculer et maintenir en position haute le bouton "start" pendant 10 secondes puis relâcher. Vérifier que la lame est allumée en l'observant au travers du filtre primaire. Ne pas regarder directement la lampe à UV. (Danger pour les yeux !) S'il y a une interruption même temporaire de l'alimentation, il faut s'astreindre à faire redémarrer la lampe.
- ⑦ Important : Laisser chauffer le fluorimètre pendant au moins 1 heure. 2 heures sont même souhaitables. L'objectif est de stabiliser la température lors des opérations de lecture.
- ⑧ Mettre à zéro le cadran de fluorescence en insérant le bâton noir dans une éprouvette vide et en ajustant le bouton du "blanc" (blank).. Le blocage ou le déblocage du bouton du "blanc" peut être un peu difficile. Ne pas s'énerver. La mise à zéro ne doit pas être forcément très poussée. Il faut toutefois que l'aiguille soit supérieure à la graduation zéro. Elle ne doit pas être réajustée lors d'ultérieurs contrôles sauf si elle est complètement dérégulée.

Une nouvelle calibration est alors nécessaire. Toutefois, de petites modifications sont admissibles.

4.5. Calibration du fluorimètre.

Afin de convertir les lectures du compteur du fluorimètre en terme de concentration du traceur, il faut calibrer l'appareil utilisé en préparant des solutions de concentrations connues. Les concentrations présentées dans le tableau n°1 sont particulièrement adaptées :

- à l'ensemble des 4 ouvertures du diaphragme du Turner model 111 ;
- à la lampe UV éloigné ;
- aux filtres 546/590 nm.

Si un produit en poudre est utilisé, lors de la préparation de la solution, le colorant doit être pesé afin d'en connaître le poids spécifique.

Il est à noter que lors des expérimentations menées au Togo et en Côte d'Ivoire pour les traçages, la pesée a été négligée car seules des mesures relatives étaient requises.

Attention ! Faire la lecture du "blanc", de Procédure de test, Courbes de calibration et Détermination des concentrations sans s'arrêter la première fois pour assimiler l'ensemble des instructions.

① Lecture du "blanc"

Attention ! La lecture du "blanc" est différente de celle de l'éprouvette vide avec le bâton noir.

L'éprouvette du "blanc" contient soit :

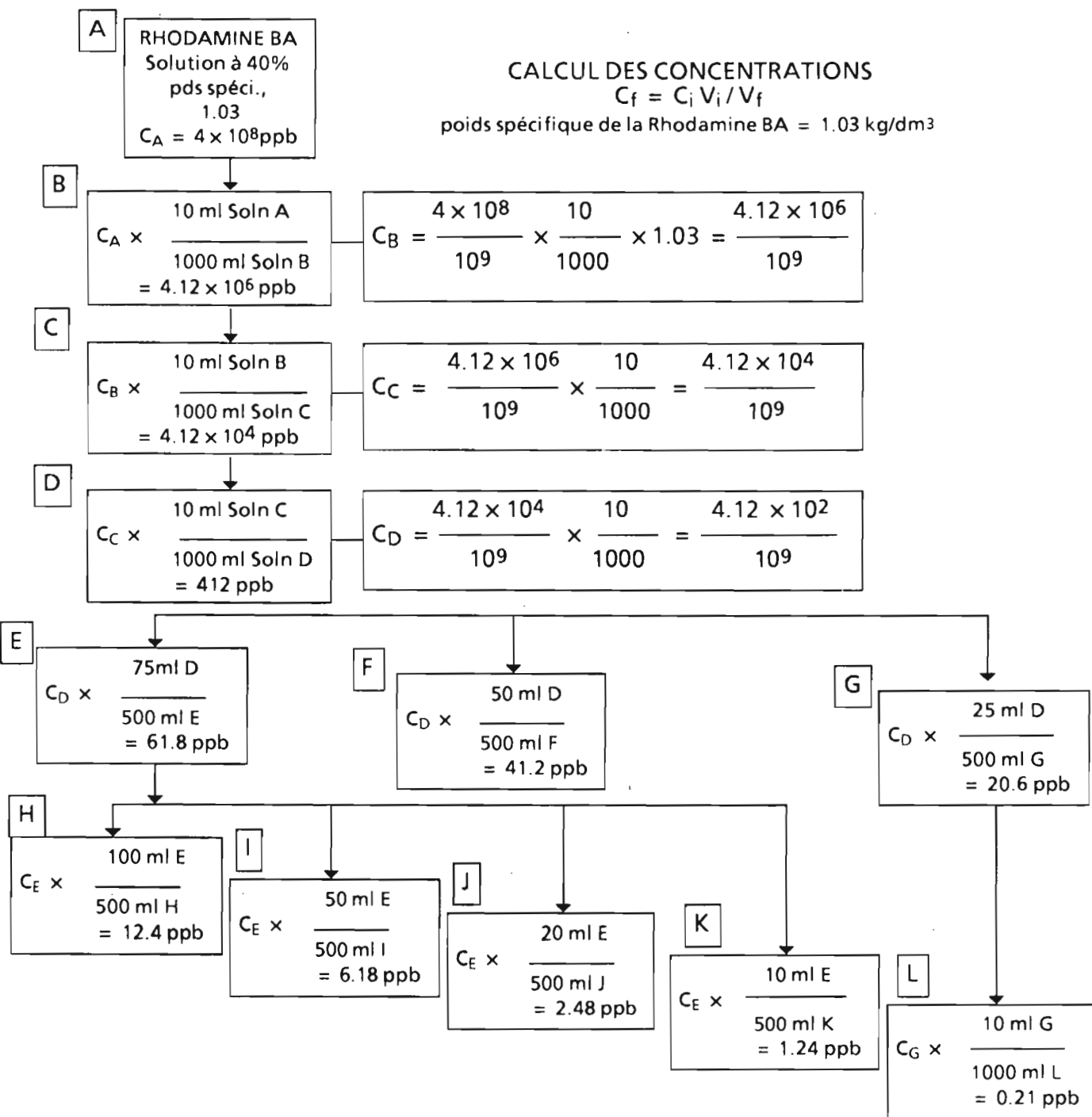
- de l'eau de la rivière testée avant toute injection de colorant (c'est la solution qui a été suivie sur le terrain).
- de l'eau distillée nécessaire pour les tests de calibration.

Bien qu'il ne contienne pas de colorant *a priori*, l'échantillon "blanc" peut produire une faible fluorescence. Noter la valeur lue sur le cadran. Mesurer toujours la température après toute mesure de fluorescence. Il s'agit de celle de l'eau contenue dans l'éprouvette. La noter.

CALCUL DES CONCENTRATIONS

$$C_f = C_i V_i / V_f$$

poids spécifique de la Rhodamine BA = 1.03 kg/dm³



PROTOCOLE STANDARD POUR LES DILUTIONS TEMOINS (en ppb ou en µg/l).

Des dilutions supplémentaires peuvent être nécessaires dans la gamme 100 - 500 ppb pour calibrer l'appareil équipé avec un filtre ND.

② Procédure de test

Laisser les solutions témoins reposer pour s'ajuster à la température ambiante. Tester toutes les solutions témoins pour toutes ouvertures du diaphragme 30X, 10X, 3X, 1X en utilisant toujours la même éprouvette.

N'oubliez pas de mesurer également la solution mère dont quelques centilitres seront prélevés avant l'épandage dans la rivière.

Si les solutions-témoins sont stockées dans un endroit frais et sombre, elles peuvent resservir pour tester le fluorimètre pendant des mois. Toutefois, cette solution est un pis-aller.

③ Courbes de calibration

La fluorescence varie de façon linéaire avec la concentration jusqu'à de fortes valeurs : plusieurs centaines de ppb ou encore $\mu\text{g/l}$ ou plus exactement $\mu\text{g/kg}$ (Fig. 4).

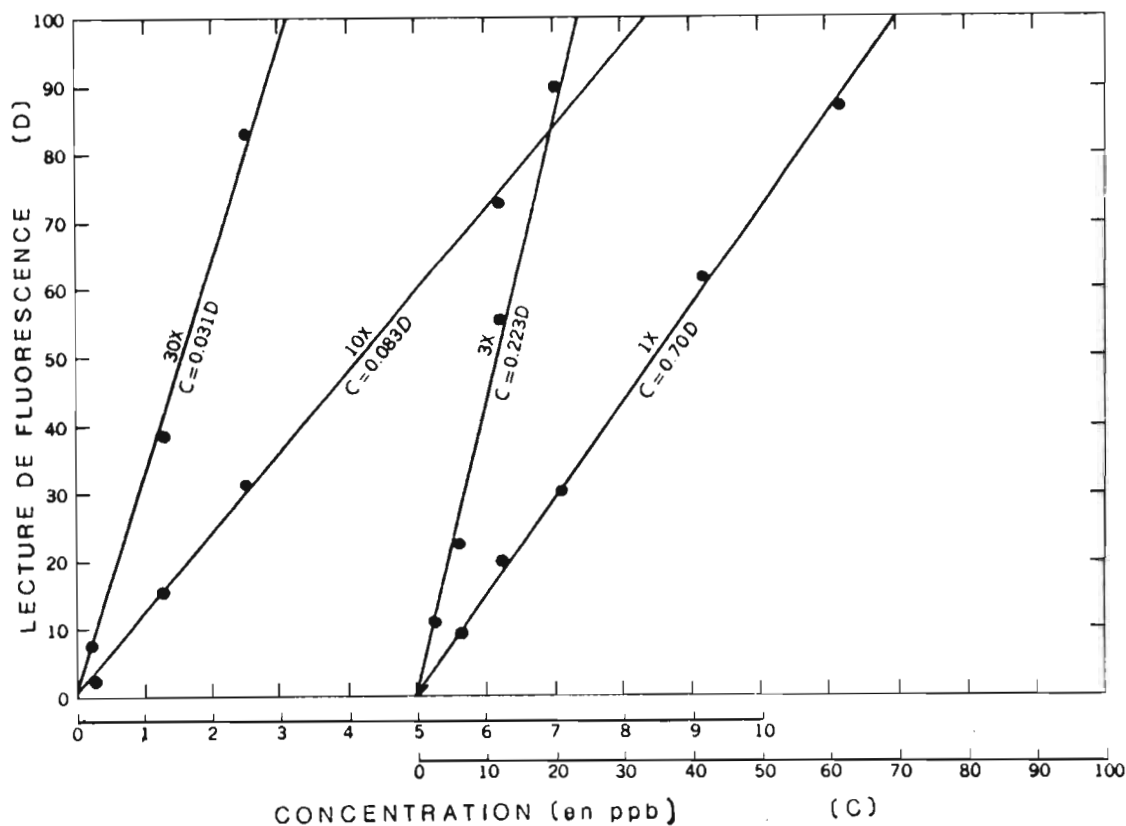
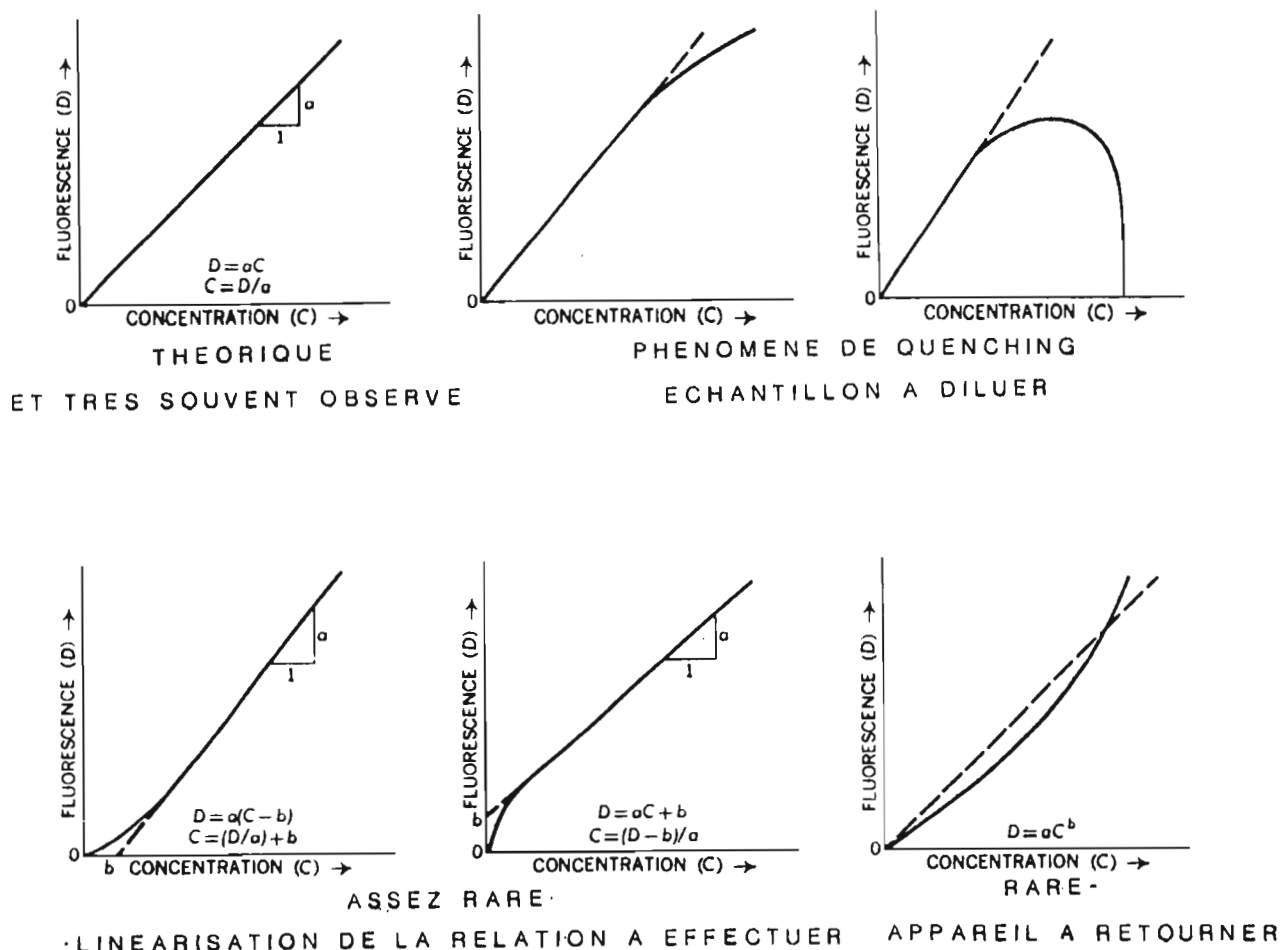


Figure 4 - Courbes-types de calibration pour les quatre ouvertures du diaphragme

Trois problèmes peuvent se poser. Ils sont illustrés par les figures 5.



Figures 5 - Présentation de tous les cas de figures pouvant être rencontrés lors de la calibration.

- A de très fortes concentrations, la linéarité de la relation fluorescence/concentration peut être affectée par un phénomène de *quenching* (extinction par polymérisation). Si ce phénomène se produit, faire chuter les concentrations des solutions-témoins en les diluant avec des quantités connues d'eau distillée.
- A de très faibles concentrations (quelques ppb ou $\mu\text{g/l}$), la relation peut ne pas être linéaire ; au spectre d'émission de la fluorescence se superposent les spectres de diffusion RAMAN et RAYLEIGH. Il faut alors linéariser la fonction en s'appuyant sur le tronçon rectiligne.
- S'il est impossible de linéariser la fonction fluorescence/concentration, l'appareil doit être retourné au constructeur. Signalons que si une panne électrique survient, un électricien ou un électronicien compétent peut intervenir grâce au schéma très complet de la notice du fluorimètre.

4.6. Mesures des échantillons.

- ① Rincer une fois l'éprouvette avec la solution qui sera mesurée.

Remplir l'éprouvette avec cette solution jusqu'à 0,5 cm du bord supérieur. Essuyer l'extérieur de l'éprouvette avec un tissu ou un papier de type KLEENEX. Si des bulles d'air sont présentes dans la solution, tapoter l'éprouvette.

Saisir l'éprouvette, pour la mettre en place dans le fluorimètre, dans sa partie la plus haute, au-dessus du niveau de la solution.

L'U.S. Geological Survey conseille d'utiliser toujours la même éprouvette pour tous les échantillons. En effet des irrégularités dans l'homogénéité de la fabrication peuvent créer des disparités au niveau de la mesure de fluorescence. Nous avons préféré tester toutes les éprouvettes utilisées (une vingtaine) pour vérifier l'homogénéité de la série. Une d'entre elles a été écartée.

- ② Insérer l'éprouvette dans son logement et fermer la porte du fluorimètre.

Ne pas le faire trop brutalement afin d'éviter des éclaboussures.

- ③ Regarder le compteur de fluorescence une fois celui-ci stabilisé. De légères oscillations sont normales ($\pm \frac{1}{4}$ d'une graduation).

Pour une plus grande sensibilité, faire la lecture de l'échantillon sur la plus large échelle possible (en ouvrant le diaphragme). Noter la valeur lue pour 30X, 10X, 3X et 1X.

Deux précautions sont à prendre :

Après quelques minutes du fait de la chaleur à laquelle est exposée l'éprouvette, la fluorescence décroît. Il convient de noter la valeur lue, rapidement. Pour les premières mesures afin de s'assurer de bonnes lectures ultérieures, attendre la décroissance de la fluorescence et la chiffrer en temps. Faire les mesures ensuite dans le laps de temps où le compteur est stabilisé.

De même, lors du transvasement bouteille de prélèvement-éprouvette, des matières en suspension assez grossières peuvent fausser la mesure. Faire le transvasement quelques dizaines de minutes avant la lecture si les eaux sont chargées. Nous n'avons pas rencontré ce problème.

- ④ Enregistrer la température de temps à autre. Il s'agit de celle de la solution dans l'éprouvette, juste après la lecture dans le fluorimètre. La correction de la lecture sera faite ultérieurement.
- ⑤ Plusieurs fois entre les lectures des échantillons, faire également des lectures du "blanc" et de l'éprouvette vide avec le bâton noir. Conclure toujours la fin des expérimentations par ces deux mesures de contrôle.
- ⑥ Pour déconnecter le fluorimètre, se contenter de basculer le bouton "power". Il ne faut pas couper l'alimentation sur le réseau ou sur le groupe électrogène avant cette opération.
- ⑦ Nettoyer et rincer les éprouvettes avant leur stockage.

Pour le nettoyage, nous conseillons soit :

- du méthanol,
- un produit sulfo-chromique,
- à défaut, du TEEPOL.

Pour le rinçage :

- de l'eau distillée.

4.7. Détermination des concentrations

Elle se fait en trois étapes après la lecture du cadran du fluorimètre :

- ① Soustraire éventuellement à la lecture du cadran, la valeur de l'échantillon "blanc" ;
- ② Faire la correction des lectures en fonction des températures en utilisant la figure 6 ;

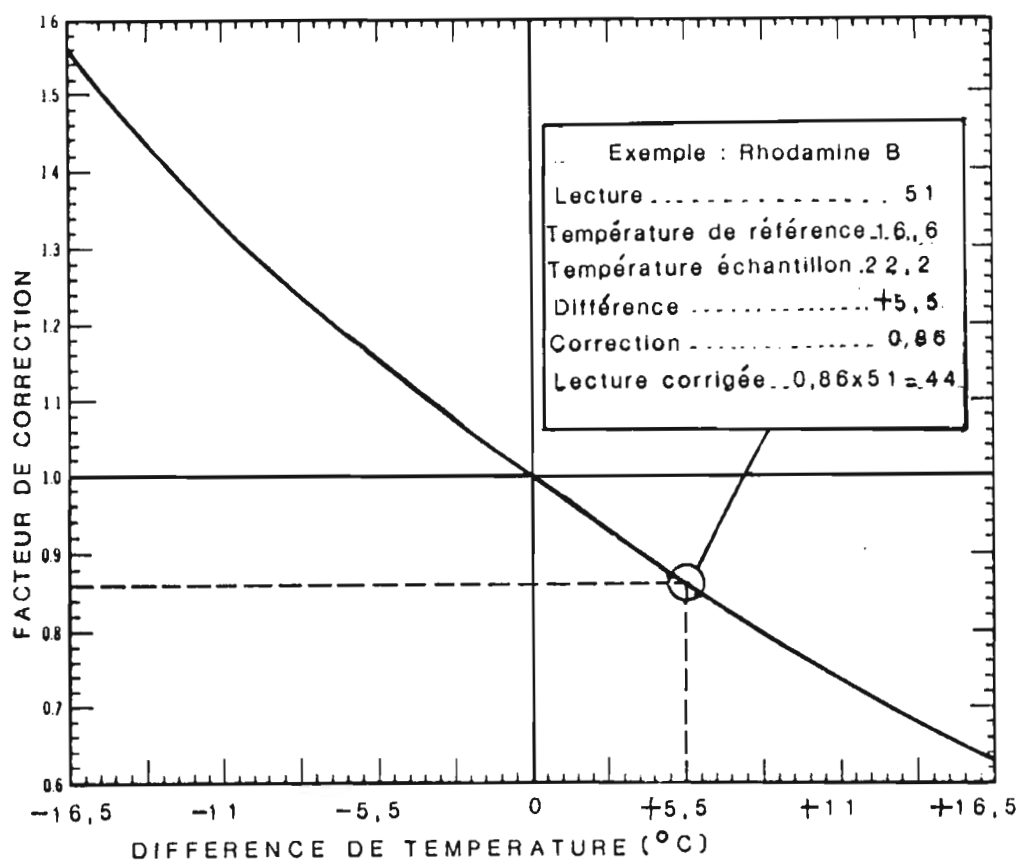


Figure 6- Courbe de correction des lectures du fluorimètre en fonction de la température (Rhodamine B ou WT);

- ③ Convertir les lectures corrigées en valeur de concentration en appliquant l'une des droites de calibration (cf. Fig.4).

Un exemple de dépouillement est présenté dans le tableau suivant.

ORSTOM - Service Hydrologie - UR B2 - Côte-d'Ivoire

Rivière BANDAMA - Localité BAFECAO

Section 2. Point de prélèvements : Centre de la rivière, 100 m de la rive gauche

Température de référence : 22°2

Echantillon n°	Date (1984)	Heure et minute	Lecture directe				Temp. échantillon (°C)	Facteur de correction	Lecture corrigée				Conc. moyenne (ppb)
			30X	10X	3X	1X			30X	10X	3X	1X	
1	1/11	0800	0				22°2	1.00	0	0	0	0	0
2		0915	5.5	2.0	1.0	0	22°5	1.00	0	0	0	0	0
3		0930	6.0	2.5	1.0	0		1.00	9.0				0.28
4		0945	15.0				21°9	1.00	62.0	22.5			
5		1000	68.0	25.0				1.00	(1.92)	(1.87)			1.90
6		1015	OFF	45.0				1.00	OFF	42.5			3.52
7		1030	OFF	96.5	35.0			1.00	OFF	94.0	34.0		
8		1045	OFF	OFF	52.0		22°2	1.00	OFF	OFF	(7.80)	(7.92)	
9		1100	OFF	OFF	89.0	30.0		1.01	OFF	OFF	51.0		
			OFF	OFF	OFF	41.0	23°3	1.03	OFF	OFF	89.0	30.0	20.8
											(20.7)	(21.0)	29.7

Appareil utilisé : TURNER Model 111 - Filtres : 546, 590 - Colorant : Rhodamine B à 200 g/l

Appareil calibré : 1/11/84 - Dépouillement : 1/11/84 - Opérateur : L. LE BARBE

BIBLIOGRAPHIE TRES SOMMAIRE

ANDRE (J.C.), MOLINARI (J.) (1976)

"Mises au point sur les différents facteurs physico-chimiques influant sur la mesure de concentration de traceurs fluorescents et leurs conséquences pratiques en hydrologie". Journal of Hydrology, 30, 3, July, 257-285.

LE BARBE (L.), GIODA (A.), DELFIEU (G.), WOME (K.) (1987)

"Etudes hydrologiques menées dans le cadre du programme de lutte contre l'onchocercose. Etude expérimentale de la propagation des insecticides dans les rivières. Rapport final". OMS/OCP-ORSTOM, Montpellier, 59 p. + annexes.

WILSON (J.F.) (1968)

"Fluorometric procedures for dye tracing", in Techniques of water-resources investigations of the U.S. Geological Survey. Applications of hydraulics, Book 3, Chapter A 12, U.S. Government Printing Office, Washington, 31 p.

**Epandage d'insecticide
effectué de la même
manière que celui de la
Rhodamine B**



Localité : Bafécao
Rivière : Bandama
Pays : Côte d'Ivoire
Date : 1er novembre 1984

**Sections de prélèvements des
échantillons pour les mesures
de fluorescence.**

La flèche indique le sens de l'écoulement.

