

Le 08 février 2010

Etat actuel des méthodes employées pour le dosage du phosphore par les laboratoires prestataires des réseaux DCE en France, et exigences de limite de quantification.

-Note technique-

**A. Morin (AQUAREF), C. Chauvin, P. Le Pimpec, M. Coquery (Cemagref),
MP Strub (INERIS), N. Bougon (ONEMA).**

1. Contexte

La série d'analyses d'eau prévue sur chaque site des réseaux nationaux suivis au titre de la mise en œuvre de la Directive Européenne sur l'Eau (DCE) comprend le dosage de plusieurs formes du phosphore. Cet élément est utilisé principalement en tant que paramètre chimique « supportant la biologie », c'est-à-dire qu'il intervient comme « stresser » dans les relations pression/impact conditionnant la réponse des éléments biologiques.

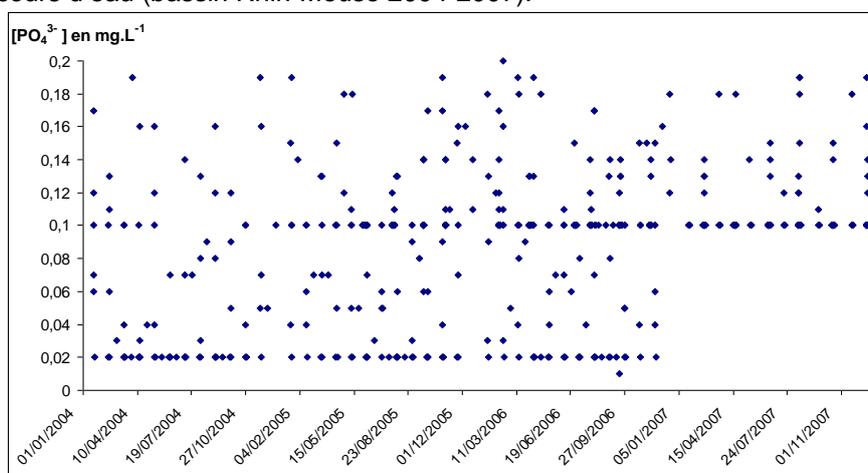
A ce titre, les méthodes de dosage et les limites de quantification (LQ) atteintes par les laboratoires doivent permettre d'obtenir une information adaptée à cette exploitation. Or, il est apparu que les données disponibles actuellement (mesures 2005-2008, voire antérieures), ne répondent pas toujours à ces besoins, et sont même parfois bloquantes envers certaines prescriptions que les Etats-membres doivent respecter. Par exemple, les LQ du phosphore se révèlent être parfois supérieures aux limites de qualification des sites de référence fournis à la Commission Européenne dans le cadre des exercices d'intercalibration, ce qui entraîne le rejet de ces données nationales. Ces seuils sont rappelés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Seuil de validation des sites de référence, pour les 4 principaux critères physico-chimiques utilisés (selon la typologie des cours d'eau définie pour l'intercalibration). La valeur des seuils a été définie par le groupe de travail européen RefCond, comme valeur en dessous de laquelle on peut considérer que l'état écologique du milieu est « pas ou peu perturbé par les activités anthropiques » pour ces paramètres, et donc sans impact notable sur les indicateurs biologiques

	DBO5 (mg/L)	NH ₄ ⁺ (mg/L)	PO ₄ ³⁻ (mg/L)	% Saturation en O ₂ dissous
Moyenne (C1, C4, C5, C6)	2.4	0.12	0.12	95-105
Percentile90 (C1, C4, C5, C6)	3.6	0.32		85-115
Moyenne C2	2.4	0.06	0.09	95-105
Percentile90 C2	3.6	0.16		90-110
Moyenne C3	2	0.06	0.06	95-105
Percentile90 C3	2.75	0.16		90-110
Moyenne (alpin)	2	0.06	0.06	95-105
Percentile90 (alpin)	2.75	0.16		90-110
Moyenne (Méditerranée)	2.4	0.12	0.12	90-110
Percentile90 (Méditerranée)	3.6	0.32		85-115

De même, en ce qui concerne la classification des sites à l'échelle nationale, des limites de quantification supérieures aux valeurs seuils pour le classement en très bon état biaisent la classification de sites en *très bon état* dans certains bassins, et handicapent sérieusement la crédibilité des données rapportées à l'Europe par la France. Par exemple, dans les résultats illustrés par la figure 1, il apparaît clairement que données sont impactés par la LQ élevée à 0,10 mg/L (par rapport à celle à 0,02 mg/L). Des LQ différentes à l'intérieur de ce jeu de données s'expliquent par l'intervention de différents prestataires : plusieurs lots de marché ou changement de laboratoire prestataire au renouvellement du marché, ou fin d'un marché pour un réseau particulier (visible ici à partir de 2007). Les seuils de validation des sites de référence pour les types présents en Rhin-Meuse sont de 0,06 mg/L (pour les types R-C3) et de 0,12 mg/L (pour les types R-C1 et RC6).; la limite de classification Bon état/Très bon état est de 0,10 mg/L.

Figure 1 : Exemple de données issues des mesures de PO₄ (ortho-phosphate) sur le réseau de sites de référence cours d'eau (bassin Rhin-Meuse 2004-2007).



De plus, le besoin méthodologique de mise au point des indicateurs biologiques, tels qu'ils sont requis par les prescriptions de la DCE, ne peuvent pas toujours s'appuyer sur ces résultats, puisque la gamme de valeurs mesurées n'est pas adaptée. En effet, pour les gammes de perturbation faible, le seuil de réponse des éléments biologiques se trouve être largement inférieur aux valeurs minimales disponibles, correspondant aux LQ¹².

Si l'on considère à la fois les impératifs liés à la qualification des sites de référence, ceux inhérents à la classification de l'état écologique et ceux apportés par les connaissances sur les seuils de réponse des éléments biologiques dans les systèmes les moins perturbés (ou pour les types nationaux les plus oligotrophes), on peut avancer que des valeurs de LQ de **0,010 mg/l de PO₄** et de **0,005 mg/L de P_T** seraient susceptible de répondre à l'ensemble des besoins actuels pour les applications de « soutien à la biologie » requises par la DCE.

L'arrêté de Novembre 2006 préconise pour l'ortho-phosphate (code SANDRE 1433) en eaux douces, une limite de quantification maximale de **0,10 mg/L**, exprimé en PO₄ et pour le phosphore total (code SANDRE 1350) en eaux douces, une limite de quantification maximale de **0,05 mg/L**. Actuellement, les performances analytiques effectives sont

¹ OCDE, 1982. Eutrophisation des eaux. Méthodes de surveillance, d'évaluation et de lutte. Rapport de l'Organisation de Coopération et de Développement Economique.

² Système d'évaluation de la qualité de l'eau des cours d'eau – Rapport complémentaire SEQ-Eau V2. Rapport MEDD et Agences de l'Eau, avril 2003.

conditionnées d'une part par les valeurs requises par l'arrêté fixant les conditions d'agrément, d'autre part par les méthodes analytiques employées.

Il est donc nécessaire d'établir un bilan du type de données disponibles, des méthodes employées par les laboratoires prestataires, et des LQ annoncées. Ce bilan, objet de la présente note, a pour objectif de définir la faisabilité et les conséquences éventuelles à anticiper d'un abaissement des LQ requises. Cette modification des prescriptions s'inscrit dans la révision de l'arrêté portant sur les modalités de l'agrément des laboratoires, initiée par le MEEDM et l'ONEMA fin 2009.

2. Laboratoires agréés pour l'analyse du Phosphore total et Ortho-phosphate

Les données présentées ci-dessous sont issues de la base de données des laboratoires agréés du site déclaratif des laboratoires agréés par le MEEDM LABEAU à la date du 22 janvier 2009.

Tableau 2 : Méthodes employées par les laboratoires agréés pour les eaux douces, LQ minimale (« meilleure LQ ») annoncées pour le dosage du phosphore (PT et PO₄) et nombre de laboratoires déclarant la LQ minimale pour la méthode annoncée dans le site Labeau.

a/ Phosphore total (P_T)

Code Sandre Méthode	Nombre de laboratoires	Meilleure LQ de la méthode (mg/L)	Nombre de laboratoires à la meilleure LQ de la méthode *	Commentaire
0	17	0,01	1	Méthode non spécifiée
57	2	0,01	1	NF T90-023// norme annulée
306	38	0,005	2	ICP-OES
422	1	0,05	1	ICP-MS
447	9	0,05	8	Flux continu CFA
448	1	0,03	1	Flux FIA
470 et 314	56	0,005	1	Spectrophotométrie (molybdate d'ammonium)
Total	124	0,005	3	

* Les laboratoires déclarant une valeur de LQ à 0 n'ont pas été pris en compte (principalement dans le code méthode 0).

b/ Ortho-phosphates (PO₄)

Code Sandre Méthode	Nombre de laboratoires	Meilleure LQ (mg/L)	Nombre de laboratoires à la meilleure LQ de la méthode	Commentaire
0	21	0,01	1	Méthode non spécifiée
55	1	0,1	1	NF T90-023// norme annulée
266	23	0,03	1	Chromatographie ionique
447	19	0,015	1	Flux continu CFA
448	2	0,05	1	Flux FIA
470 et 314	65	0,01	3	Spectrophotométrie (molybdate d'ammonium)
Total	131	0,01	4	

Une majorité des laboratoires (plus de 45%) utilisent la méthode la plus ancienne et la moins automatisable. Cette méthode est la seule affichant des performances conformes aux nouvelles exigences souhaitables pour les orthophosphates, et une des deux seules pour le phosphore totale.

Deux autres méthodes se trouvent chez 30 à 38% des laboratoires (selon dosage P ou PO₄).

Notons que plus de 14% des laboratoires déclarent une méthode non spécifiée dans le référentiel SANDRE.

3. Description des méthodes utilisées

1- NF EN ISO 15681:2003 - Dosage des ortho-phosphates et du phosphore total par analyse en flux (FIA et CFA) : Dosage des ortho-phosphates dans le domaine de concentrations en masse allant de 0,10 mg/l à 1,00 mg/l (P)

Flux continu (Code sandre 447) pour phosphore total : 9 labos
LQ P_{total} inférieure ou égale à 0.05 mg/l pour 8 labos sur 9 laboratoires agréés utilisant cette méthode
Aucun laboratoire ne déclare une LQ < 0,005 mg/l

Dosage automatisé du phosphore total dans le domaine de concentrations en masse allant de 0,10 mg/l à 10,0 mg/l (P).

La méthode comprend la digestion des composés organiques du phosphore et l'hydrolyse des composés de polyphosphate inorganique, qui est réalisée soit manuellement comme décrit dans l'ISO 6878 [5], [6], soit avec un dispositif de digestion UV intégrée et une unité d'hydrolyse. La mesure est ensuite effectuée par spectrophotométrie automatisée.

Cette méthode est applicable à différents types d'eau (tels que eau souterraine, eau potable, eau de surface, lixiviats et eaux usées). Si l'article 1 de la norme précise qu'« il est possible de modifier le domaine d'application en faisant varier les conditions opératoires », ceci, s'applique principalement à la borne supérieure du domaine d'application : une dilution des eaux très chargées (> 10 mg/L P) permet de les doser selon cette méthode.

La présente méthode est également applicable à l'analyse de l'eau de mer moyennant une modification de la sensibilité et une adaptation des solutions vecteurs et des solutions d'étalonnage à la salinité des échantillons.

2- NF EN ISO 6878 :2005 Dosage du phosphore — Méthode spectrométrique au molybdate d'ammonium// colorimétrie

Méthode spectrophotométrique (Code sandre 470) pour Phosphore total : 53 labos
LQ P_{total} inférieure ou égale à 0.05 mg/l pour 46 labos sur 53 laboratoires agréés utilisant cette méthode
1 laboratoire déclare une LQ de 0,005 mg/l

La norme internationale spécifie des méthodes de dosage :

- des orthophosphates (Article 4);
- des orthophosphates après extraction au solvant (Article 5);

- des phosphates hydrolysables et des orthophosphates (Article 6);
- du phosphore total après décomposition (Articles 7 et 8).

Ces méthodes sont applicables à tous les types d'eau, y compris l'eau de mer et les effluents. Des concentrations en phosphore comprises entre 0,005 mg/l et 0,8 mg/l peuvent être déterminées sans dilution pour ces échantillons.

C'est une méthode manuelle dont l'automatisation reste limitée, car la limite de quantification est abaissée en raison de l'emploi de cuves spectrophotométriques à long trajet optique, qui contiennent une prise d'essais pouvant aller jusqu'à 5 mL. Des automates existent néanmoins, par exemple GANIMEDE® (Lange) pour le laboratoire, ou OP 210® (TresCon) pour la mesure en ligne, mais la limite basse de leur domaine d'application est supérieure aux besoins de l'hydrobiologie .

En comparaison, les automates « CFA » ou « FIA », objet de la norme NF EN ISO 15681:2003, travaillent avec des cellules de mesure de trajet optique plus restreint, et leurs principes ne permettent pas d'envisager un trajet optique plus long qui améliorerait les limites de quantification.

La norme propose un mode opératoire d'extraction au solvant (§5) qui permet de déterminer des concentrations en phosphore plus faibles, avec une limite de détection d'environ 0,0005 mg/l, en l'absence d'interférences. Cette méthode n'est pas automatisable et le nombre d'analyses possible par jour est donc réduit.

La mise en œuvre de protocoles plus exigeants afin d'atteindre des gammes de mesures basses dans des conditions de fiabilité suffisante conduit à une augmentation du prix unitaire de chaque mesure.

3- ISO 11885:2007 Dosage d'éléments choisis par spectroscopie d'émission optique avec plasma induit par haute fréquence (ICP-OES)

ICP-OES (Code sandre 306), 38 labos

LQ Ptotal-inférieure ou égale à 0.05 mg/l pour 16 labos sur 38 laboratoires agréées utilisant cette méthode, 1 laboratoire déclare une LQ de 0,005 mg/l

Méthode pour le dosage des éléments dissous, des éléments liés aux particules (matières en suspension), ainsi que la teneur totale des éléments dans différents types d'eau (par exemple eaux souterraines, de surface, brutes, potables et résiduaires). Elle s'applique à une trentaine d'éléments dont le phosphore.

Compte tenu des interférences additionnelles spécifiques observées, ces éléments peuvent également être déterminés dans les minéralisats d'eau, les boues et les sédiments (par exemple minéralisats d'eau comme spécifié dans l'ISO 15587-1 ou l'ISO 15587-2). La méthode est appropriée pour les concentrations en masse des matières en suspension dans les eaux résiduaires inférieures à 2 g/l. Le domaine d'application de cette méthode peut être étendu à d'autres matrices ou à des quantités de matières en suspension plus élevées si les interférences additionnelles qui se produisent sont effectivement prises en considération et corrigées avec attention. La démonstration de l'aptitude à l'emploi de cette méthode incombe à l'utilisateur.

Pour le phosphore, les limites de quantification limites vont de 0,009 à 0,5 mg/l selon les instruments et selon les longueurs d'onde choisies (avec des interférences différentes selon les longueurs d'ondes)

La préparation des échantillons constitue l'étape qui conditionne la productivité de la méthode.

4- NF EN ISO 17294-2 Avril 2005 Application de la spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (ICP-MS)-Partie 2 : Dosage de 62 éléments

ICP-MS (Code sandre 422) : 1 labo agréé eaux douces LQ déclarée : 0,05 mg/L
--

Méthode de dosage de 62 éléments dont le phosphore dans l'eau (par exemple l'eau potable, l'eau de surface, l'eau souterraine, les eaux usées et les éluats).

Compte tenu des interférences spécifiques et des interférences non spécifiques, ces éléments peuvent également être dosés dans des minéralisats d'eau, de boues et de sédiments (par exemple des minéralisats d'eau conformes à l'ISO 15587-1 ou à l'ISO 15587-2).

La gamme de travail dépend de la matrice et des interférences rencontrées. Dans l'eau potable et dans les eaux relativement peu polluées, la limite d'application est comprise entre 0,0001 mg/l et 0,001 mg/l pour la plupart des éléments. Les limites de détection de la plupart des éléments sont influencées par la contamination du blanc qui dépend, dans une large mesure, des installations de traitement de l'air dont dispose le laboratoire.

La limite inférieure d'application sera plus élevée dans les cas où la détermination est susceptible d'être soumise à des interférences ou en cas d'effets de mémoire. C'est en particulier le cas pour des instruments utilisés pour la mesure de nombreux éléments dans les matrices variées. Dans un tel cas, la limite de quantification du phosphore sera au mieux 0,005 mg/l

Le nombre d'analyses /jours de cette méthode est similaire à celle de l'ICP-OES et conditionné essentiellement par la préparation des échantillons.

4. Conclusion

Il apparaît que la majorité des laboratoires (73%) utilisent une méthode de dosage du phosphore dont les performances potentielles sont conformes aux LQ souhaitées. En revanche, seuls 3 % de ces laboratoires déclarent atteindre cette LQ.

On peut donc a priori considérer que les 70% des laboratoires déclarant une LQ plus élevées avec ces mêmes méthodes sont susceptibles d'améliorer leurs performances dans des conditions réalistes. Les 27% de laboratoires utilisant des méthodes ne permettant pas, a priori, d'atteindre ces nouvelles LQ seraient donc contraint de modifier leurs protocoles.

On remarquera par ailleurs que, en l'état actuel, 20 % des laboratoires agréés déclarent une LQ non conforme aux prescriptions minimales de l'agrément actuel.

Il est donc nécessaire de modifier les valeurs prescrites par l'arrêté d'agrément pour le phosphore et les orthophosphates, afin de disposer d'une base réglementaire adaptée.

Les données actuelles montrant que les valeurs annoncées ne sont pas toujours respectées dans les faits, il sera également nécessaire de vérifier que ces prescriptions sont respectées dans les marchés (réponse aux appels d'offres) et dans les résultats effectivement produits).