

Etude de la stabilité de la chlorophylle *a* entre l'échantillonnage et la filtration en vue de l'analyse au laboratoire

B. Lepot, N. Guigues, C. Ferret, S. Raveau, S. Lardy-Fontan

Septembre 2021

Document final

En partenariat avec



Avec le soutien de

Contexte de programmation et de réalisation

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme scientifique et technique AQUAREF pour les années 2019-2021, au titre de l'action C1b2 « Acquisition de données sur la stabilité des substances à surveiller » du thème C « Améliorer les opérations d'échantillonnage et de mesures in situ ».

Auteur (s) :

Bénédicte Lepot
INERIS
Benedicte.lepot@ineris.fr

Céline Ferret
INERIS
Celine.ferret@ineris.fr

Nathalie Guigues
LNE
Nathalie.guigues@lne.fr

Sandrine Raveau
LNE
Sandrine.raveau@lne.fr

Sophie Lardy-Fontan
LNE
Sophie.lardy-fontan@lne.fr

Vérification du document :

Jean-Philippe Ghestem
BRGM
Jp.ghestem@brgm.fr

Aymeric Dabrin
INRAE
aymeric.dabrin@inrae.fr

Approbation : Document approuvé le 09/05/2022 par MORIN ANNE

Les correspondants

OFB : Nicolas Gaury, nicolas.gaury@ofb.gouv.fr

INERIS : Bénédicte Lepot, Benedicte.Lepot@ineris.fr

Référence du document : Bénédicte Lepot, Nathalie Guigues, Céline Ferret, Sandrine Raveau, Sophie Lardy-Fontan - Etude de la stabilité de la chlorophylle a entre l'échantillonnage et la filtration en vue de l'analyse au laboratoire - Rapport AQUAREF 2020 - 37 p.

Droits d'usage :	<i>Accès libre</i>
Couverture géographique :	<i>International</i>
Niveau géographique :	<i>National</i>
Niveau de lecture :	<i>Professionnels, experts</i>
Nature de la ressource :	<i>Document</i>

1	INTRODUCTION.....	11
1.1	Contexte.....	11
1.2	Chlorophylles et pheopigments.....	11
1.3	Objectifs.....	12
2	CONCEPTION DE L'ETUDE	12
2.1	Plan d'expériences.....	12
2.2	Choix des sites.....	14
3	PROTOCOLE MIS EN ŒUVRE.....	17
3.1	Echantillonnage	17
3.2	Filtration.....	17
3.3	Conservation des échantillons	18
3.3.1	Méthode NF T 90-117	18
3.3.2	Méthode par mesures sur site.....	18
3.4	Mesures sur site	19
3.5	Analyse de la chlorophylle <i>a</i> et des pheopigments - méthode NF T 90-117.....	20
4	RESULTATS.....	22
4.1	Caractérisation des sites.....	22
4.2	Incertitude de mesure.....	23
4.3	Etude de stabilité	24
4.3.1	Chlorophylle <i>a</i>	25
4.3.1.1	Méthode NF T 90-117	25
4.4	Mesures sur site	28
4.4.1	Type de filtre	28
4.4.2	Effet solvant	28
5	CONCLUSIONS	31
6	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	34

Liste des figures :

Figure 1 : Illustration schématique de l'étude de stabilité (Méthode NF T 90-117 (filtration et analyse au laboratoire) : en haut ; Méthode par mesures sur site à l'aide de sondes : en bas).....	13
Figure 2 : Localisation des sites d'échantillonnage par bassin hydrographique	15
Figure 3 : Quelques sites examinés au cours de l'étude (Artois Picardie (en haut), Loire Bretagne (seconde ligne), Rhône Méditerranée Corse (troisième ligne) et Adour Garonne (en bas))	16
Figure 4 : Filtration sur site - aménagement de la zone de travail en fonction de la configuration du site	18
Figure 5 : Sonde AlgaeTorch	19
Figure 6 : Sonde multiparamètres EXO2	20
Figure 7 : Diagramme radar des concentrations relative en chlorophylle <i>a</i> (Chla_EXO2), oxygène dissous (ODO2) Conductivité (Cond nF), turbidité (Turbidité_HACH) et matière organique fluorescente (fDOM2), après normalisation des concentrations par rapport à la concentration maximale (sauf pour la chlorophylle <i>a</i> et Turbidité : percentile 95).....	23
Figure 8 : Exemples d'instabilités observées - Concentration normalisée avec son erreur type à T8 et T24 en dehors de l'écart maximal acceptable (ici identifié en pointillé orange et correspondant à l'incertitude de mesure obtenue sur les 6 répliquas mesurés à T0)	25
Figure 9 : Stabilité de la chlorophylle <i>a</i> , mesurée selon NF T90-117, pour les 22 échantillons testés. L'écart maximal acceptable, correspondant à l'incertitude de mesure élargie U (k=2) est visualisé par les pointillés orange.....	26
Figure 10 : Stabilité des phéopigments, mesurés selon NF T90-117, pour les 22 échantillons testés. L'écart maximal acceptable, correspondant à l'incertitude de mesure élargie U (k=2) est visualisé par les pointillés orange.....	27
Figure 11 : Boite à moustache avec encoches de la concentration totale (chlorophylle <i>a</i> et phéopigments) selon le type de filtre utilisé. Les encoches correspondent à une approximation de l'erreur associée à chaque médiane : si les encoches ne se chevauchent pas, les deux médianes sont significativement différentes au niveau de confiance.....	28
Figure 12 : Comparaison des spectres d'absorption entre 300 et 700 nm selon le solvant d'extraction utilisé	29
Figure 13 : Boite à moustache avec encoches de la chlorophylle totale (chlorophylle <i>a</i> et phéopigments) selon le type de solvant d'extraction utilisé. Les encoches correspondent à une approximation de l'erreur associée à chaque médiane : si les encoches ne se chevauchent pas, les deux médianes sont significativement différentes au niveau de confiance.....	29
Figure 14 : Boite à moustache avec encoches de la chlorophylle totale (chlorophylle <i>a</i> et pheopigments) par région étudiée et selon le type de solvant d'extraction utilisé	30

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Récapitulatif des dispositifs de mesure utilisés	19
Tableau 2 : Protocoles d'extraction à l'acétone mis en œuvre pour l'étude en fonction du type de filtre, d'après NF T90-117	21
Tableau 3 : Protocoles d'extraction à l'éthanol à chaud mis en œuvre pour l'étude quel que soit le type de filtre, d'après Yepremian	21
Tableau 4 : Description statistique (valeur minimale = min ; valeur maximale = max ; médiane) des paramètres mesurés sur site pour les 22 sites	22
Tableau 5 : Incertitude de mesure élargie U (k=2) pour une sélection de paramètre / méthode de mesure	24
Tableau 6 : Concentration moyenne et écart type (absolu et relatif) des 6 réplicats à T0	27
Tableau 7 : Bilan de l'étude de stabilité réalisée sur la chlorophylle a, la turbidité, les matières en suspension, la matière organique fluorescente et le carbone organique total	32

Liste des annexes :

Annexe 1 : Liste des sites étudiés.....	35
Annexe 2 : Organisation générale d'une campagne d'échantillonnage : région Artois Picardie	36
Annexe 3 : Ratio phéopigments vs Chlorophylle a - Norme NF T 90-117	37

ETUDE DE LA STABILITE DE LA CHLOROPHYLLE A ENTRE L'ECHANTILLONNAGE ET LA FILTRATION EN VUE DE L'ANALYSE AU LABORATOIRE

Bénédicte Lepot, Nathalie Guigues, Céline Ferret, Sandrine Raveau, Sophie Lardy-Fontan

RESUME

La « chlorophylle *a* » est un paramètre suivi dans le cadre de la Directive Cadre Eau (DCE) comme indicateur de biomasse dans l'état écologique. Ce paramètre étant très sensible à la lumière, il nécessite d'être piégé sur filtre rapidement après l'échantillonnage afin d'éviter qu'il ne se dégrade, entraînant un résultat potentiellement biaisé.

Les préconisations émises au niveau national pour la détermination de la chlorophylle *a* sont divergentes sur le délai de filtration des échantillons après échantillonnage. Certaines sources recommandent la filtration sur site, d'autres la possibilité de réaliser la filtration au laboratoire sur un délai de 24 heures après échantillonnage.

Cette question du délai de la filtration, ainsi que des conditions de conservation des filtres et du délai de leur extraction ont par ailleurs été soulevés par certaines Agences de l'Eau. Certaines Agences (Agence de l'Eau Seine Normandie par exemple) ont mis en place la filtration sur site, alors que d'autres réalisent la filtration dans un délai de 24h, à réception des échantillons au laboratoire.

Pour répondre à ces questions, une étude sur les conditions de conservation et notamment sur le délai entre l'échantillonnage et la filtration des eaux superficielles continentales en vue de la détermination de la chlorophylle *a* a été conduite en 2019 et 2020. L'objectif principal de cette étude était de préciser les bonnes pratiques pour l'analyse de la chlorophylle *a* par la méthode de laboratoire en statuant sur le délai à respecter entre l'échantillonnage et la filtration.

En complément, deux facteurs potentiellement influents sur la détermination de la chlorophylle *a* par la méthode de laboratoire ont également été évalués : la nature du filtre utilisé (filtre en fibre de verre ou filtre en acétate de cellulose) et le solvant d'extraction (acétone ou éthanol à chaud).

Enfin une alternative à la méthode en laboratoire a été testée via l'utilisation de sondes multi-paramètres sur site (EXO 2 et AlgaeTorch ATo) basée sur des mesures de fluorescence des pigments de chlorophylles. Ces sondes permettent la mesure simultanément de la turbidité et de la matière organique. Les données obtenues pour ces paramètres ont également été exploitées.

22 stations de mesures réparties sur 4 bassins hydrographiques différents ont été investiguées. Le protocole mis en œuvre est basé sur une approche pseudo chronologique (FD T 90-240). Il a consisté à prélever sur chaque site un volume d'eau suffisant pour pouvoir réaliser aux différents pas de temps (T0, T8, T24 heures), les filtrations ou les mesures sur site. Entre les différents pas de temps, les échantillons d'eaux ont été conservés entre +2 et +8°C et les filtres conservés à -18°C. Ils ont été extraits et analysés dans la même série analytique pour chaque campagne en mettant en œuvre la norme NF T 90-117.

L'exploitation de la stabilité a été effectuée suivant la norme FD T 90-240. Une normalisation des données pour chaque site a été réalisée et il a été retenu, comme écart maximal acceptable pour juger de la stabilité, l'incertitude de mesure élargie ($k=2$) estimée à partir des données mesurées sur les 6 réplicats au pas de temps $T=0$.

Il en ressort que l'écart maximal acceptable (incertitude de mesure élargie) est variable selon la méthode de mesure mise en œuvre. Elle est de 21% pour la détermination de la chlorophylle a par la méthode en laboratoire (NF T 90-117) et entre 7,1% et 9,8% par la méthode « mesure sur site » à l'aide des sondes multi-paramètres, ce qui conduit à des conclusions différentes sur la stabilité selon les méthodes mises en œuvre.

Compte tenu de l'incertitude de mesure suivant la norme NF T 90-117 (21% à k=2), les conclusions de l'étude de stabilité sont que la filtration des échantillons peut être réalisée à réception au laboratoire, 24 heures après échantillonnage si les bonnes pratiques de conservation sont respectées (remplissage ras bord, réfrigération et protection de la lumière).

Sur les échantillons testés selon la méthode NF T 90-117, aucune différence significative n'a été observée selon la nature du filtre et le type de solvant utilisés.

Quant à la méthode « mesure sur site » mise en œuvre à l'aide d'une sonde multi-paramètres (EXO2, ATo), les résultats sont différents et montrent une instabilité de la concentration de la chlorophylle a entre T0 et T24. Cette instabilité est due à un écart maximal acceptable moindre (incertitude de mesure plus faible que celle estimée par la méthode NF T 90-117). L'intérêt de cette méthode « mesure sur site » est d'avoir une mesure immédiate, toutefois, cette méthode « mesure sur site » n'est pas normée à ce jour.

Quant au paramètre turbidité, la moitié des échantillons présentent une instabilité (c'est-à-dire qu'ils sont en dehors de l'écart maximal acceptable, 9.7%) entre l'échantillonnage et la réception au laboratoire (24 heures plus tard). Afin d'éviter toute évolution de l'échantillon durant le transport, il est fortement recommandé de réaliser la mesure de turbidité sur site. Ce constat rejoint les recommandations émises par la norme NF EN ISO 5667-3.

Ces recommandations seront intégrées dans les guides Aquaref « Echantillonnage cours d'eau » et « plan d'eau ».

MOTS CLES : CHLOROPHYLLE A, STABILITE, TURBIDITE, ECART MAXIMAL ACCEPTABLE

STUDY OF THE STABILITY OF CHLOROPHYLL A BETWEEN SAMPLING AND FILTRATION FOR LABORATORY ANALYSIS

Bénédicte Lepot, Nathalie Guigues, Céline Ferret, Sandrine Raveau, Sophie Lardy-Fontan

ABSTRACT

Chlorophyll a is a parameter monitored under the Water Framework Directive (WFD) as an indicator of biomass in ecological condition. As this parameter is very sensitive to light, it needs to be trapped on a filter quickly after sampling in order to prevent it from degrading, and to produce a potentially biased result.

The recommendations issued at national level for the determination of chlorophyll a differ on the filtration time of samples after sampling. Some sources recommend on-site filtration, others the possibility of performing filtration in the laboratory within 24 hours after sampling.

This question of the filtration time, as well as the filter storage conditions, and the extraction time was also raised by Water Agencies. Finally, some Agencies (AESN for example) have put in place filtration on site, others have not yet, and filtration is carried out within 24 hours (upon receipt of samples at the laboratory).

To answer these questions, a study on the conditions of conservation and in particular on the time between the sampling and the filtration of continental surface water for the determination of chlorophyll has been conducted in 2019 and 2020. The main objective of this study was to frame and clarify good practices for the analysis of chlorophyll a by the laboratory method by deciding on the time to be respected between sampling and filtration in order to guarantee the reliability of chlorophyll a measurements.

In addition, two factors potentially influencing the determination of chlorophyll a by the laboratory method were also evaluated: the nature of the filter used (fiberglass filter or cellulose acetate filter) and the extraction solvent (acetone or hot ethanol).

Furthermore, an alternative to the laboratory method was tested using multi-parameter probes (EXO 2 and AlgaeTorch ATo) based on fluorescence measurements of chlorophyll pigments. These probes allow the simultaneous measurement of turbidity and organic matter, the data obtained for these parameters have also been exploited.

22 stations over 4 different hydrographic basins were investigated. The protocol implemented was based on a pseudo-chronological approach (FD T 90-240). It consisted in taking from each site a sufficient volume of water to be able to carry out at time filtrations or on-site measurements at different time steps (T0, T8 and T24 hours). Between the different time steps, the water samples were stored between +2 and + 8 ° C and the filters stored at -18 ° C. They were extracted and analyzed in the same analytical series for each campaign by implementing the NF T 90-117 standard.

The exploitation of the stability was based on the FD T 90-240 standard. A standardization of the data for each site was carried out and it was retained, as the maximum acceptable deviation to judge the stability, the expanded measurement uncertainty (k = 2) estimated from the data measured on the 6 replicates at the time T = 0.

It appears that the maximum acceptable deviation (extended measurement uncertainty) varies depending on the measurement method used. It is for the determination of chlorophyll a of 21% by the NF T 90-117 method and between 7.1% and 9.8% by the method on site (measurement by probes), which leads to a conclusion on the different stability for chlorophyll a.

Given the measurement uncertainty according to the NF T 90-117 standard (21% at $k=2$), the conclusions of the stability study are that the filtration of the samples can be carried out upon receipt at the laboratory, 24 hours after sampling if good conservation practices are respected (filling to the brim, refrigeration and light protection).

On the samples tested, no significant differences were observed depending on the nature of the filter and the type of solvent used.

As for the method implemented using a multi-parameter probe (EXO2, ATo), the results are different and show an instability of the concentration of chlorophyll a between T0 and T24. This instability is due to a smaller maximum acceptable deviation (lower measurement uncertainty than that estimated by method NF T 90-117). The interest of this on-site method is to have an immediate measurement; however, this on-site method is not standardized to date.

As for the turbidity parameter, half of the samples show instability (i.e. are outside the maximum acceptable deviation, 9.7%) between sampling and reception at the laboratory (24 h later). In order to avoid any changes in the sample during transport, it is recommended to perform the turbidity measurement on site. This observation is in line with the recommendations issued by the NF EN ISO 5667-3 standard.

These recommendations will be incorporated into the Aquaref "Stream sampling" and "lakes sampling" guides.

KEYWORDS: CHLOROPHYLL A, STABILITY, TURBIDITY, MAXIMUM ACCEPTABLE DEVIATION

1 INTRODUCTION

1.1 CONTEXTE

La chlorophylle a est un paramètre suivi dans le cadre de la Directive Cadre Eau (DCE) comme indicateur de biomasse dans l'état écologique.

Ce paramètre étant très sensible à la lumière, il nécessite d'être récupéré sur filtre et stabilisé à basse température afin d'éviter qu'il ne se dégrade, entraînant un résultat potentiellement biaisé.

Les principales méthodes de référence pour la mesure de la chlorophylle a sont des méthodes de laboratoire basées sur la mesure de l'absorbance à des longueurs d'ondes prédéfinies après filtration et extraction des pigments au moyen d'un solvant. Les consignes sur le délai de filtration sont différentes selon les sources documentaires : par exemple, la norme NF T90-117 préconise une filtration sur site, ou dans un délai de 12h au maximum alors qu'un guide Cemagref autorise un délai de 24 h pour la filtration après échantillonnage, tout en recommandant aussi une filtration sur site. Pour le milieu marin, le guide OSPAR sur la chlorophylle a (JAMP 2012) impose d'effectuer la filtration ainsi que l'extraction immédiatement après l'échantillonnage. A ce jour, les guides AQUAREF échantillonnage cours d'eau et plan d'eau (version 2017) suivent les recommandations de la norme NF T90-117 pour l'étape de filtration.

Cette question du délai de la filtration, ainsi que des conditions de conservation des filtres et du délai de leur extraction a par ailleurs été soulevée par certaines Agences de l'Eau. Enfin, certaines Agences (Agence de l'Eau Seine Normandie par exemple) ont mis en place la filtration sur site, alors que d'autres réalisent la filtration dans un délai de 24h, à réception des échantillons au laboratoire.

Pour répondre à ces questions, une étude sur les conditions de conservation et notamment sur le délai entre l'échantillonnage et la filtration des eaux superficielles continentales en vue de la détermination de la chlorophylle a a été conduite en 2019 et 2020 à l'échelle nationale.

1.2 CHLOROPHYLLES ET PHEOPIGMENTS

La chlorophylle, de par sa couleur verte, est le principal pigment contenu dans les plantes. Elle se trouve dans les chloroplastes des cellules végétales. Elle est indispensable pour l'activité photosynthétique de la plante qui consiste à produire de l'énergie chimique (ATP) à partir de l'énergie lumineuse du soleil.

Il existe plusieurs types de chlorophylles dont :

- la chlorophylle a qui est le pigment le plus commun du règne végétal, présent chez tous les végétaux aquatiques et terrestres ;
- la chlorophylle b, présente chez les végétaux supérieurs (cormophytes) et les algues vertes (chlorophycées) ;
- la chlorophylle c, présente dans les algues brunes (fucus, diatomées) ;
- la chlorophylle d, présente dans les algues bleues (cyanobactéries).

Dans les eaux douces, sont en général mesurés uniquement la chlorophylle a ainsi que les phéopigments qui proviennent de la dégradation des pigments chlorophylliens dans les organismes phytoplanctoniques.

1.3 OBJECTIFS

L'objectif principal de cette étude était de cadrer, préciser les bonnes pratiques pour l'analyse de la chlorophylle a par la méthode de laboratoire en statuant sur le délai à respecter entre l'échantillonnage et la filtration afin de garantir la fiabilité des mesures de la chlorophylle a.

En complément, deux facteurs potentiellement influents sur la détermination de la chlorophylle a par la méthode en laboratoire ont également été évalués : la nature du filtre utilisé (filtre en fibre de verre ou filtre en acétate de cellulose) et le solvant d'extraction (acétone ou éthanol à chaud).

Par ailleurs, une alternative à la méthode en laboratoire a été testée au moyen de sondes multi-paramètres in situ (EXO 2 et AlgaeTorch ATo) basée sur des mesures in situ de fluorescence des pigments de chlorophylles. Ces sondes permettent la mesure simultanément de la turbidité et de la matière organique, les données obtenues pour ces paramètres ont également été exploitées.

A terme, les résultats observés au cours de cette étude viendront enrichir les guides AQUAREF sur les opérations d'échantillonnage en « cours d'eau » et en « plan d'eau », ainsi que le projet de norme WI 00230401 "Chlorophyll-a" en cours de discussion au niveau européen (nouveau projet proposé par les néerlandais accepté dans le cadre du CEN TC 230 WG1).

Ce rapport présente la conception de l'étude, les protocoles mis en œuvre, ainsi que les résultats obtenus.

2 CONCEPTION DE L'ETUDE

2.1 PLAN D'EXPERIENCES

Afin d'évaluer la durée optimale entre l'échantillonnage et la filtration des échantillons pour déterminer les concentrations en chlorophylle a et en phéopigments, une étude basée sur une approche pseudo chronologique comme décrite dans les travaux réalisés par AQUAREF 2016 et repris dans le projet de norme international ISO/TS 5667-25 et dans le projet français FD T 90-240, a été conçue. Pour cela, les pratiques des préleveurs ont été intégrées pour définir les conditions d'essais : filtration sur site, filtration 8h après échantillonnage au local du préleveur ou 24h après au laboratoire à réception des échantillons.

En parallèle, des mesures réalisées sur site au moyen de sondes multi-paramètres et d'appareils portables ont été réalisées en suivant le même principe et avec le même nombre de répliqués.

Le principe de cette étude est illustré à la fois pour la filtration suivie de l'analyse en laboratoire de la chlorophylle a et des phéopigments, et pour les mesures sur site dans la Figure 1.

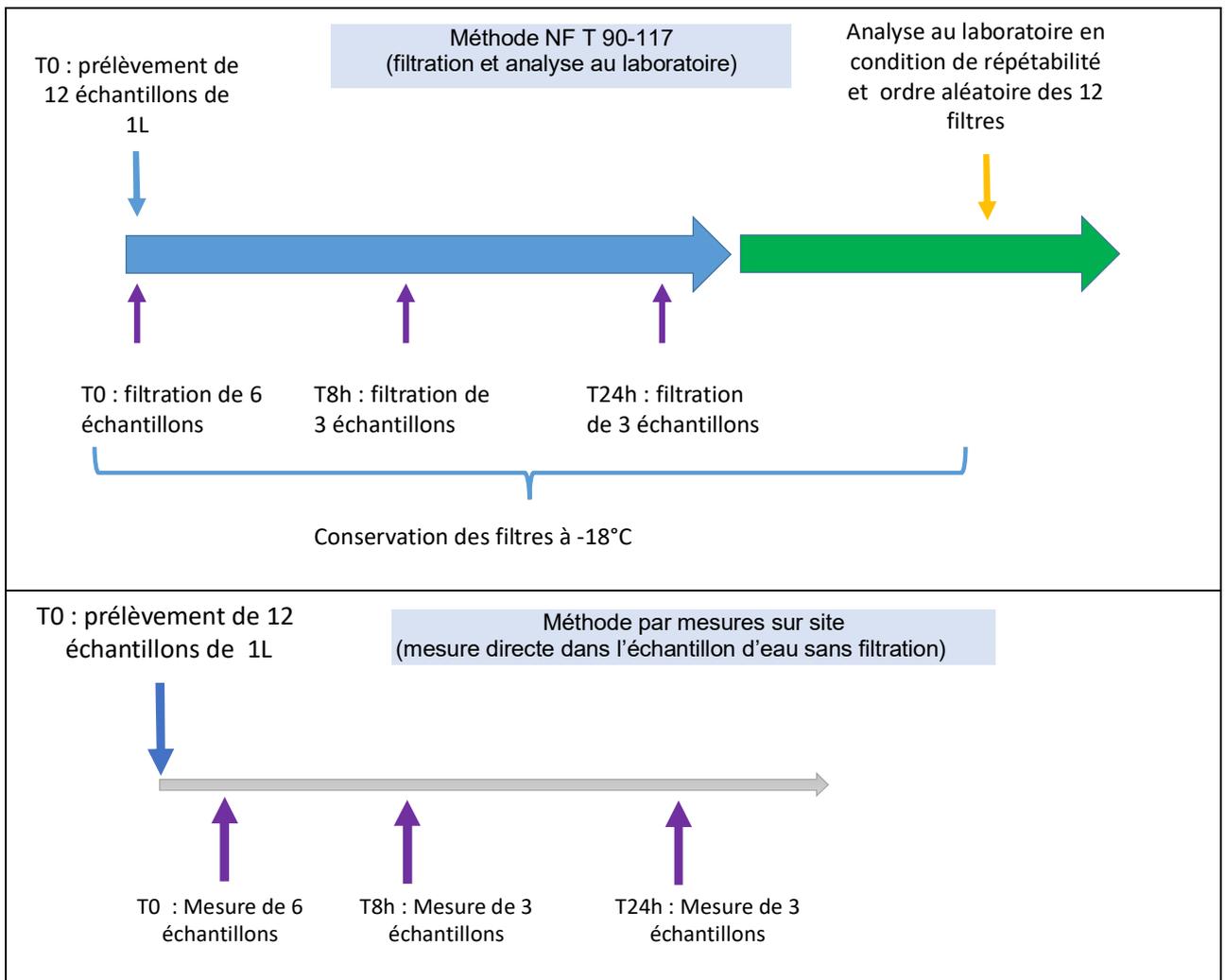


Figure 1 : Illustration schématique de l'étude de stabilité (Méthode NF T 90-117 (filtration et analyse au laboratoire) : en haut ; Méthode par mesures sur site¹ à l'aide de sondes : en bas)

Chaque étape (prélèvement, filtration, mesure sur site, analyse au laboratoire) a été effectuée par le même opérateur afin de minimiser l'impact de celui-ci sur les résultats.

Les filtrations et les mesures ont été réalisées sur des échantillons indépendants.

Il a été nécessaire de réaliser un nombre d'échantillonnages importants à T0 pour pouvoir :

- filtrer et réaliser les mesures sur site, immédiatement après échantillonnage (T0) ;
- conserver le reste des échantillons, réaliser les filtrations et les mesures sur site 8 heures après échantillonnage (T8) ;
- conserver les échantillons restants et réaliser les filtrations et les mesures sur site 24 heures après échantillonnage (T24).

¹ mesure sur site : mesure réalisée sur le terrain, sur un échantillon représentatif de la masse d'eau

Ainsi sur chaque site, il a été nécessaire d'échantillonner 24 litres, 12 litres dédiés aux filtrations et 12 litres dédiés aux mesures sur site.

Par ailleurs, des échantillons supplémentaires ont été prélevés afin d'inclure les options disponibles dans la norme NF T90-117 comme le type de filtres (acétate de cellulose et fibres de verre borosilicaté), mais aussi, afin d'intégrer les évolutions potentielles du projet de norme WI 00230401 "Chlorophyll-a" soumis au CEN TC230, comme notamment le changement de solvant d'extraction entre l'acétone à 90% (NF T90-117) et l'éthanol à 90% à chaud (projet européen).

L'Ineris et LNE ont réalisé les opérations d'échantillonnage, les mesures des paramètres physico-chimiques et la filtration sur site. Le LNE a réalisé, au laboratoire, les analyses de chlorophylle a et des phéopigments sur l'ensemble des filtres.

2.2 CHOIX DES SITES

Une recherche des régions ayant des sites présentant des niveaux de concentration variables en chlorophylle a, mais aussi caractérisées par des compositions chimiques et des types d'eau différents (petits, moyens et grands cours d'eau, lacs, étangs, canaux) a été effectuée.

Des sites par région ont été pré-sélectionnés à partir des données historiques disponibles dans la base de données Naiades du site Eau France (<http://www.naiades.eaufrance.fr/acces-donnees#/physicochimie>).

Le choix final des sites d'étude a été réalisé au moment de chaque campagne d'échantillonnage. Pour cela, des mesures sur site au moyen d'une sonde multi-paramètres EXO2 (YSI) ont été réalisées afin de vérifier les niveaux de concentration en chlorophylle a le jour de l'essai et de caractériser les sites au regard des paramètres suivants : pH, conductivité, oxygène dissous, turbidité, matière organique fluorescente. Cette validation a permis de sélectionner des sites couvrant l'ensemble de la gamme de concentrations en chlorophylle a.

Au total, 22 sites situés sur 4 bassins hydrographiques différents ont été sélectionnés (Figure 2). La liste des sites est présentée en Annexe 1 et la Figure 3 présente quelques sites de l'étude.

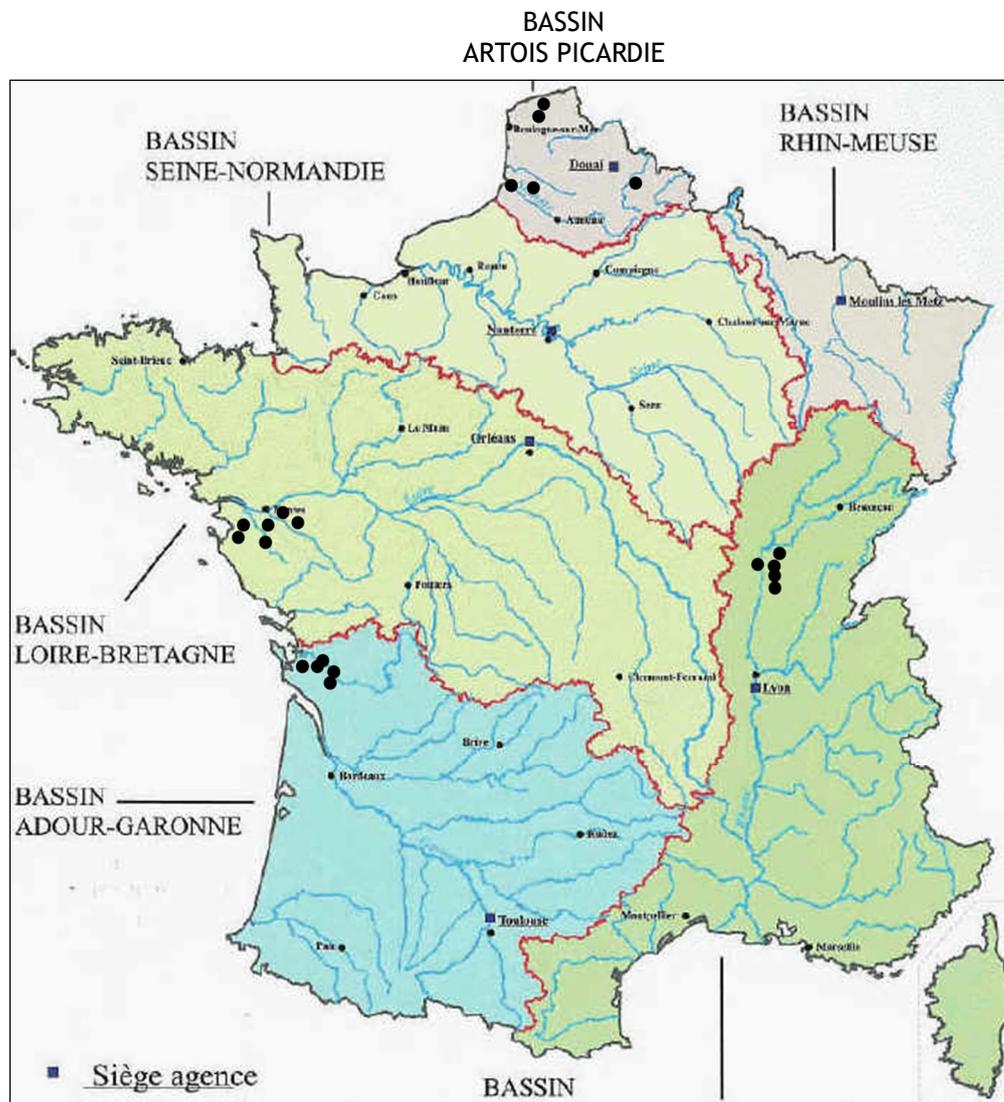


Figure 2 : Localisation des sites d'échantillonnage par bassin hydrographique

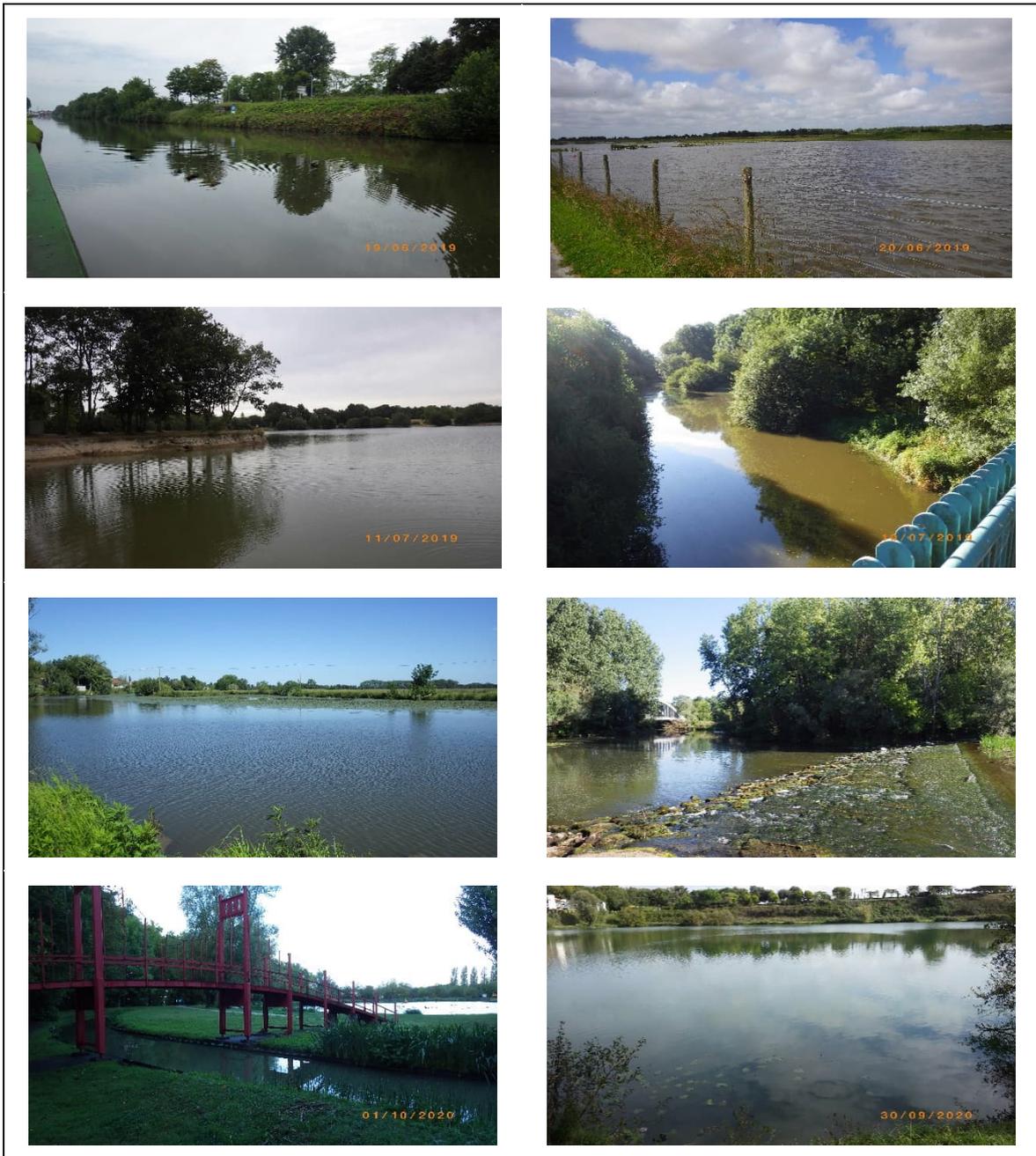


Figure 3 : Quelques sites examinés au cours de l'étude (Artois Picardie (en haut), Loire Bretagne (seconde ligne), Rhône Méditerranée Corse (troisième ligne) et Adour Garonne (en bas))

3 PROTOCOLE MIS EN ŒUVRE

Quatre campagnes de mesure ont été menées en 2019-2020 sur les régions hydrographiques : Artois-Picardie, Loire-Bretagne, Rhône Méditerranée Corse et Adour Garonne.

Chaque campagne comprenait la réalisation de l'échantillonnage et la filtration sur 5 à 6 sites, à raison de 2 sites maximum par jour afin de pouvoir réaliser les filtrations après 8 heures dans une même journée.

Un codage a été défini pour chaque région et pour chaque site sous la forme JX-SY. Par exemple pour la région Artois-Picardie, les sites sont libellés en fonction du jour de l'étude (J1, J2, J3) et du site du jour (S1 ou S2). Le terme J1-S1 correspond donc au premier site du premier jour de l'étude. Le codage commençant par J1, J2 et J3 correspond à la région Artois Picardie, J4 à J6 à la région Loire Bretagne, J7 à J9 à la région Rhône Méditerranée Corse et J10 à J12 à la région Adour Garonne.

L'organisation générale d'une campagne d'échantillonnage est détaillée en Annexe 2.

3.1 ECHANTILLONNAGE

En amont de l'échantillonnage, une caractérisation du site était réalisée afin d'identifier la zone propice à l'échantillonnage mais aussi de définir la technique d'échantillonnage appropriée (à pied dans le cours d'eau, de la berge à l'aide d'une canne de prélèvement ou d'un pont). L'ensemble de ces informations a été renseigné dans une fiche terrain afin d'assurer la traçabilité des opérations.

Pour les opérations d'échantillonnage, les recommandations du guide AQUAREF sur les opérations d'échantillonnage d'eau en cours d'eau et du FD T90-523-1 ont été mises en œuvre, notamment : rinçage 3 fois du système de prélèvement et/ou des flacons en verre ambré avant d'échantillonner, remplissage des flacons en verre ambré à ras-bord.

3.2 FILTRATION

Lors de cette étude, le mode opératoire préconisé pour la filtration par la norme NF T90-117 a été mis en œuvre.

Les conditions spécifiques de filtration étaient :

- Volume d'échantillon filtré au maximum : 1 litre ;
- Temps de filtration de 10 min maximum par filtre ;
- 3 filtres maximum par litre d'échantillon.

Ces conditions ont été appliquées à toutes les filtrations et quel que soit le type de filtre utilisé. La Figure 4 présente quelques configurations d'installation réalisées sur site pour réaliser la filtration à T0 ou T8h.



Figure 4 : Filtration sur site - aménagement de la zone de travail en fonction de la configuration du site

3.3 CONSERVATION DES ECHANTILLONS

3.3.1 METHODE NF T 90-117

- Filtres à T0, T8 et T24 :

Une fois les échantillons filtrés, les filtres ont été conservés dans des boîtes de pétri (pétri-slides), identifiés par une référence unique, emballés dans du papier d'aluminium et stockés dans un congélateur portable et/ou une glacière équipée de pains de glace ayant la capacité de maintenir une température à l'intérieur de l'enceinte d'au moins -18°C .

- Echantillons d'eau à T8 et T24 :

Une fois échantillonnés et avant d'être filtrés à T8 et T24, les échantillons d'eau ont été conservés dans des glacières équipées de pains de glace permettant de maintenir une température à l'intérieur de l'enceinte comprise entre $+2$ et $+8^{\circ}\text{C}$.

3.3.2 METHODE PAR MESURES SUR SITE

Une fois les échantillons prélevés à T0, les échantillons d'eau destinés aux mesures sur site (T8 et T24) ont été conservés dans des glacières équipées de pains de glace permettant de maintenir une température à l'intérieur de l'enceinte comprise entre $+2$ et $+8^{\circ}\text{C}$.

3.4 MESURES SUR SITE

Les mesures sur site ont été réalisées aux moyens de sondes multi-paramètres et d'appareils portable à T0, T8 et T24 (Tableau 1).

Tableau 1 : Récapitulatif des dispositifs de mesure utilisés

Dispositifs de mesure	Paramètres mesurés
Sonde EXO2 (YSI)	température, pH, conductivité à 25°C, oxygène dissous (mg/L et % de saturation), turbidité, matière organique dissous fluorescente (fDOM), chlorophylle <i>a</i> et cyanobactéries
Sonde Algae Torch (BBE)	chlorophylle <i>a</i> , cyanobactéries, turbidité
Pastel UV (Secomam)	matières en suspension (MES), demande chimique en oxygène (DCO), demande biochimique en oxygène (DBO), carbone organique total (COT), nitrates (NO ₃) et surfactants
Turbidimètre 2100 Q IS (Hach)	Turbidité

Deux sondes multiparamètres permettent de mesurer les pigments chlorophylliens : l'Algae Torch et la sonde EXO2.

L'AlgaeTorch bbe utilise la fluorescence in vivo des cellules d'algues (Figure 5). Les pigments des algues sont excités successivement par trois LEDs colorées à haute fréquence (470 nm, 525 nm et 600 nm). En réponse, les algues émettent une fluorescence dans le rouge. L'intensité de la lumière est utilisée pour calculer la concentration des différents types d'algues, i.e. les cyanobactéries et la totalité des microalgues au moyen d'algorithmes optimisés.

Une mesure de la turbidité est effectuée à chaque mesure (700 nm) ce qui permet une compensation automatique de la turbidité au cours de la mesure de la chlorophylle. L'étalonnage de la sonde Algae Torch est réalisée chez le fabricant (BBE Moldaenke) au moyen de cultures d'algues.



Figure 5 : Sonde AlgaeTorch

Le capteur de chlorophylle EXO2 fonctionne sur le principe de la fluorescence in vivo, sans désintégration cellulaire (Figure 6). C'est un capteur de fluorescence double-voie qui permet de mesurer la chlorophylle a (excitation à 470 nm) et les phycocyanines présentes dans les cyanobactéries (excitation à 590 nm). Les interférences de matière solides (turbidité) et de matière organique sont très faibles. L'étalonnage du capteur EXO2 est réalisé avec une solution de rhodamine (colorant rouge).

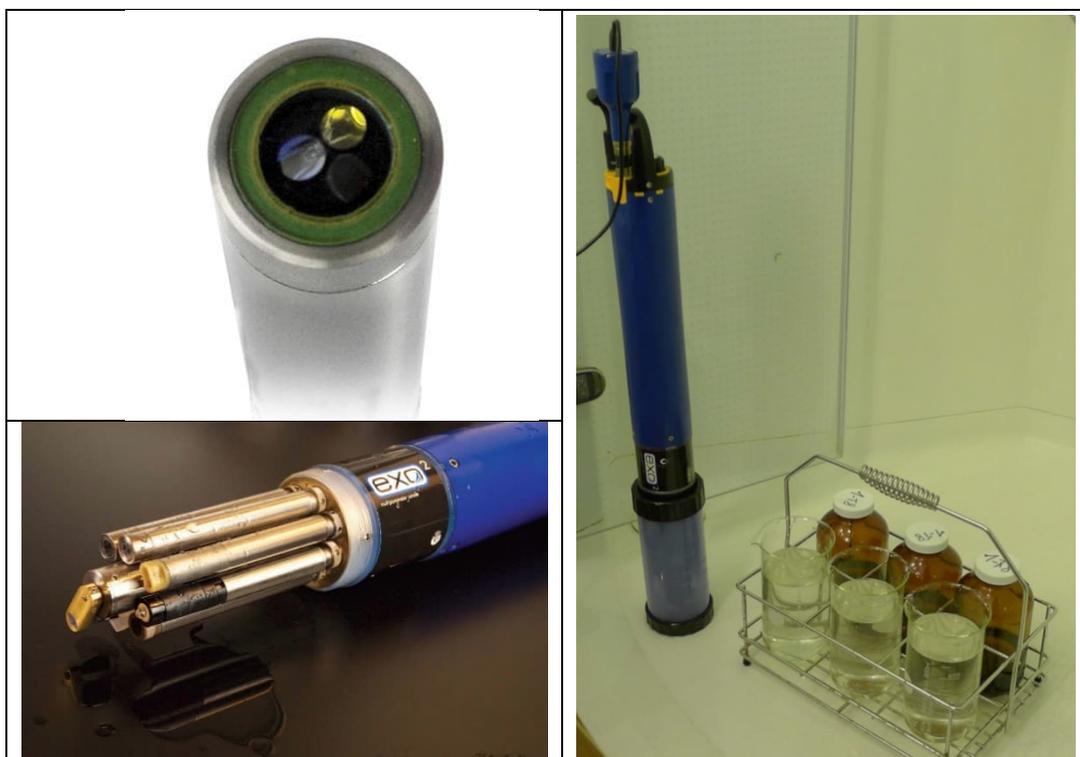


Figure 6 : Sonde multiparamètres EXO2

3.5 ANALYSE DE LA CHLOROPHYLLE A ET DES PHEOPIGMENTS - METHODE NF T 90-117

Cette étape correspond à l'analyse des échantillons en laboratoire selon la méthode NF T 90-117.

Les analyses ont été réalisées au LNE selon la méthode décrite dans la norme NF T90-117 et une synthèse du protocole analytique est présentée dans le Tableau 2 en fonction du type de filtre mis en œuvre.

Les filtres ont été décongelés 5 minutes avant leur transfert dans des tubes à centrifuger entourés d'aluminium. Afin de s'assurer que tout le filtre est en contact avec le solvant d'extraction, ils ont été grossièrement pliés en 4 avant d'être introduits dans les tubes.

Tableau 2 : Protocoles d'extraction à l'acétone mis en œuvre pour l'étude en fonction du type de filtre, d'après NF T90-117

Fibre de verre - Acétone	Acétate de cellulose - Acétone
Ajouter 10 ml d'acétone à 90%	
Mettre aux ultrasons pendant 20 minutes (chronomètre)	Agiter jusqu'à dissolution du filtre
Laisser reposer 10 minutes (chronomètre)	Centrifuger 10 minutes à 3500 g à 20 °C Noter la couleur du culot
Filtrer le surnageant sur Buchner avec filtre en fibre de verre (humidifié) Rincer le tube à centrifuger, le filtre et l'erlen	
Volumer à 20 ml dans une fiole jaugée ou mesurer le volume dans une éprouvette de 25 ml	
Mesures de l'absorbance à 410 nm, 430 nm, 630 nm, 645 nm, 663 nm et 750 nm	

Le calcul de la concentration en chlorophylle totale, chlorophylle a et phéopigments a été effectué en appliquant la méthode SCOR UNESCO.

Une variante pour le solvant d'extraction a été testée : l'éthanol à chaud selon la méthode SOP Yepremian (Tableau 3).

Tableau 3 : Protocoles d'extraction à l'éthanol à chaud mis en œuvre pour l'étude quel que soit le type de filtre, d'après Yepremian

Acétate de cellulose / fibre de verre - Ethanol 90% à chaud
Ajouter 10 ml d'éthanol à 90%
Mélanger au vortex pendant quelques minutes pour « casser le filtre » (haut et bas du tube)
Mettre dans un bain chauffant pendant 10 minutes à 75 °C (chronomètre)
Refroidir dans un récipient contenant de la glace et mettre aux ultrasons pendant 10 minutes (chronomètre)
Centrifuger à 4000 rpm pendant 10 minutes, à 10°C.
Filtrer le surnageant sur Buchner avec filtre en fibre de verre (humidifié) Rincer le tube à centrifuger, le filtre et l'erlen
Volumer à 20 ml dans une fiole jaugée ou mesurer le volume dans une éprouvette de 25 ml
Mesures de l'absorbance à 410 nm, 430 nm, 632 nm, 649 nm, 665 nm, 696 nm et 750 nm

4 RESULTATS

4.1 CARACTERISATION DES SITES

Les 22 sites ont été caractérisés au moyen des mesures réalisées sur site à l'aide de sondes multiparamètres.

Une synthèse des valeurs obtenues sur les mesures réalisées dans les flacons de 1 litre à T0 à l'aide des dispositifs de mesure pour l'ensemble des sites est présentée dans le Tableau 4. Les gammes de concentration ainsi mesurées dans cette étude sont représentatives des teneurs habituellement observées dans les masses d'eau.

Tableau 4 : Description statistique (valeur minimale = min ; valeur maximale = max ; médiane) des paramètres mesurés sur site pour les 22 sites

Paramètre	Appareillage	min	max	médiane
T (°C)	EXO2	14.8	25.5	20.6
Conductivité à 25°C (µS/cm)	EXO2	253	1200	551
Saturation en O2 (%)	EXO2	45.9	149	102
Oxygène dissous (mg/L)	EXO2	4.3	14	9.3
Turbidité (NTU)	HACH	3.5	212	19
Chlorophylle a (µg/L)	EXO2	1.8	203	16
Cyanobactéries (µg/L)	EXO2	-0.2	36	0.5
fDOM	EXO2	5.6	130	51
COT (mg/L)	Pastel UV	1.5	21	5.1
NO3 (mg/L)	Pastel UV	0.2	39	0.2

Par ailleurs, des diagrammes radar (Figure 7) ont permis de mettre en évidence, pour chaque site, les distributions/rerelations entre les 5 paramètres illustrant des caractéristiques types : chlorophylle a, matière en suspension (Turbidité), matière organique (fDOM), sels dissous (conductivité) et oxygène dissous. Pour cela les données ont été normalisées par rapport à la concentration maximale, sauf pour la chlorophylle a et la turbidité qui ont été normalisées par rapport au percentile 95.

Les 22 sites présentent des compositions relatives assez variées, assurant ainsi une prise en compte représentative des potentiels facteurs pouvant avoir un impact sur la teneur en chlorophylle a dans les eaux.

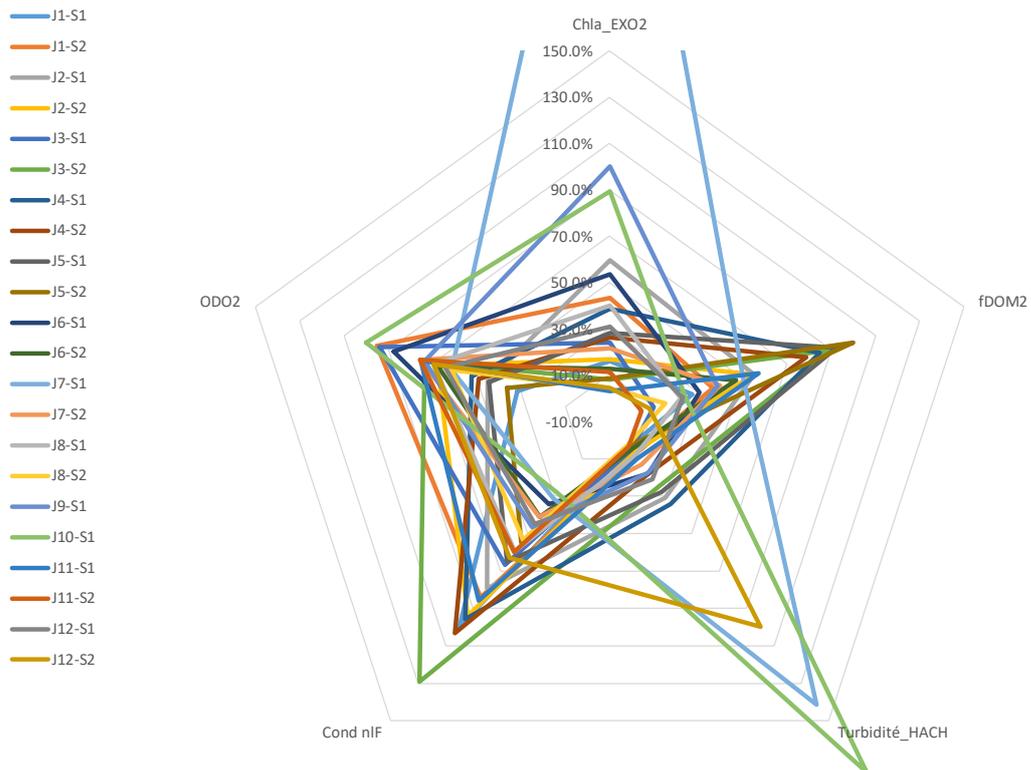


Figure 7 : Diagramme radar des concentrations relative en chlorophylle *a* (Chla_EXO2), oxygène dissous (ODO2) Conductivité (Cond nF), turbidité (Turbidité_HACH) et matière organique fluorescente (fDOM2), après normalisation des concentrations par rapport à la concentration maximale (sauf pour la chlorophylle *a* et Turbidité : percentile 95)

4.2 INCERTITUDE DE MESURE

L'incertitude de mesure a été estimée pour chaque paramètre et chaque méthode de mesure, à partir des données des 6 réplicats à T0 des 22 sites, en utilisant le logiciel RANOVA2 développé par la Royal Society of Chemistry.

Les incertitudes sont résumées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Incertitude de mesure élargie U (k=2) pour une sélection de paramètre / méthode de mesure

Paramètre	Appareillage	Type de méthode (NF T 90-117 ou mesure sur site)	U (k=2)
Chlorophylle totale	Spectrophotomètre de laboratoire	NF T 90-117	21 %
Chlorophylle a	Spectrophotomètre de laboratoire	NF T 90-117	21 %
	Sonde EXO2	mesure sur site	9.8 %
	Sonde ATo	mesure sur site	7.1 %
Turbidité	Appareil portable Hach	mesure sur site	9.7 %
	Sonde EXO2	mesure sur site	14 %
	Sonde ATo	mesure sur site	7.0 %
MES	Pastel UV	mesure sur site	8.4 %
fDOM	Sonde EXO2	mesure sur site	9.4 %
COT	Pastel UV	mesure sur site	6.2 %
Nitrates	Pastel UV	mesure sur site	6.5 %

L'incertitude de mesure calculée dans le cadre de cette étude pour la chlorophylle a selon la NF T 90-117 (U=21%, k=2) est cohérente avec les coefficients de reproductibilité obtenus lors de comparaisons interlaboratoires (CVR compris entre 9 et 22% en 2020-2021).

Les résultats mettent en exergue, pour la chlorophylle a, une différence notable des incertitudes de mesure entre la méthode en laboratoire NF T 90-117 qui est à 21% vis-à-vis des 10% max pour les méthodes de mesures sur site (sondes EXO2, ATo).

Cette différence est essentiellement due à la contribution des différentes étapes du processus d'analyse (filtration, extraction, analyse) dans le bilan de l'incertitude.

4.3 ETUDE DE STABILITE

Afin de comparer les résultats obtenus pour les 22 sites, une normalisation des données pour chaque site a été réalisée selon la méthode proposée dans la norme FD T90-240 :

- Calcul des concentrations moyennes à T0, T8 et T24 ;
- Calcul de l'erreur type (écart type sur \sqrt{n}) - en absolu et en relatif où n représente le nombre de répliquat ;
- Normalisation des concentrations moyennes par rapport à la moyenne T0.

L'écart maximal acceptable retenu pour juger de la stabilité est l'incertitude de mesure élargie (k=2) estimée à partir des données des 6 répliquas à T0 des 22 sites, en utilisant le logiciel RANOVA2 (chapitre 4.2).

L'instabilité est définie quand pour un site donné, la moyenne normalisée avec son erreur type (écart type sur \sqrt{n}) est en dehors de l'écart maximal acceptable, nommé également par la suite, en dehors des limites. Un exemple d'instabilité est illustré en Figure 8.

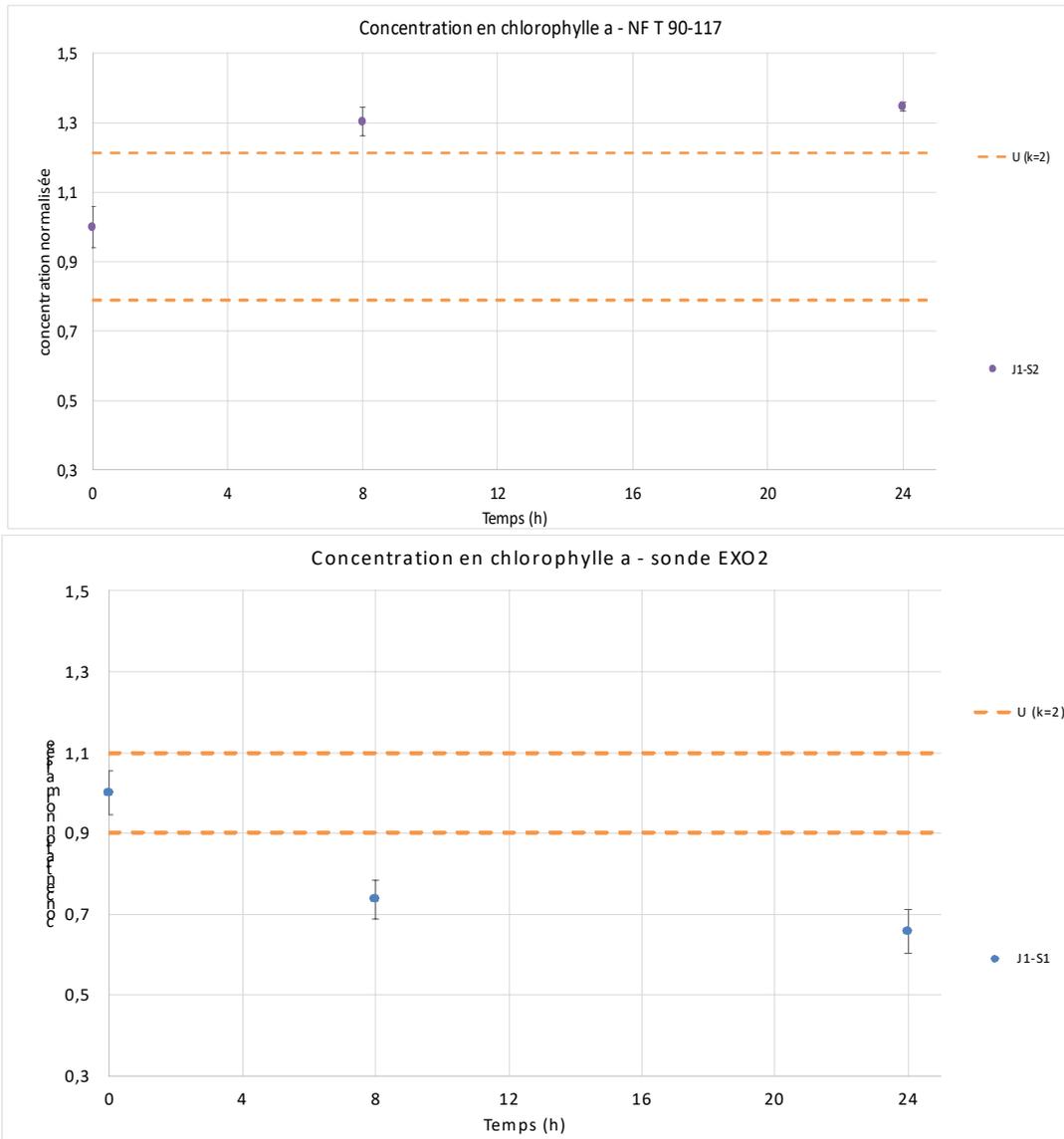


Figure 8 : Exemples d'instabilités observées - Concentration normalisée avec son erreur type à T8 et T24 en dehors de l'écart maximal acceptable (ici identifié en pointillé orange et correspondant à l'incertitude de mesure obtenue sur les 6 répliquas mesurés à T0)

4.3.1 CHLOROPHYLLE A

4.3.1.1 METHODE NF T 90-117

Les résultats de l'étude de stabilité pour la chlorophylle a et les phéopigments déterminés selon la norme NF T90-117 sont représentés dans les Figure 9 et Figure 10 ci-après.

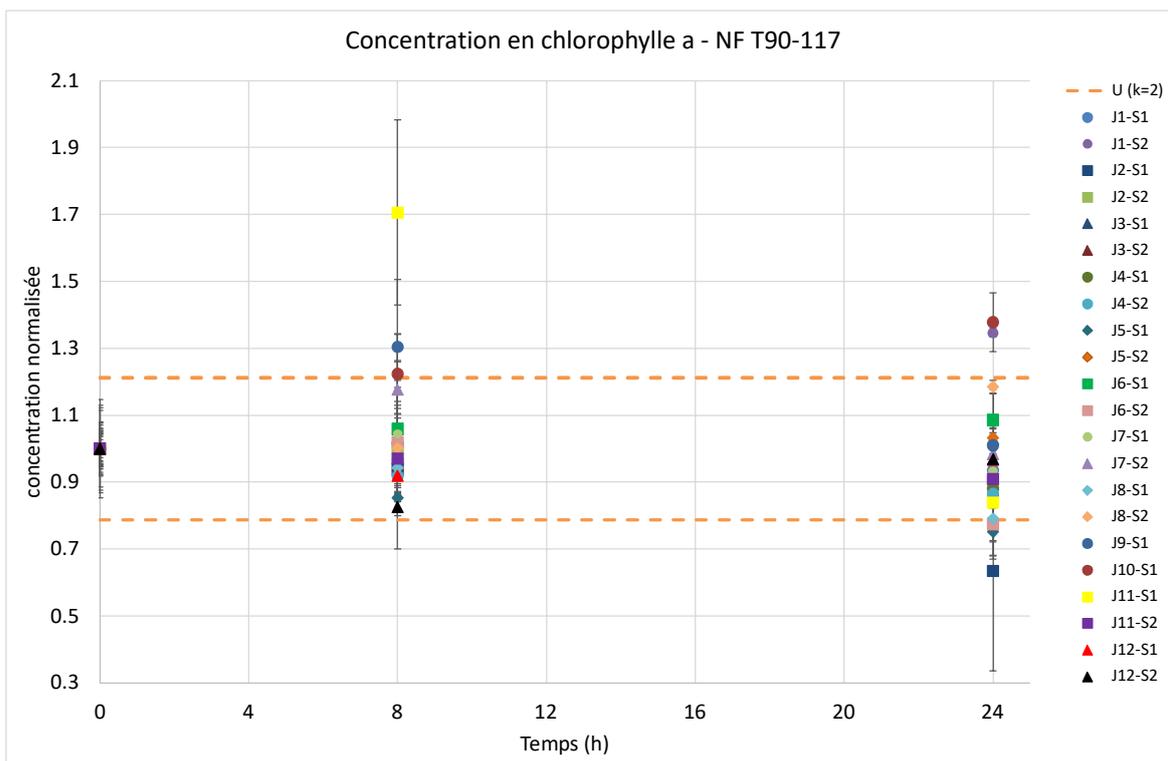


Figure 9 : Stabilité de la chlorophylle a, mesurée selon NF T90-117, pour les 22 échantillons testés. L'écart maximal acceptable, correspondant à l'incertitude de mesure élargie U (k=2) est visualisé par les pointillés orange

En ce qui concerne la stabilité de la chlorophylle a selon la norme NF T90-117, seuls 2 échantillons sur 22 sont hors des limites à T24 et sont de ce fait considérés comme instables. Il s'agit des échantillons J10-S1 et J1-S2.

Les deux échantillons (J11-S1 et J9-S1) qui se trouvent hors des limites retenues à T8 ne sont pas considérés comme instables car l'un des échantillons a une concentration proche de la limite de quantification (J11-S1) et l'autre échantillon est caractérisé par une valeur aberrante (J9-S1).

Tableau 6 : Concentration moyenne et écart type (absolu et relatif) des 6 réplicats à T0

Région	Site	Concentration moyenne à T0 en Chl a selon NF T90-117 (µg/L)	Ecart type relatif sur les 6 répliquas à T0 (%)
Nord-Picardie	J1-S1	8.6	12%
Nord-Picardie	J1-S2	35	14%
Nord-Picardie	J2-S1	47	13%
Nord-Picardie	J2-S2	17	18%
Nord-Picardie	J3-S1	18	5.6%
Nord-Picardie	J3-S2	1.5	27%
Nantes	J4-S1	27	18%
Nantes	J4-S2	16	12%
Nantes	J5-S1	21	4.8%
Nantes	J5-S2	27	1.1%
Nantes	J6-S1	32	12%
Nantes	J6-S2	13	15%
Chalons	J7-S1	339	15%
Chalons	J7-S2	24	12%
Chalons	J8-S1	55	18%
Chalons	J8-S2	5.1	31%
Chalons	J9-S1	68	12%
Saintes	J10-S1	273	30%
Saintes	J11-S1	1.5	27%
Saintes	J11-S2	6.5	11%
Saintes	J12-S1	19	12%
Saintes	J12-S2	2.9	14%

En ce qui concerne les phéopigments (Figure 10 ci-après), une instabilité est mise en évidence à T24, il s'agit de l'échantillon J10-S1, il était déjà à la limite de l'instabilité à T8. De même que pour la chlorophylle a, deux échantillons se trouvent hors des limites à T8 mais ne sont pas considérés comme instables car un des échantillons a une concentration proche de la limite de quantification (J11-S1) et l'autre échantillon est caractérisé par une valeur aberrante (J2-S1).

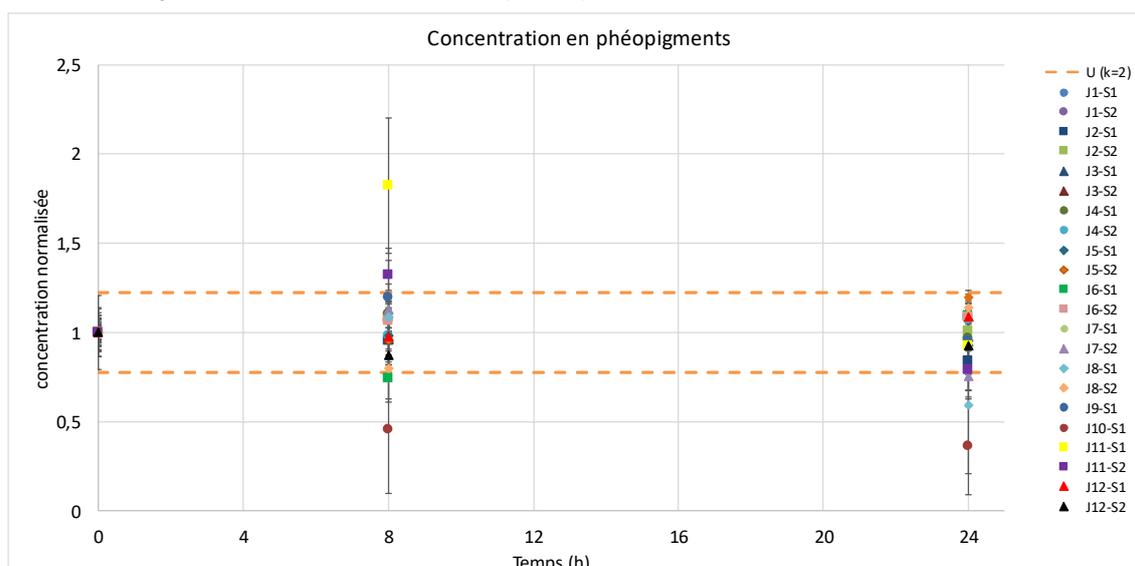


Figure 10 : Stabilité des phéopigments, mesurés selon NF T90-117, pour les 22 échantillons testés. L'écart maximal acceptable, correspondant à l'incertitude de mesure élargie U (k=2) est visualisé par les pointillés orange

A noter qu'il n'y a pas d'instabilité du ratio entre la chlorophylle a et les phéopigments à T8 et T24 hormis pour l'échantillon J10-S1 déjà identifié comme instable pour les paramètres chlorophylle a et phéopigments (

Annexe 3). Le ratio entre la chlorophylle a et les phéopigments est compris entre 0,73 et 1,3 à T8 et T24.

4.4 MESURES SUR SITE

Deux facteurs pouvant impacter la détermination de la chlorophylle a au laboratoire ont été évalués : le type de filtre et la nature du solvant d'extraction.

4.4.1 TYPE DE FILTRE

Dans la norme NF T90-117, deux types de filtres peuvent être utilisés : les filtres en fibre de verre borosilicaté et les filtres en acétate de cellulose.

Afin d'évaluer la faisabilité de la filtration sur site quel que soit le type de filtre, 7 échantillons ayant des concentrations en chlorophylle a comprises entre 3 et 120 µg/L ont été filtrés avec les deux types de filtre. Pour des raisons pratiques, notamment pour ne pas alourdir le nombre de filtration à T0 déjà élevé, les échantillons concernés étaient principalement des échantillons T8.

Les résultats montrent qu'il n'y a aucune différence statistique (test non paramétrique de Kruskal et Wallis entre les médianes au niveau de confiance de 95.0%) entre les échantillons filtrés avec l'un ou l'autre des types de filtres (Figure 11).

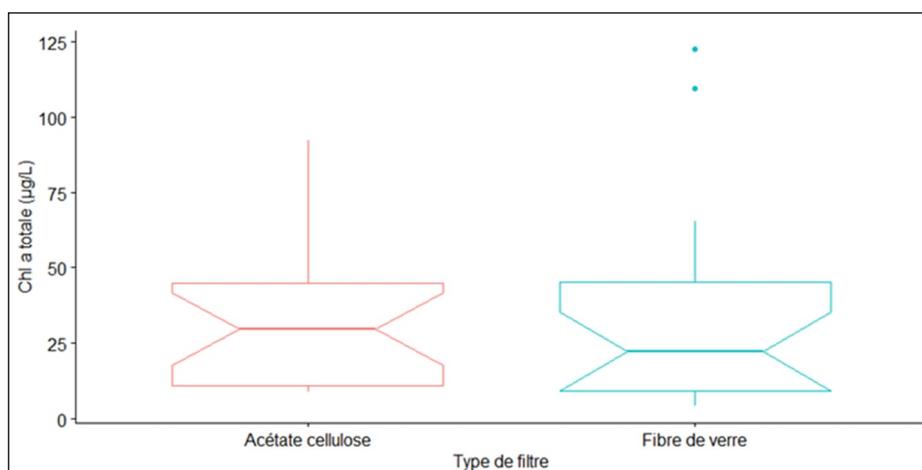


Figure 11 : Boîte à moustache avec encoches de la concentration totale (chlorophylle a et phéopigments) selon le type de filtre utilisé. Les encoches correspondent à une approximation de l'erreur associée à chaque médiane : si les encoches ne se chevauchent pas, les deux médianes sont significativement différentes au niveau de confiance

4.4.2 EFFET SOLVANT

Le solvant permettant d'extraire la chlorophylle a et les phéopigments dans la norme NF T90-117 est l'acétone à 90%. Au niveau international, le solvant utilisé dans la norme ISO 10260 est l'éthanol à 90% à chaud. De même dans le nouveau projet de norme WI 00230401 "Chlorophyll-a" soumis au CEN TC230, c'est aussi l'éthanol à 90 % à chaud qui est mis en œuvre.

Afin d'avoir un plus grand nombre de données, une campagne spécifique a été réalisée sur le bassin Seine Normandie (département de la Marne et de la Seine et Marne). Ainsi 14 échantillons au total ont été extraits avec les deux solvants.

Les spectres d'absorption entre 350 et 700 nm obtenus après extraction à l'acétone ou à l'éthanol à chaud sont très similaires, comme le montre la Figure 12.

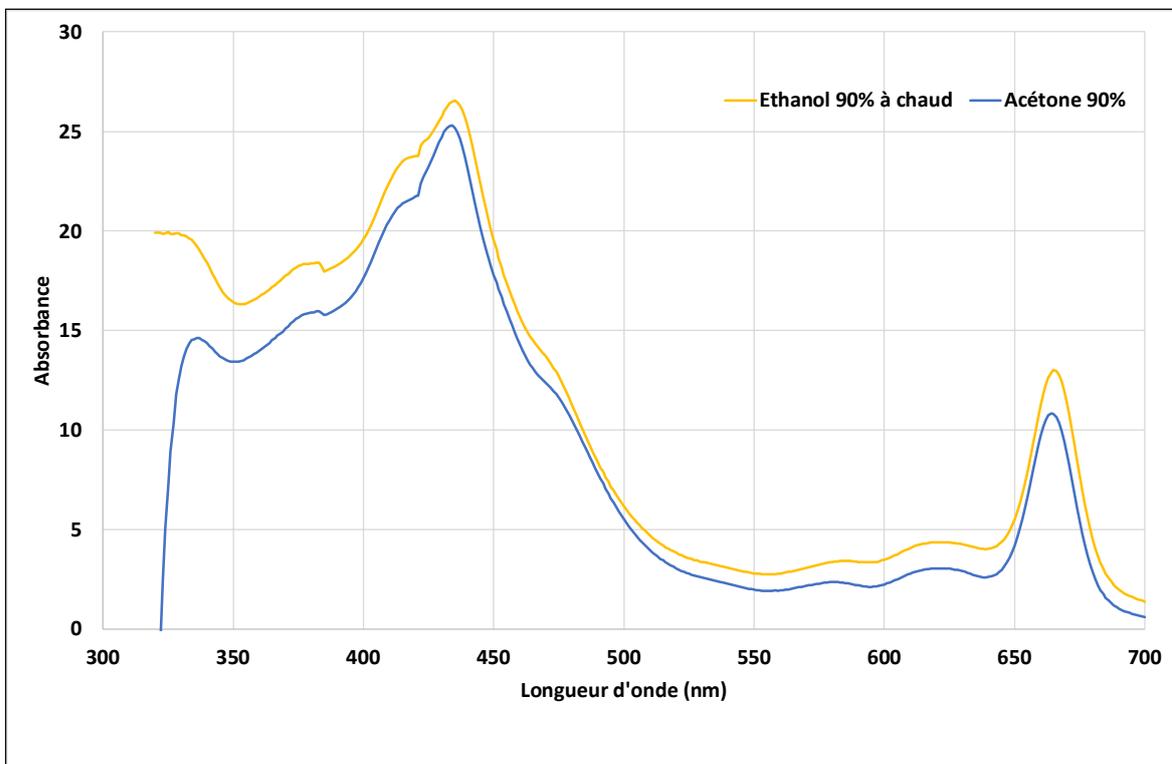


Figure 12 : Comparaison des spectres d'absorption entre 300 et 700 nm selon le solvant d'extraction utilisé

Les résultats montrent qu'il n'y a globalement aucune différence statistique (test non paramétrique de Kruskal et Wallis entre les médianes au niveau de confiance de 95.0%) entre les échantillons extraits avec l'un ou l'autre des solvants (Figure 13).

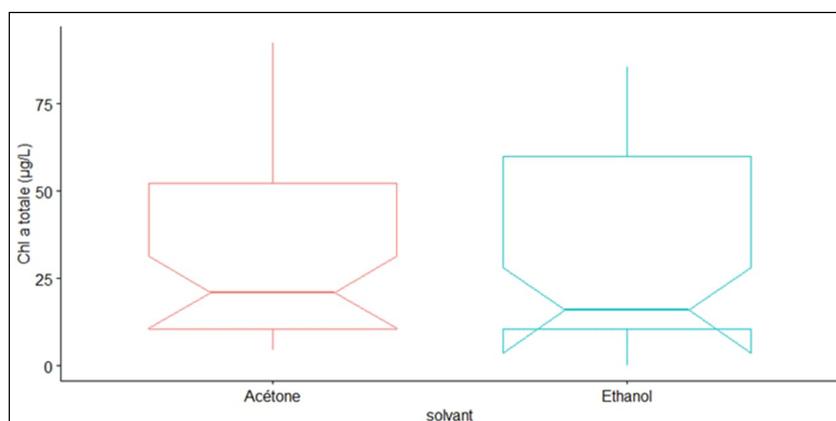


Figure 13 : Boîte à moustache avec encoches de la chlorophylle totale (chlorophylle a et phéopigments) selon le type de solvant d'extraction utilisé. Les encoches correspondent à une approximation de l'erreur associée à chaque médiane : si les encoches ne se chevauchent pas, les deux médianes sont significativement différentes au niveau de confiance

Si les différentes régions (Charente Maritime, Nord, Marne, Ile de France et Saône) sont considérées individuellement (Figure 14), on observe uniquement des différences statistiques significatives selon les solvants mis en œuvre sur les échantillons Ile de France, pour les autres régions, les résultats obtenus sont statistiquement équivalents.

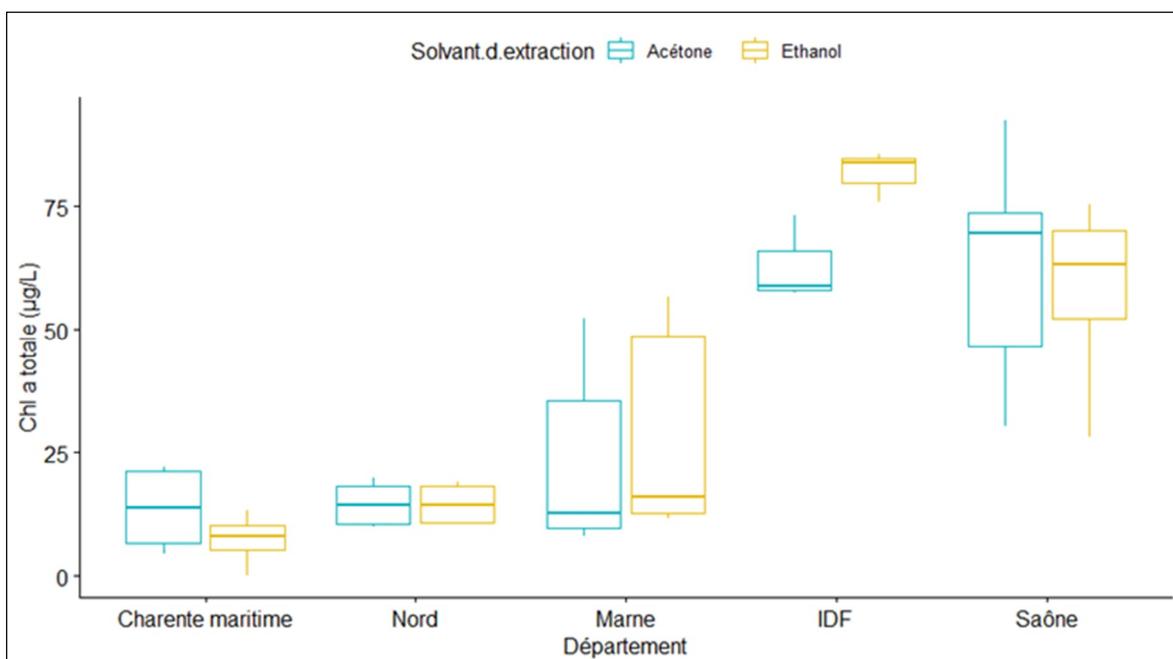


Figure 14 : Boîte à moustache avec encoches de la chlorophylle totale (chlorophylle a et pheopigments) par région étudiée et selon le type de solvant d'extraction utilisé

5 CONCLUSIONS

Une étude sur les conditions de conservation et notamment sur le délai entre l'échantillonnage et la filtration des eaux superficielles continentales en vue de la détermination de la chlorophylle a a été conduite en 2019 et 2020. L'objectif principal de cette étude était de préciser les bonnes pratiques pour l'analyse de la chlorophylle a par la méthode de laboratoire en statuant sur le délai à respecter entre l'échantillonnage et la filtration.

La méthode de laboratoire évaluée est la méthode de référence NF T 90-117. Le principe de méthode est basé sur la mesure de l'absorbance à des longueurs ondes prédéfinies après filtration et extraction des pigments au moyen d'un solvant.

Cette étude a été réalisée sur 22 stations de mesures réparties sur 4 bassins hydrographiques différents. Le protocole mis en œuvre est basé sur une approche pseudo chronologique (FD T 90-240). Il a consisté à prélever sur chaque site un volume d'eau suffisant pour pouvoir réaliser au temps T=0, 6 filtrations ou mesures sur site puis au pas de temps T=8 heures, 3 filtrations ou mesures au local du préleveur sur le même échantillon et au pas de temps T=24 heures, 3 filtrations ou mesures à réception au laboratoire d'analyse. Entre les différents pas de temps, les échantillons d'eau ont été conservés entre +2 et +8°C. Les filtres ont été conservés dans un congélateur ayant la capacité de maintenir la température interne à -18°C. Ils ont été extraits et analysés dans la même série analytique pour chaque campagne en mettant en œuvre la norme NF T 90-117.

En complément, deux facteurs potentiellement influents sur la détermination de la chlorophylle a par la méthode NF T 90-117 ont également été évalués : la nature du filtre utilisé (filtre en fibre de verre ou filtre en acétate de cellulose) et le solvant d'extraction (acétone ou éthanol à chaud). Les essais réalisés mettent en évidence que les résultats sont statistiquement identiques (aucune différence statistique entre les médianes au niveau de confiance de 95% entre les échantillons).

Par ailleurs des mesures à l'aide d'une méthode alternative (mesures sur site) pour la chlorophylle a et à l'aide d'appareils de mesure de terrain (HACH et Pastel UV) pour la détermination de la turbidité, des matières en suspension, de la matière organique fluorescente et du carbone organique total ont été réalisés sur les mêmes échantillons aux différents pas de temps (T0, T8 et T24).

L'exploitation de la stabilité a été effectuée suivant la norme FD T 90-240. Une normalisation des données pour chaque site et chaque méthode a été réalisée et il a été retenu, comme écart maximal acceptable pour juger de la stabilité, l'incertitude de mesure élargie (k=2) estimée à partir des données mesurées sur le 6 répliquats au pas de temps T=0.

Il en ressort que l'écart maximal acceptable (incertitude de mesure élargie) est variable selon la méthode de mesure mise en œuvre. Elle est de 21% pour la détermination de la chlorophylle a par la méthode NF T 90-117 et entre 7% et 10% par les méthodes de mesure sur site (ATo et EXO2), ce qui conduit à des conclusions différentes sur la stabilité selon les méthodes mises en œuvre.

Le Tableau 7 dresse le bilan de l'étude de stabilité réalisée sur la chlorophylle a (méthode en laboratoire (NF T 90-117) et mesure sur site (sondes multi-paramètres (EXO2 et ATo)), ainsi que sur les paramètres suivants : turbidité, matières en suspension, matière organique fluorescente et carbone organique total.

Tableau 7 : Bilan de l'étude de stabilité réalisée sur la chlorophylle a, la turbidité, les matières en suspension, la matière organique fluorescente et le carbone organique total

Paramètre	Appareillage	Méthode de mesure	Ecart maximal autorisé : U (k=2)	Nb d'échantillons jugés instables à T24	Commentaires
Chlorophylle a	Spectrophotomètre de laboratoire	NF T90-117	21 %	2	Dispersion variable entre les différents échantillons
Chlorophylle a	EXO2	mesure sur site	9.8 %	6	Dispersion faible et constante
Chlorophylle a	ATo	mesure sur site	7.1%	7	Dispersion faible et constante
Turbidité	HACH	mesure sur site	9.7 %	11	Dispersion faible et constante
MES	Pastel UV	mesure sur site	8.4 %	8	Dispersion faible et constante
fDOM	EXO2	mesure sur site	9.4 %	0	Dispersion faible et constante
COT	Pastel UV	mesure sur site	6.2 %	8	Dispersion faible et constante

Les résultats de l'étude de stabilité montrent que :

- La filtration, des échantillons en vue de la détermination de la chlorophylle a selon la méthode NF T 90-117, qu'elle soit réalisée au pas de temps T0 ou T8 ou T24 n'impacte pas la concentration en chlorophylle a. Seulement 2 échantillons sur les 22 analysés présentent une instabilité au bout de 24 heures. Cette stabilité dépend de l'écart maximal acceptable retenu pour juger de la stabilité (ici incertitude de mesure élargie). Plus cet écart est important, plus les échantillons seront jugés stables. La norme NF T 90-117 ayant une incertitude de mesure élevée (21% à k=2), l'instabilité est de ce fait masquée. Par contre, une instabilité est mise en évidence avec les méthodes de mesures sur site (EXO2 et ATo).
- La mesure sur site, de la détermination de la chlorophylle a, à l'aide des sondes multiparamètres (EXO2 et ATo) montre une instabilité de la concentration en chlorophylle a au pas de temps T8 et T24. 6-7 échantillons sur les 22 analysés présentent une instabilité au bout de 8 heures et 24 heures. Cette instabilité est liée à la performance de la méthode (incertitude de mesure de la méthode sur site 2 à 3 fois plus faible que l'incertitude de mesure de la méthode NF T 90-117).
- Quant à la mesure de la turbidité, les résultats montrent que la teneur en turbidité n'est pas stable aux différents pas de temps. 11 échantillons sur les 22 analysés présentent une instabilité. La déviation maximale atteint 43%.

Au regard des résultats de l'étude de stabilité, la filtration des échantillons suivant la méthode NF T 90-117 peut être réalisée à réception au laboratoire soit 24 heures après échantillonnage si les bonnes pratiques de conservation sont respectées (remplissage à ras bord, réfrigération, protection de la lumière).

Quant à la méthode « mesure sur site » mise en œuvre à l'aide de sondes multi-paramètres (EXO2 et ATo), les résultats sont différents et montrent une instabilité de la concentration de la chlorophylle a entre T0 et T24. Cette instabilité est mise en évidence en raison d'un écart maximal acceptable moindre (incertitude de mesure plus faible que celle estimée pour la méthode de laboratoire (norme NF T 90-117)). L'intérêt de cette méthode « mesure sur site » est d'avoir une mesure immédiate, de plus elle est caractérisée par une plus faible incertitude de mesure. Par contre, à ce jour, cette méthode « mesure sur site » n'est pas normée.

Pour le paramètre turbidité, quant à lui, afin d'éviter toute évolution de l'échantillon au cours du temps, c'est-à-dire entre l'échantillonnage et la réception au laboratoire (24h plus tard), il est fortement recommandé de réaliser la mesure de turbidité sur site. Ce constat rejoint les recommandations émises par la Norme NF EN ISO 5667-3. La mesure de turbidité est déjà à réaliser sur site en contexte « eau souterraine ».

Ces recommandations seront intégrées dans les guides Aquaref « Echantillonnage cours d'eau » et « plan d'eau » et valorisées au sein de la normalisation française et européenne.

6 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

NF T 90-117 : Qualité de l'eau - Dosage de la chlorophylle a et d'un indice phéopigments - Méthode par spectrométrie d'absorption moléculaire.

Protocole standardisé d'échantillonnage et de conservation du phytoplancton en grands cours d'eau applicable aux réseaux de mesure DCE - CEMAGREF DREAL Lorraine - site ONEMA - Décembre 2010

JAMP 2012: JAMP Eutrophication Monitoring Guidelines: Chlorophyll a in Water

AQUAREF 2017 - Opérations d'échantillonnage d'eau en cours d'eau dans le cadre des programmes de surveillance DCE - Recommandations techniques - Edition 2017

AQUAREF 2017 - Opérations d'échantillonnage d'eau en plan d'eau dans le cadre des programmes de surveillance DCE - Recommandations techniques - Edition 2017

AQUAREF 2016 - Lignes directrices pour la conduite et la validation d'études de stabilité des paramètres physico-chimiques dans le domaine de l'eau

ISO/DTS 5667-25 - Qualité de l'eau – Échantillonnage – Partie 25 : Lignes directrices pour la validation de la durée de conservation des échantillons d'eau

FD T90-240 : Lignes directrices pour la conduite et la validation d'études de stabilité des paramètres physico-chimiques dans le domaine de l'eau

FD T90-523-1 - Qualité de l'eau - Guide d'échantillonnage pour le suivi de la qualité des eaux dans l'environnement - Partie 1 : échantillonnage d'eau en rivières et canaux

Yéprémian, C., Catherine, A., Bernard, C., Congestri, R., Elersek, T. et Pilkaityte, R. (2016). Chlorophylle a Extraction et détermination. Dans Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis (éd. J. Meriluoto, L. Spoof et G.A. Codd). <https://doi.org/10.1002/9781119068761.ch34>

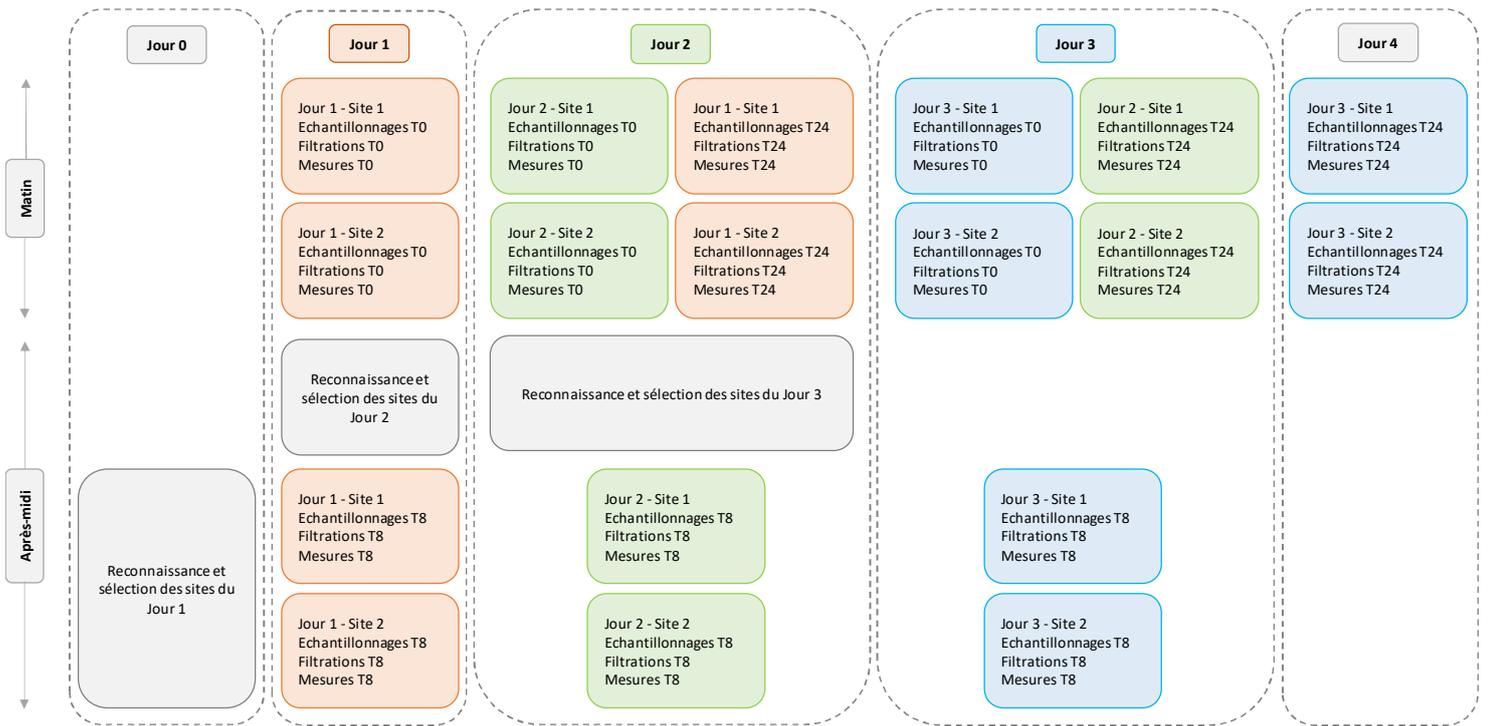
RANOVA2 : Macro Excel de la Royal Society of Chemistry, UK accessible sur <https://www.rsc.org/membership-and-community/connect-with-others/through-interests/divisions/analytical/amc/software/>

ISO 10260: Water quality – Measurement of biochemical parameters – Spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration

Annexe 1 : Liste des sites étudiés

Bassin hydrographique	Sites étudiés
Artois-Picardie	Mortagne du Nord (59158), auberge du bord de l'eau
	Hernies (59199), étang d'Amaury, canal du Jard
	Bergues (59380), porte de Bierne
	Coudekerque village (59380), canal de Bergues, base nautique
	Abbeville (80100), parc de la Bouvaque
	Le Crotoy (80550), étang de la Bassée
Loire-Bretagne	Saint-Mars-de-Coutais (44680), le Tenu
	Port-Saint-Père (44710), Port de la Morinière
	Pont-Saint-Martin (44860), l'Ognon
	Aigrefeuille-sur-Maine (44140), étang
	Saint-Philbert-de-Grand-Lieu (44310) Parc de la Boulogne, Base de loisirs
	Vertou (44120), Quai de la Chaussée des Moines, Sèvre Nantaise
Rhône-Méditerranée-Corse	Epervans (71380), la Prare
	Marnay (71240), la Grosne
	Sornay (71500), Route des Branges
	Vincelles (71500), la Seille
	L'Abergement-Sainte-Colombe (71370), étang la Colombe
Adour-Garonne	Saint Georges des Coteaux (17810), étangs
	Pont l'abbé d'Arnoult (17250), Aire détente et pêche
	Lac de Trizay (17250)
	Le Mung (17350), Ile de la grenouillette, la Charente
	Le Mung (17350), la Charente

Annexe 2 : Organisation générale d'une campagne d'échantillonnage : région Artois Picardie



Annexe 3 : Ratio phéopigments vs Chlorophyll a - Norme NF T 90-117

