

Direction de l'Environnement et de l'Aménagement Littoral
Laboratoire d'Arcachon

Isabelle AUBY
Danièle MAURER
Nadine MASSON
Florence D'AMICO
Danièle DEYNU
M-Pierre TOURNAIRE
Gilles TRUT
Christian CANTIN
Claude PELLIER

Juillet 2000

Etude des causes du faible captage de naissain d'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon en 1998

Annexes



**ANNEXE 1 RESULTATS DES COMPTAGES LARVAIRES DANS LES
SECTEURS EST ET OUEST DU BASSIN ENTRE 1988 ET 1999.....4**

**ANNEXE 2 LOCALISATION DES STATIONS DE PRELEVEMENT DU RESEAU
HYDROLOGIQUE TEMPERATURES DE L'EAU MESUREES EN CONTINU A
L'EXTREMITE DE LA JETEE D'EYRAC AU COURS DES ETES 1998 ET 1999. 20**

**ANNEXE 3 METHODES D'ANALYSE DES PESTICIDES. (GIRPA –
BEAUCOUZE)23**

**ANNEXE 4 RESULTATS DES ANALYSES DE PESTICIDES DANS LES COURS
D'EAU ET DANS LE BASSIN D'ARCACHON PENDANT L'ETE 1999.....43**

**ANNEXE 5 ANALYSE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES
POLYCYCLIQUES CONTENUS DANS DES ECHANTILLONS D'EAUX DU
BASSIN D'ARCACHON. ECOTOXICITE DES HAP SUR LES LARVES DE
BIVALVES49**

ANNEXE 655

Annexe 1

**Résultats des comptages larvaires dans les secteurs
est et ouest du Bassin entre 1988 et 1999.**

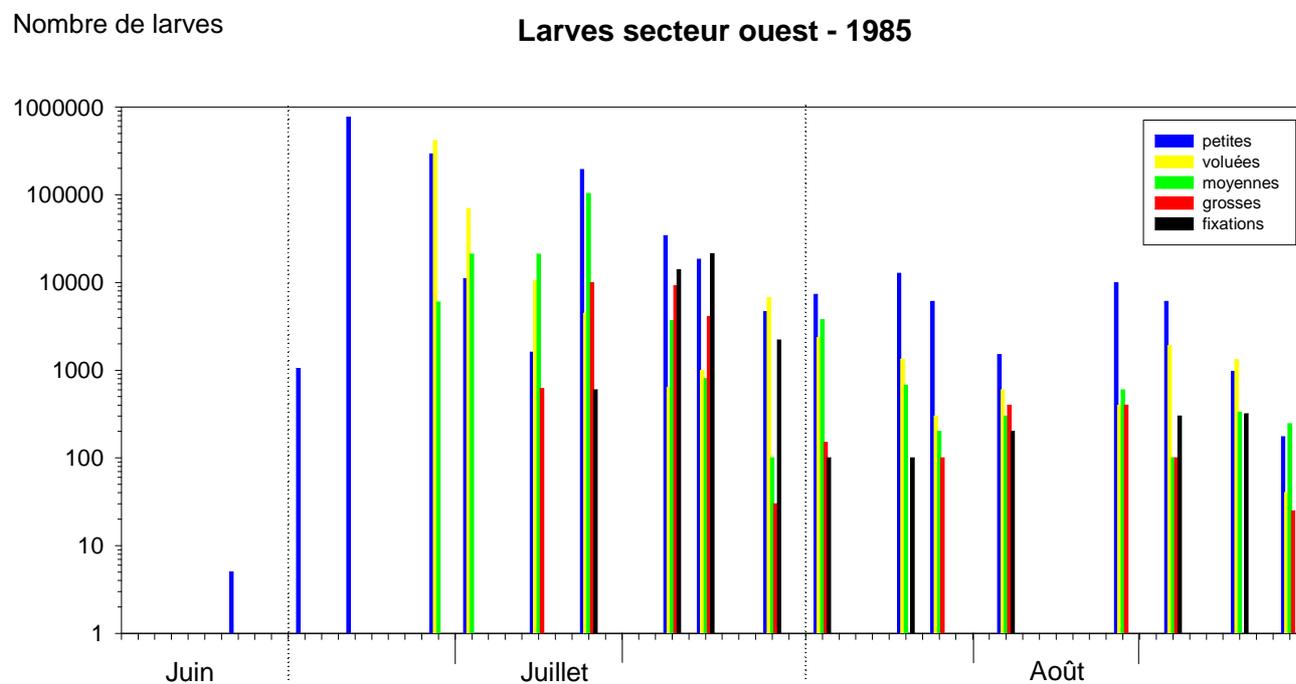
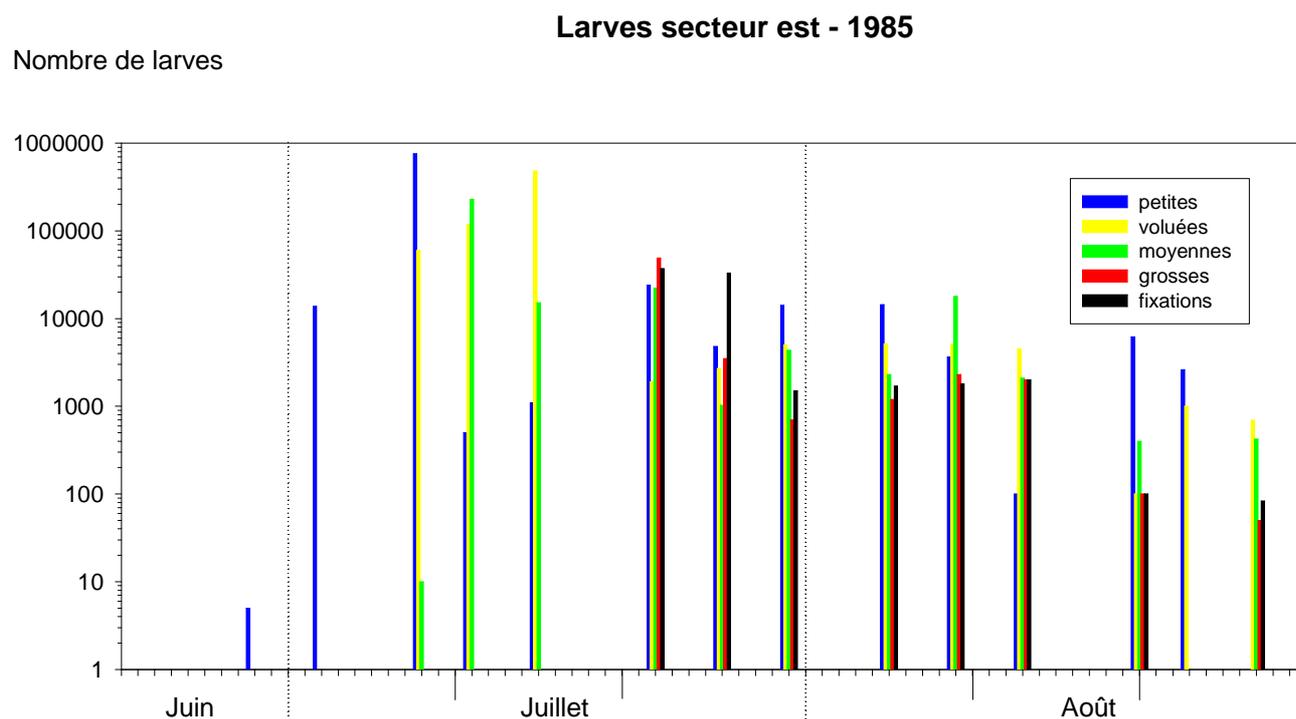


Figure A : Résultats des comptages larvaires dans les secteurs est et ouest du Bassin en 1985.

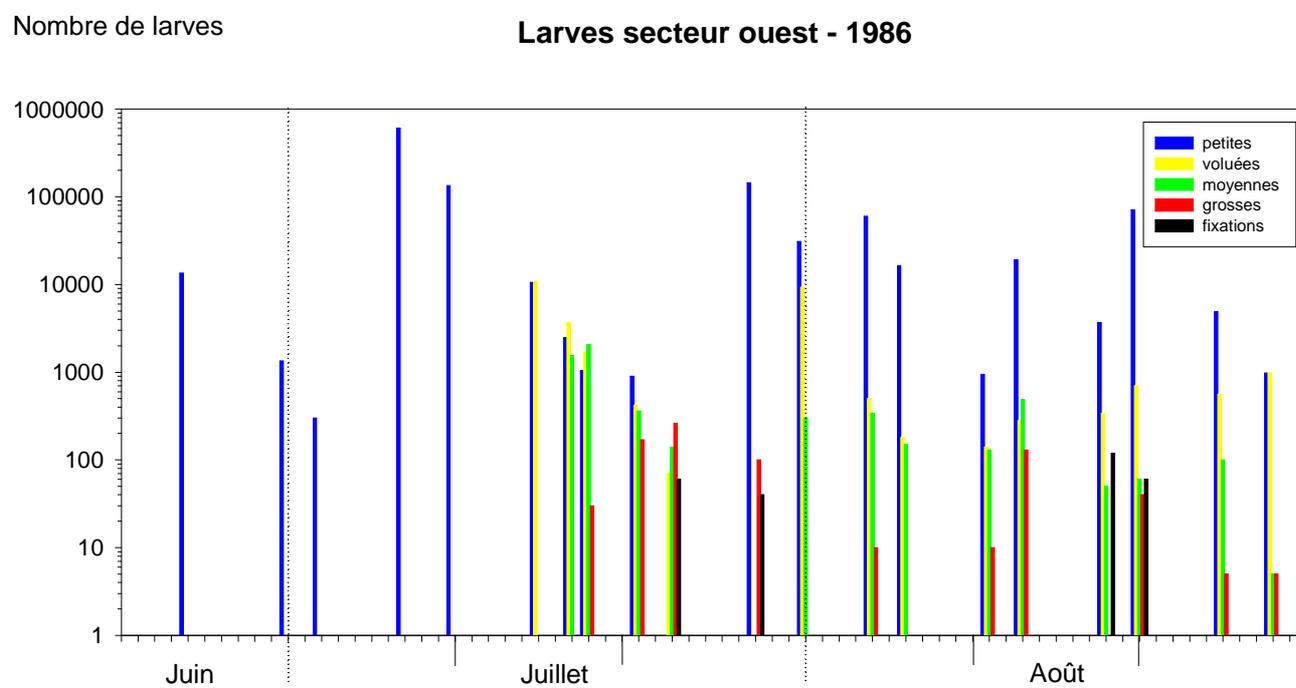
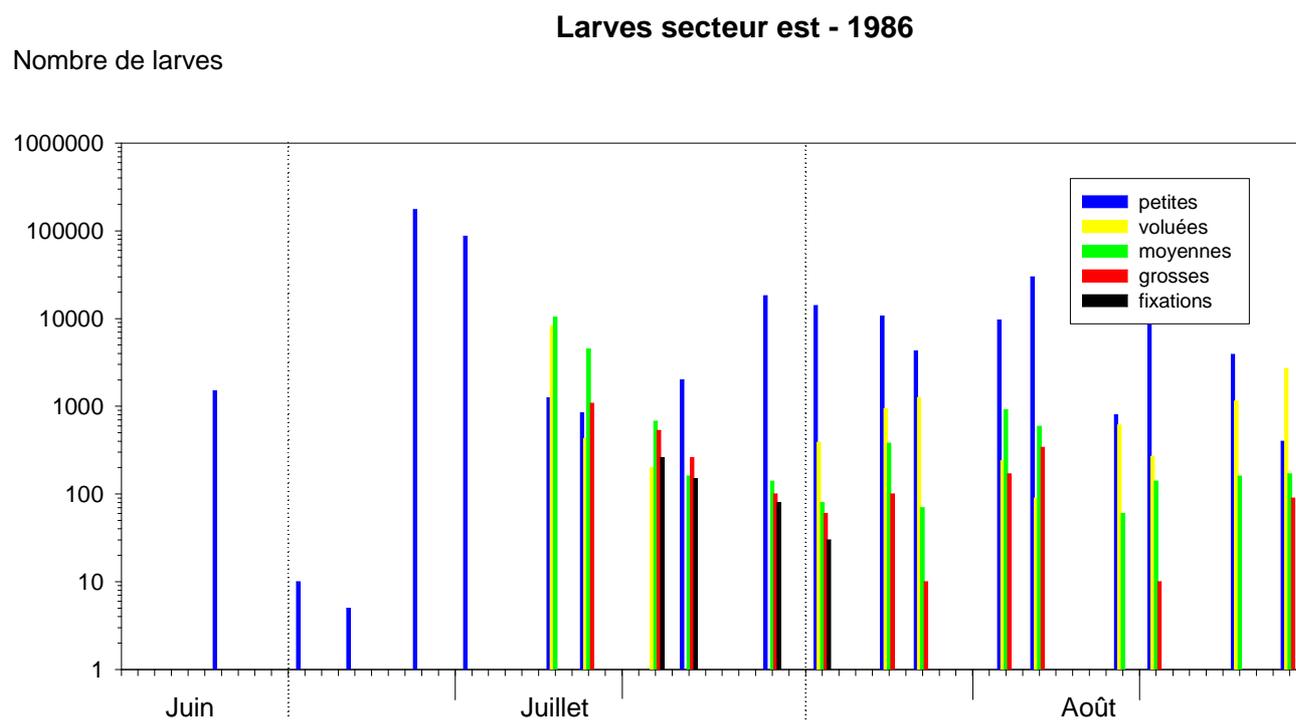


Figure B : Résultats des comptages larvaires dans les secteurs est et ouest du Bassin en 1986.

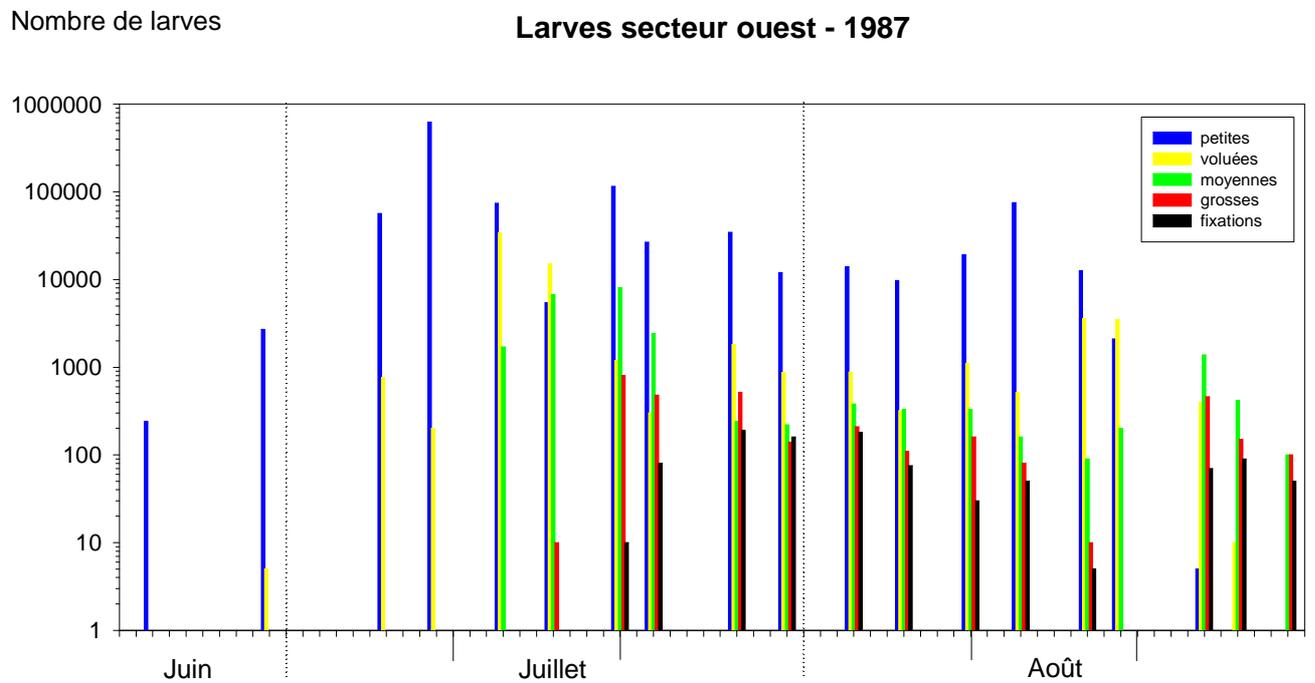
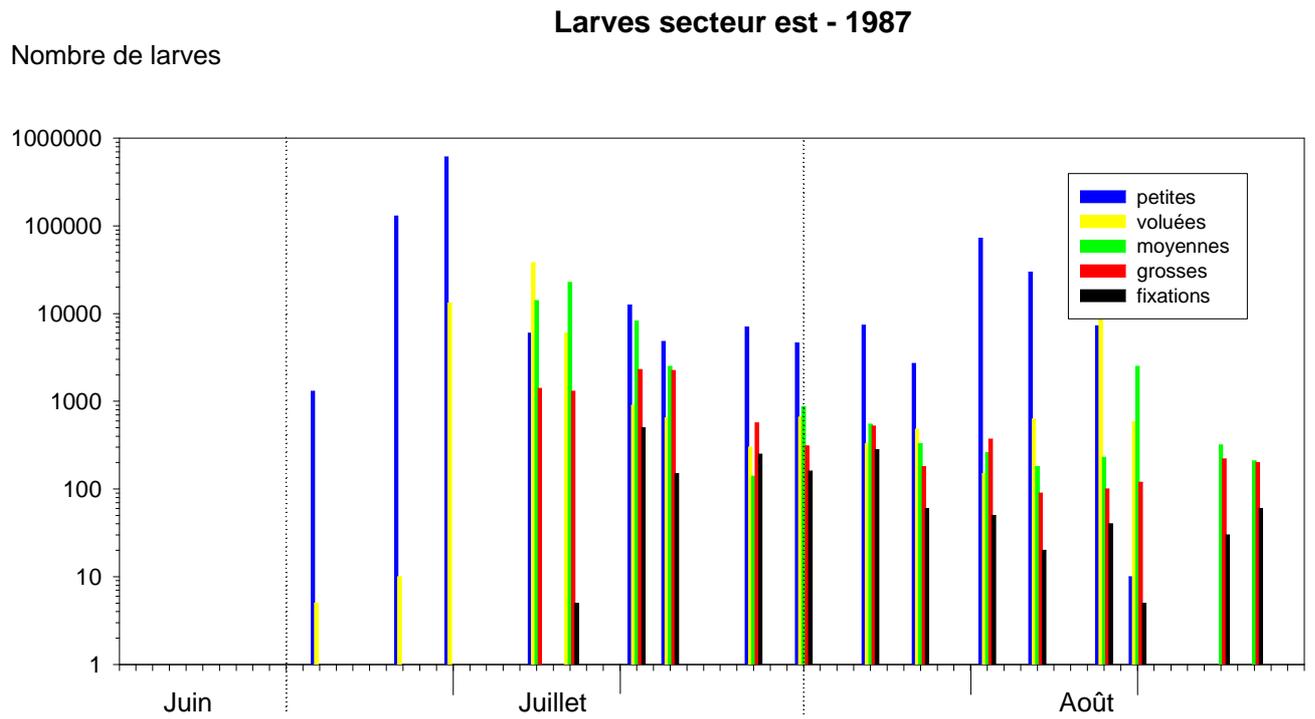


Figure C : Résultats des comptages larvaires dans les secteurs est et ouest du Bassin en 1987.

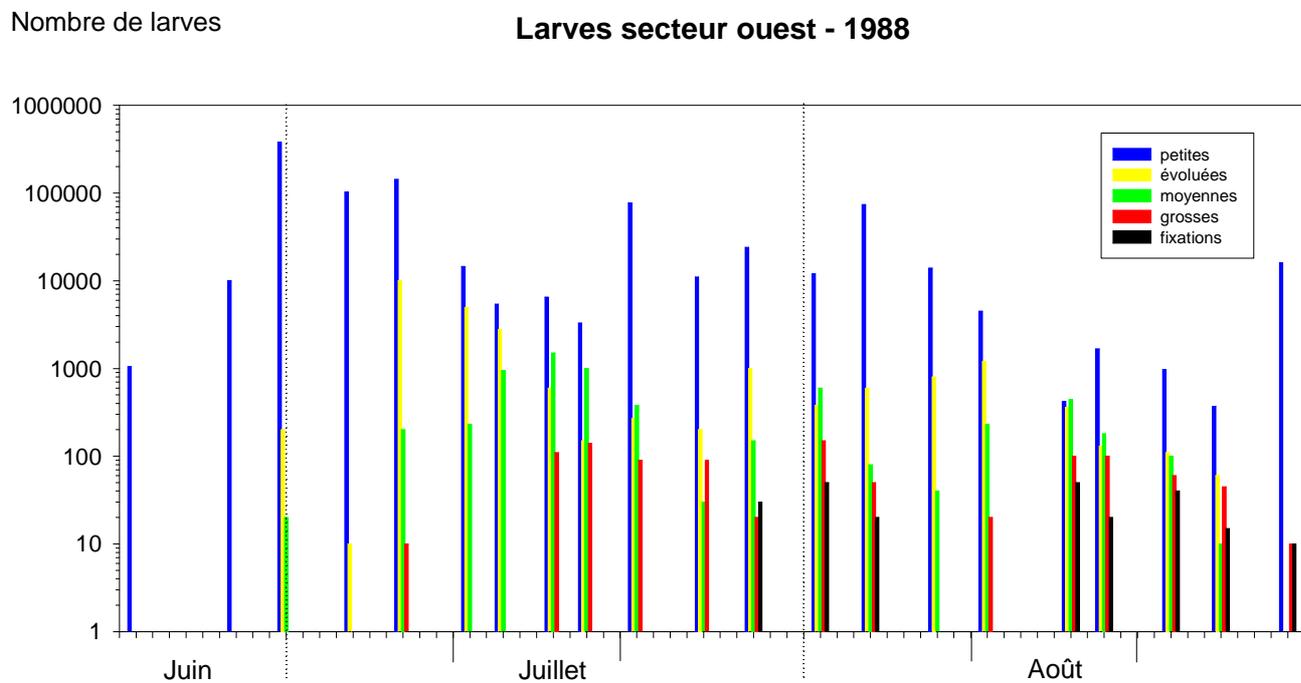
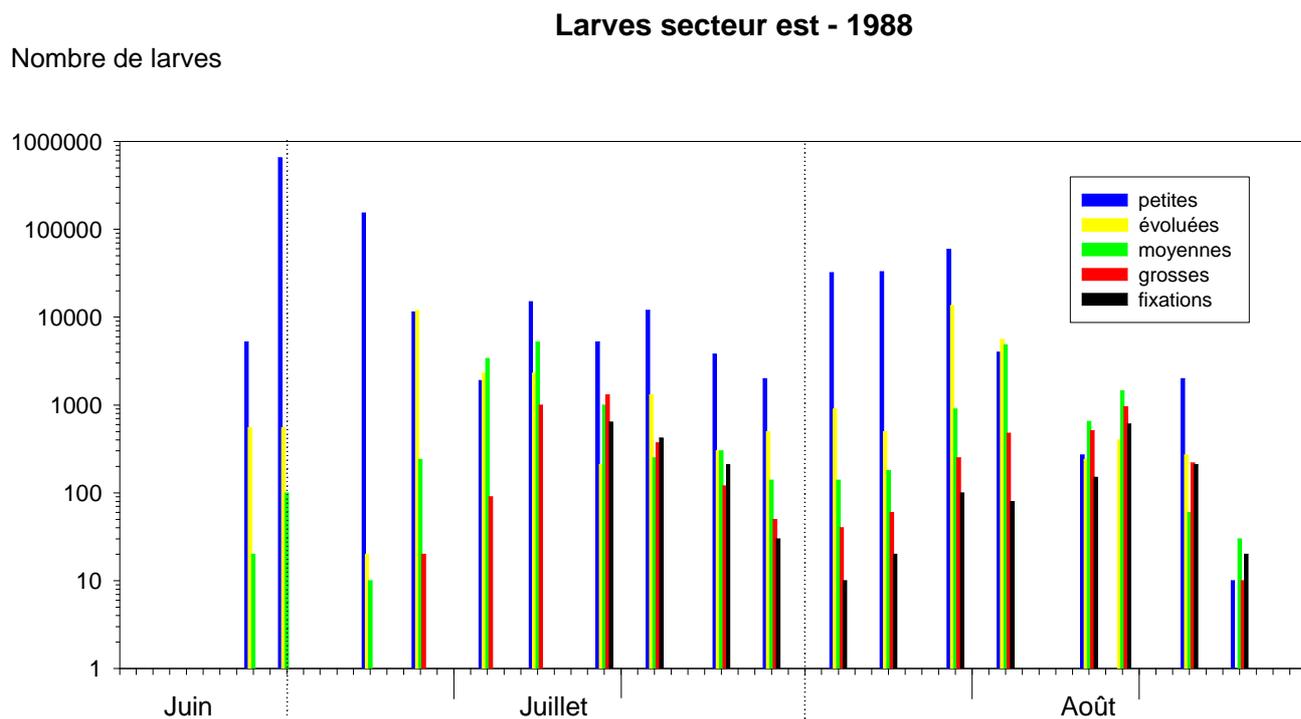
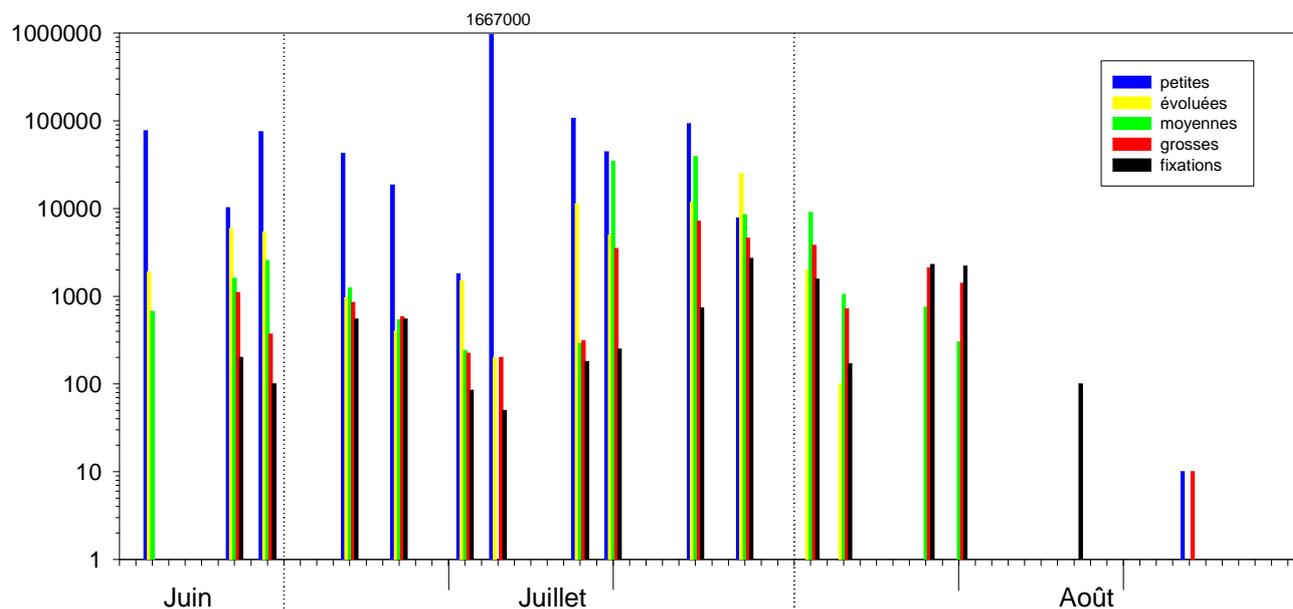


Figure D : Résultats des comptages larvaires dans les secteurs est et ouest du Bassin en 1988

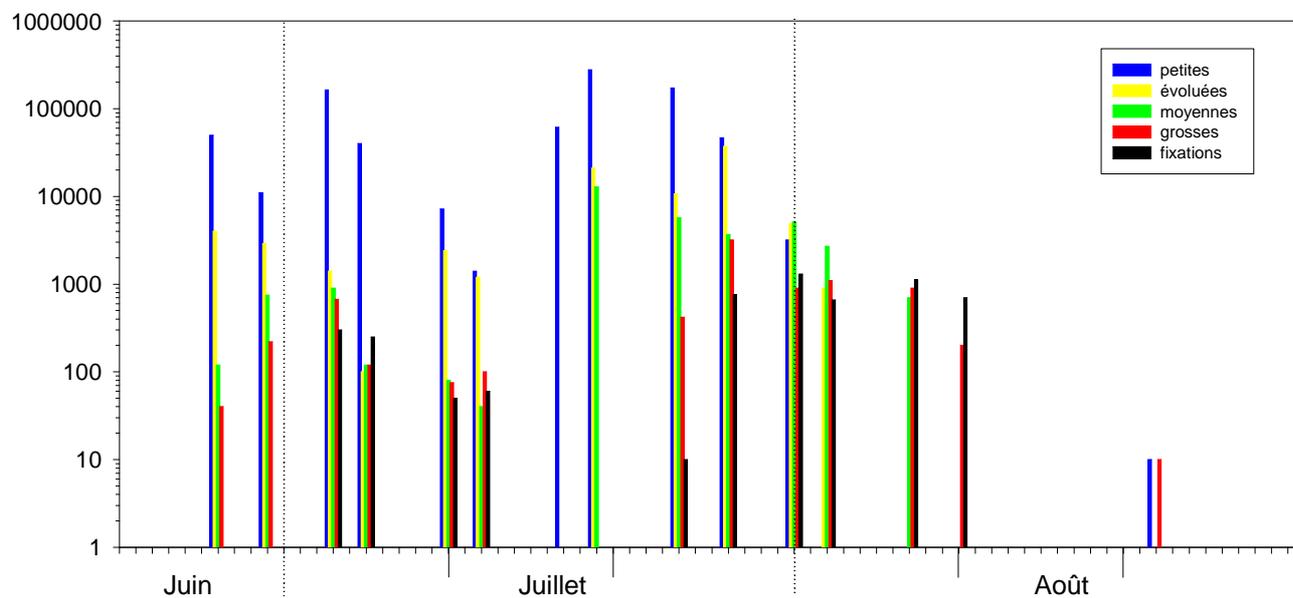
Nombre de larves

Larves secteur est - 1989



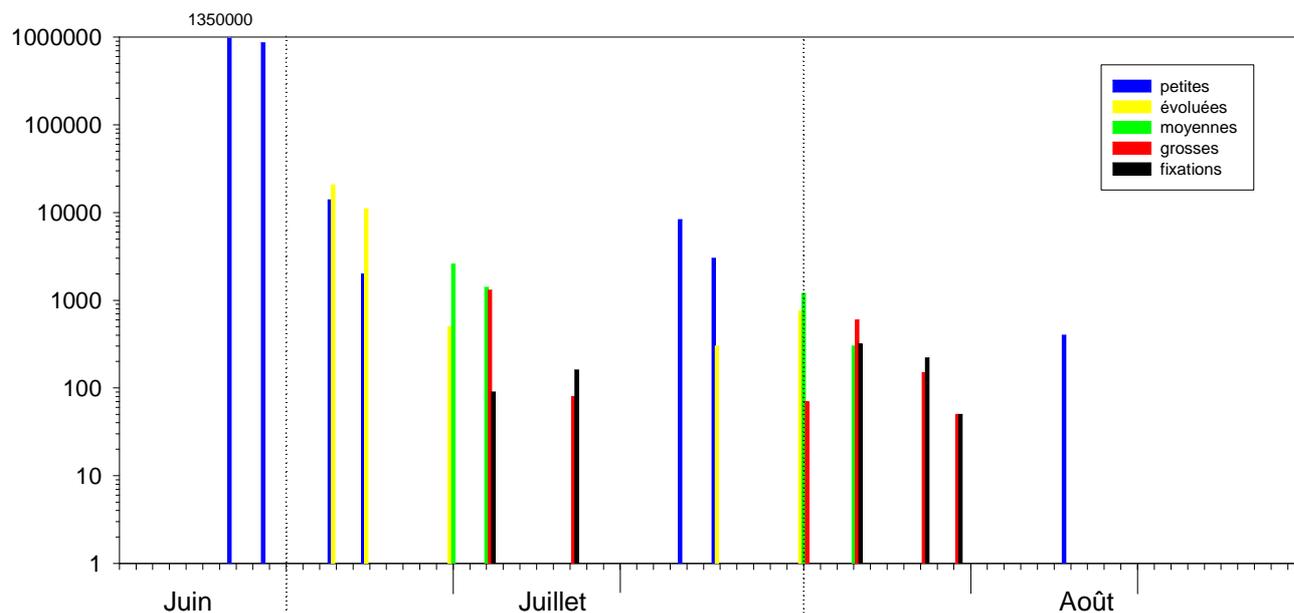
Nombre de larves

Larves secteur ouest - 1989



Nombre de larves

Larves secteur est - 1990



Nombre de larves

Larves secteur ouest - 1990

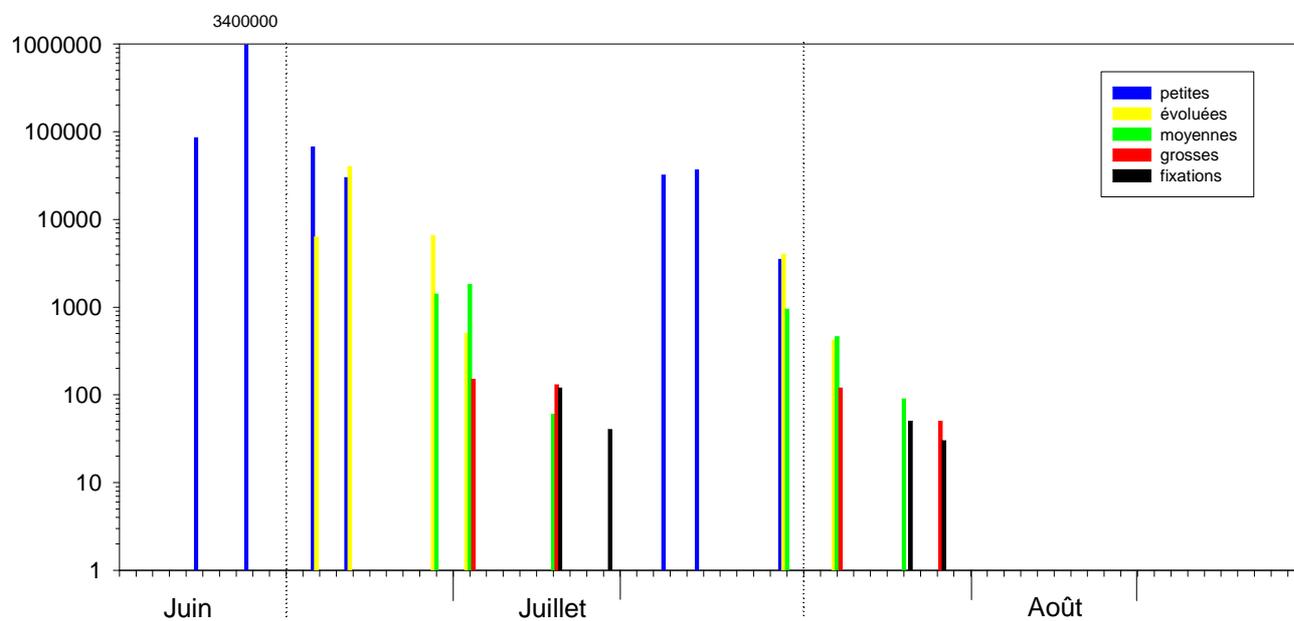
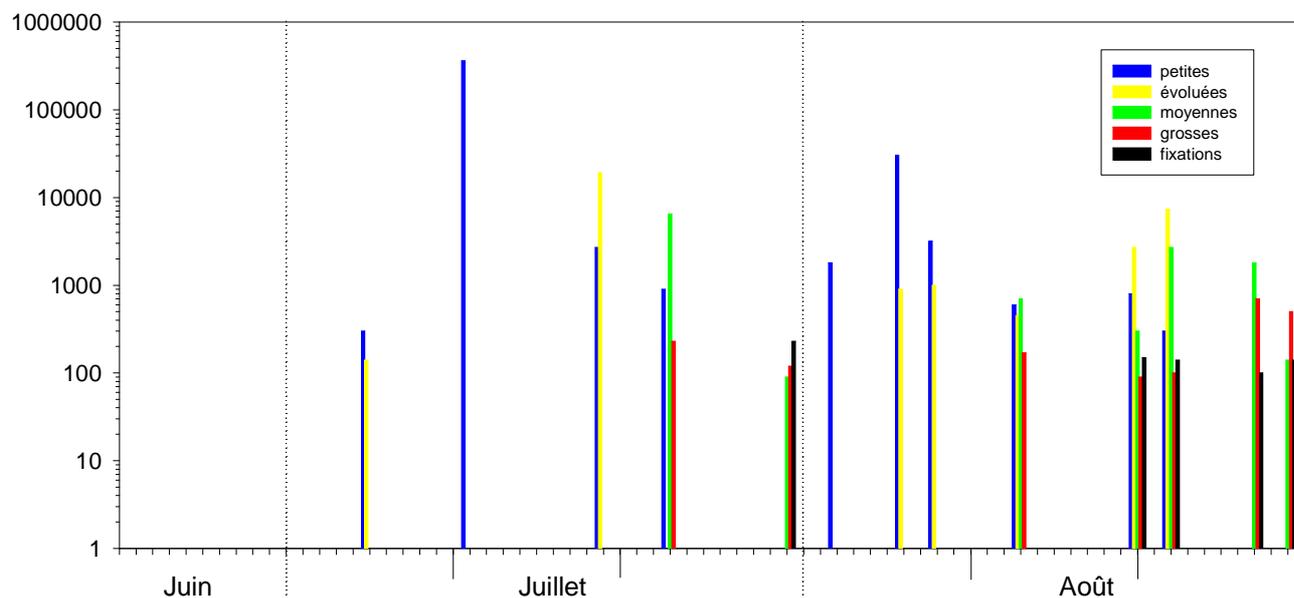


Figure F : Résultats des comptages larvaires dans les secteurs est et ouest du Bassin en 1990.

Nombre de larves

Larves secteur est - 1991



Nombre de larves

Larves secteur ouest - 1991

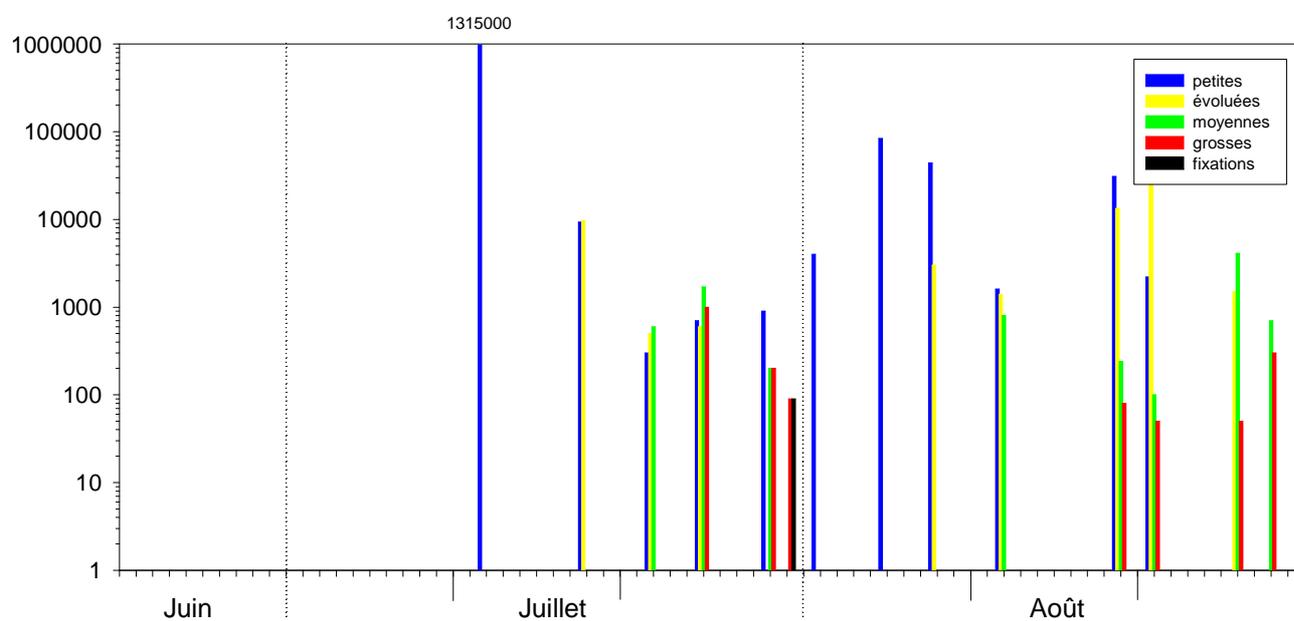
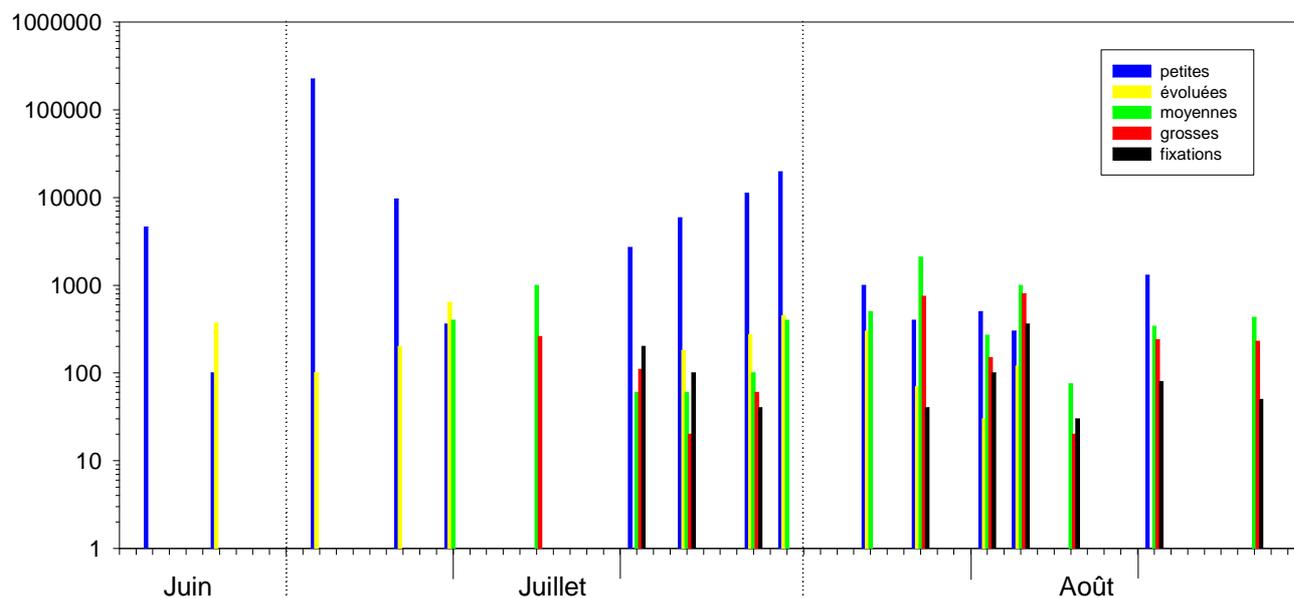


Figure G : Résultats des comptages larvaires dans les secteurs est et ouest du Bassin en 1991.

Nombre de larves

Larves secteur est - 1992



Nombre de larves

Larves secteur ouest - 1992

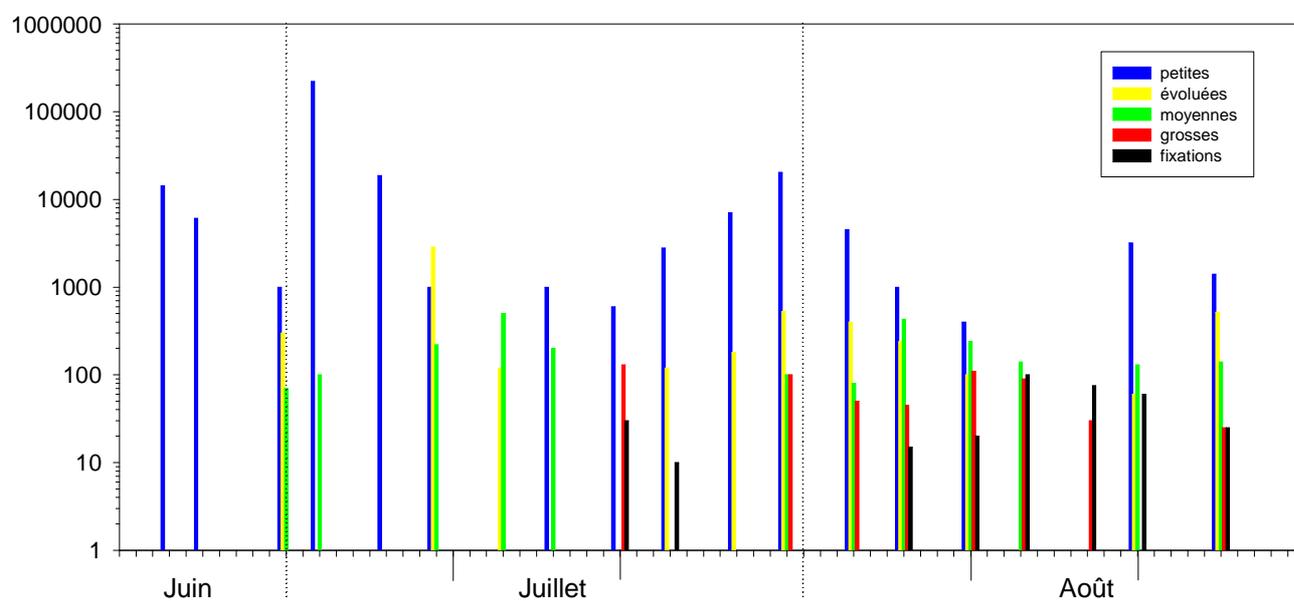
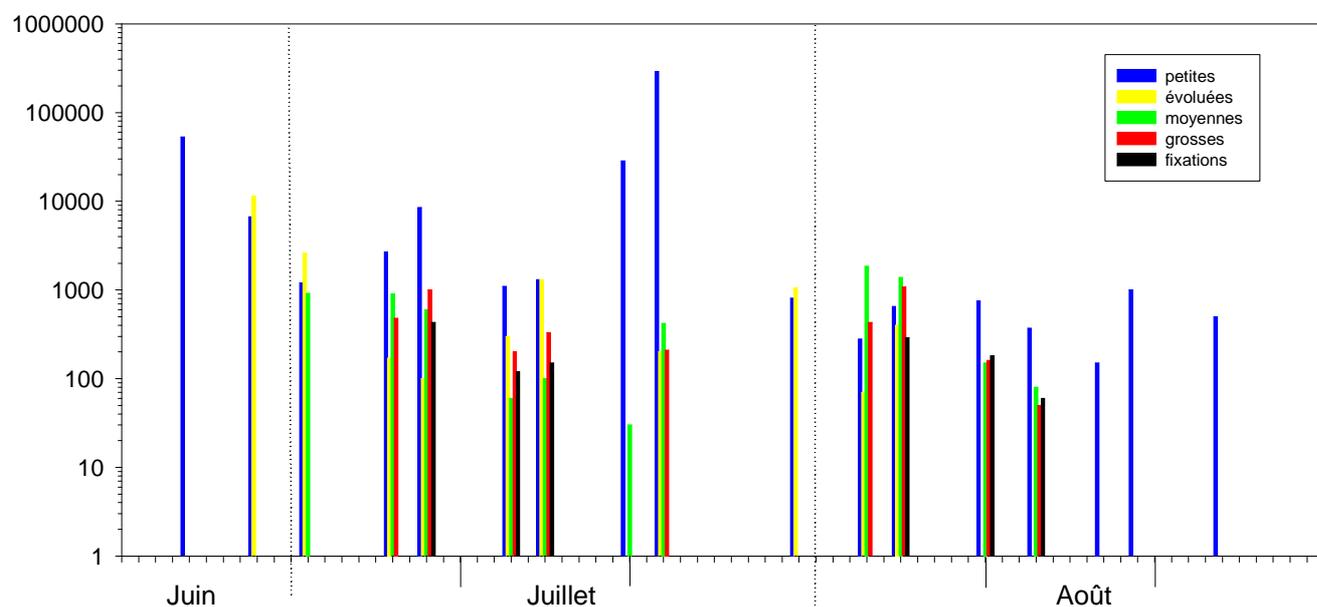


Figure H : Résultats des comptages larvaires dans les secteurs est et ouest du Bassin en 1992.

Nombre de larves

Larves secteur est - 1993



Nombre de larves

Larves secteur ouest - 1993

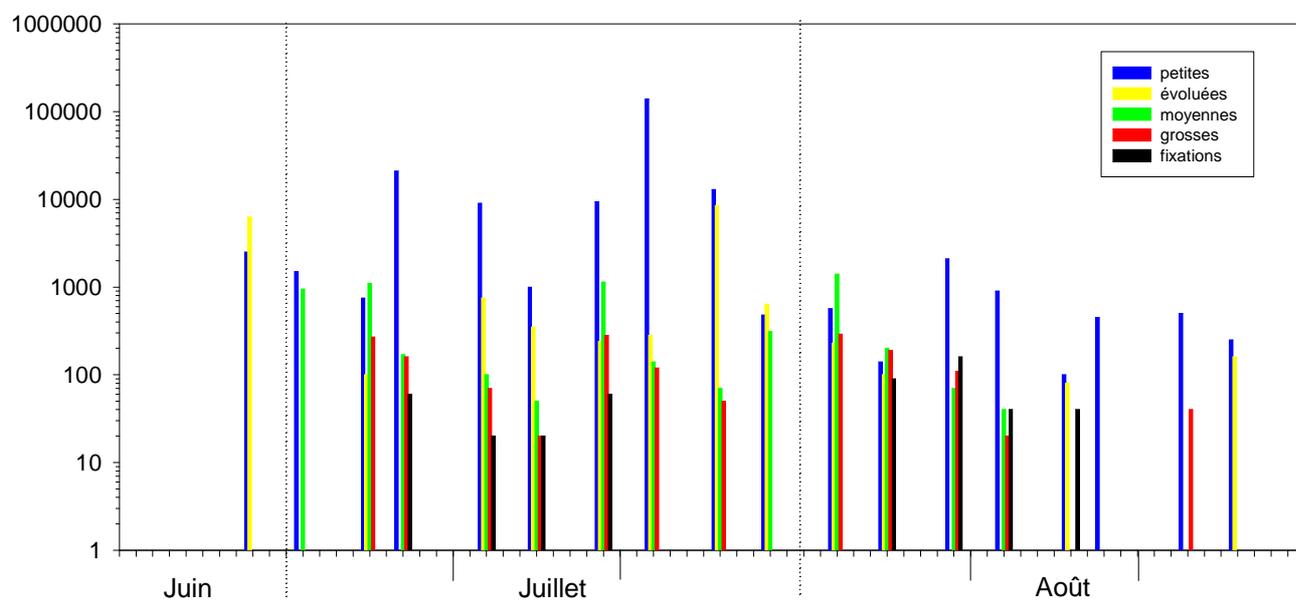
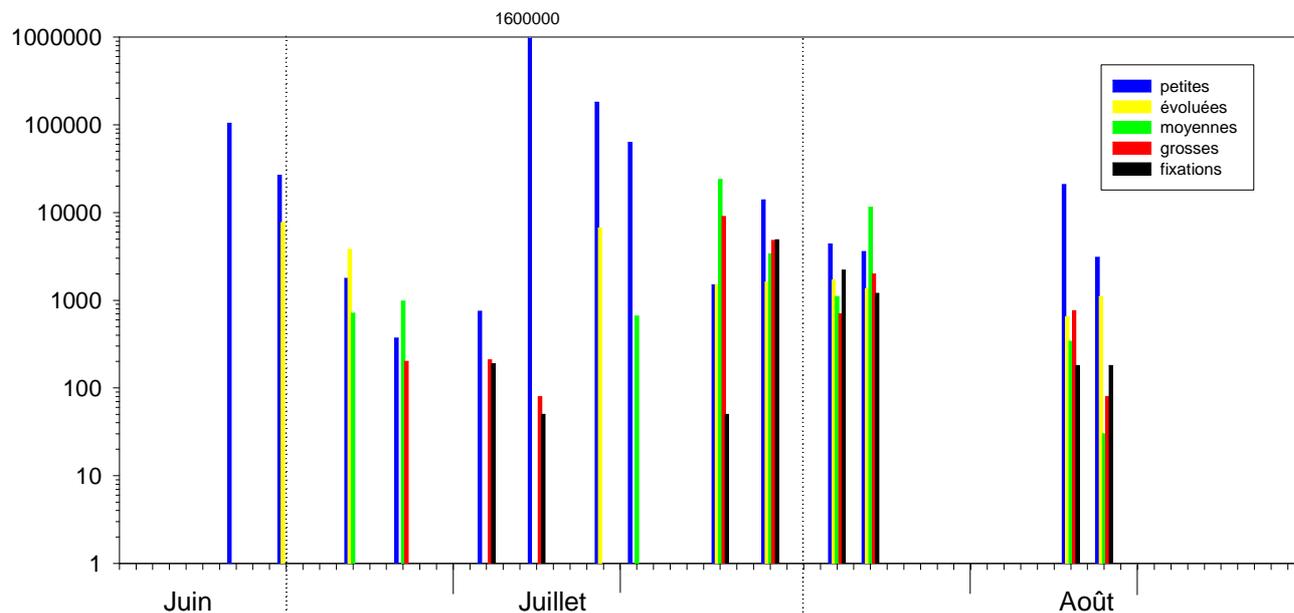


Figure I : Résultats des comptages larvaires dans les secteurs est et ouest du Bassin en 1993.

Nombre de larves

Larves secteur est - 1994



Nombre de larves

Larves secteur ouest - 1994

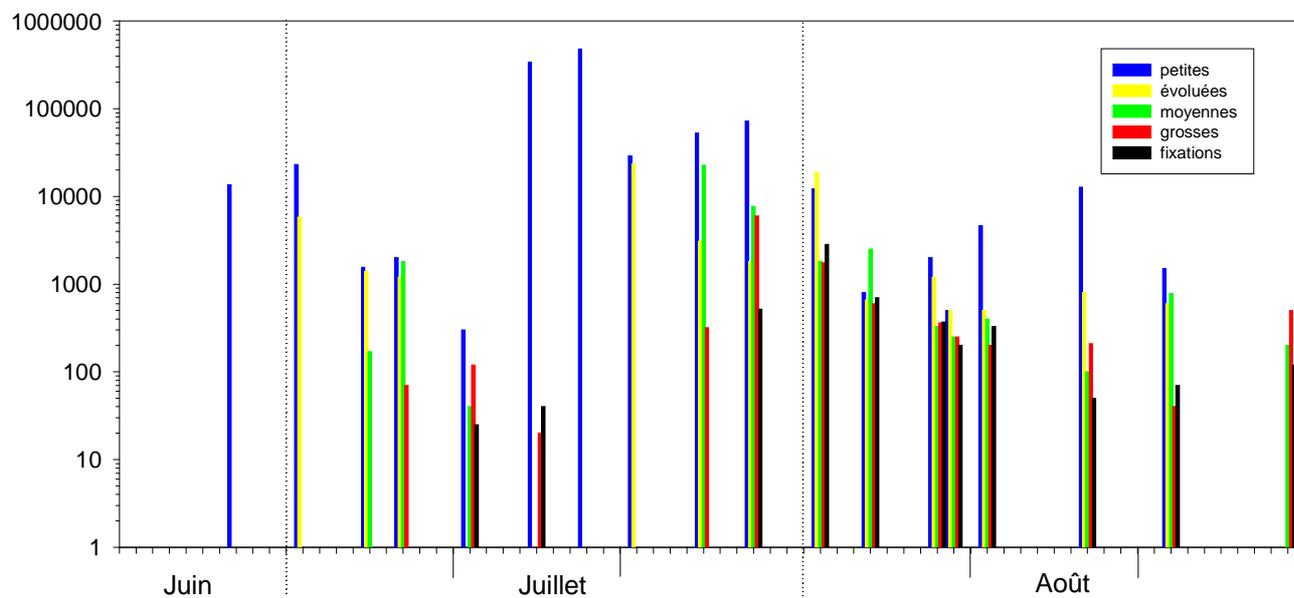
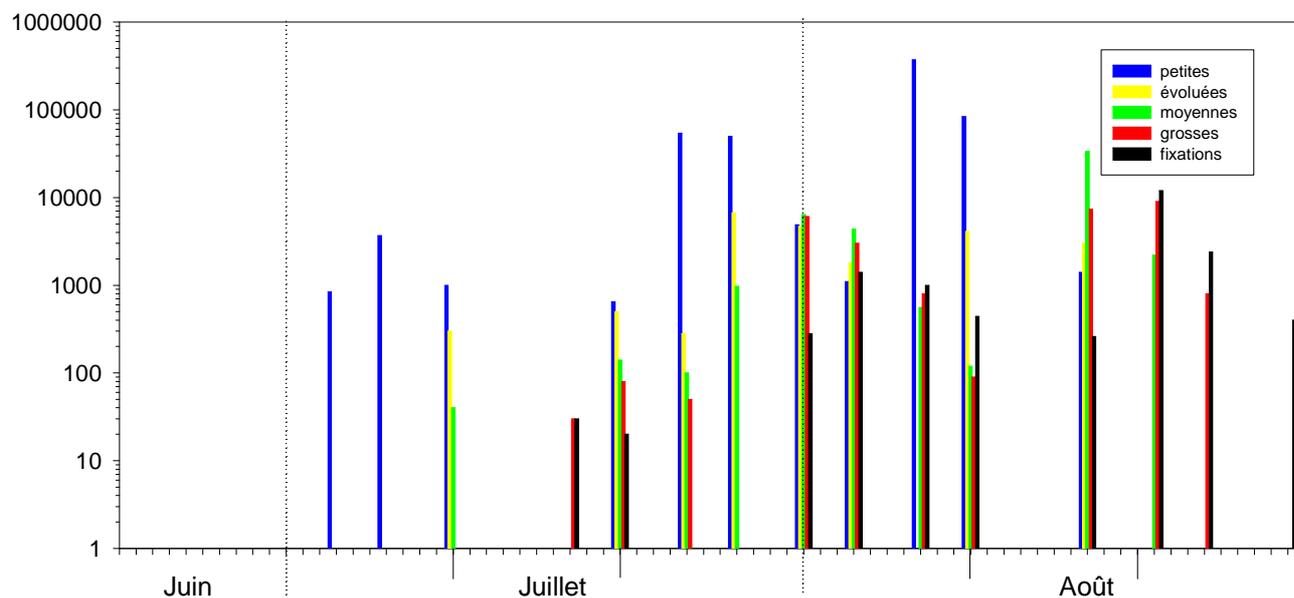


Figure J : Résultats des comptages larvaires dans les secteurs est et ouest du Bassin en 1994.

Nombre de larves

Larves secteur est - 1995



Nombre de larves

Larves secteur ouest - 1995

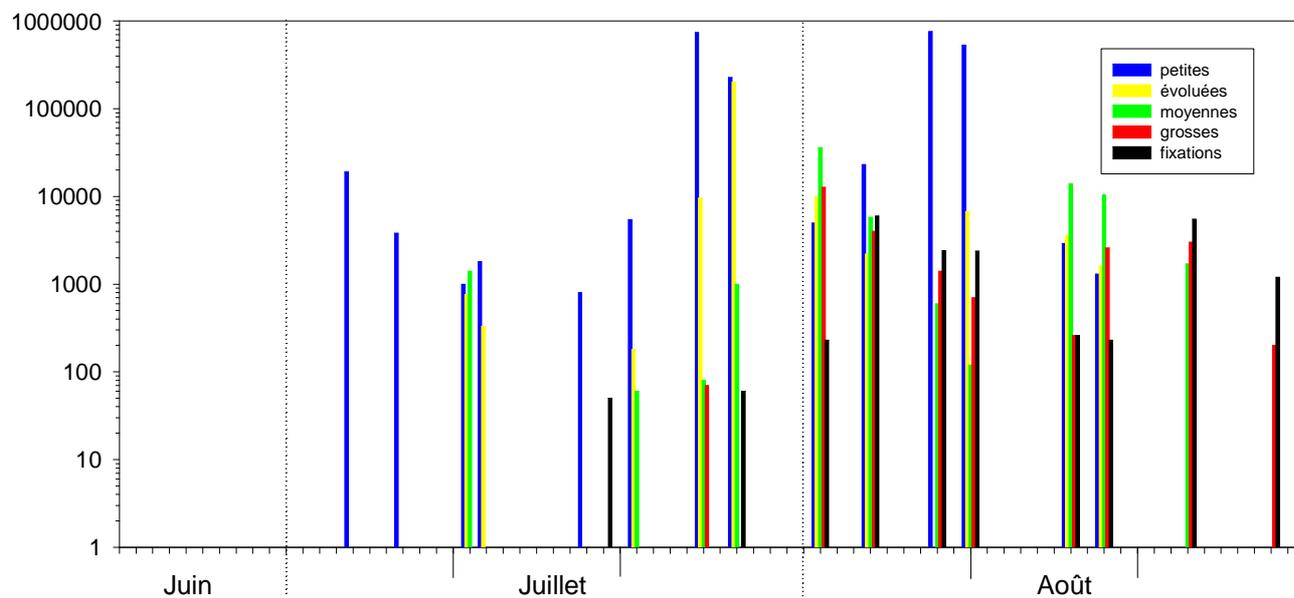
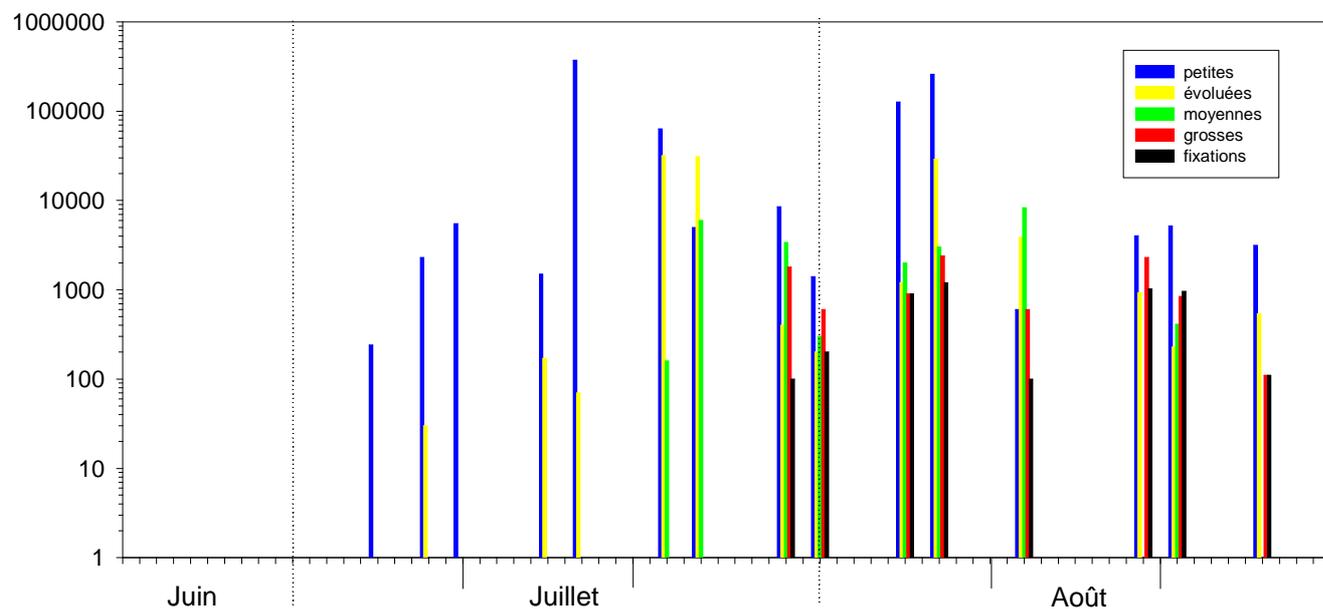


Figure K : Résultats des comptages larvaires dans les secteurs est et ouest du Bassin en 1995.

Nombre de larves

Larves secteur est - 1996



Nombre de larves

Larves secteur ouest - 1996

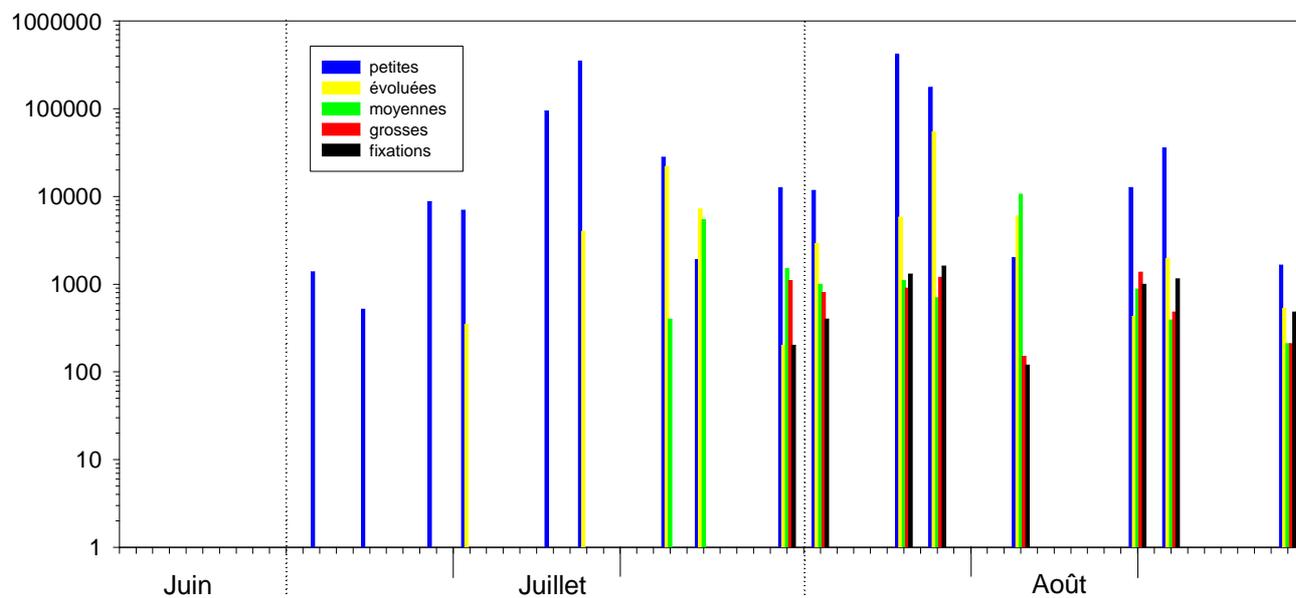


Figure L : Résultats des comptages larvaires dans les secteurs est et ouest du Bassin en 1996.

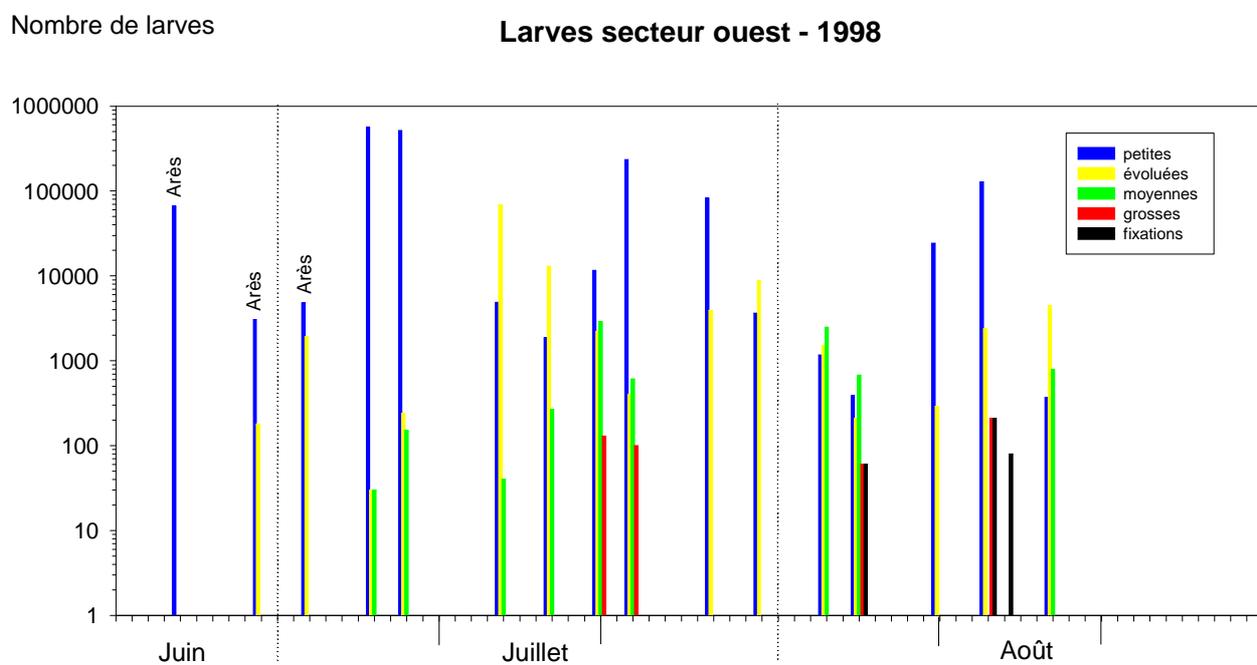
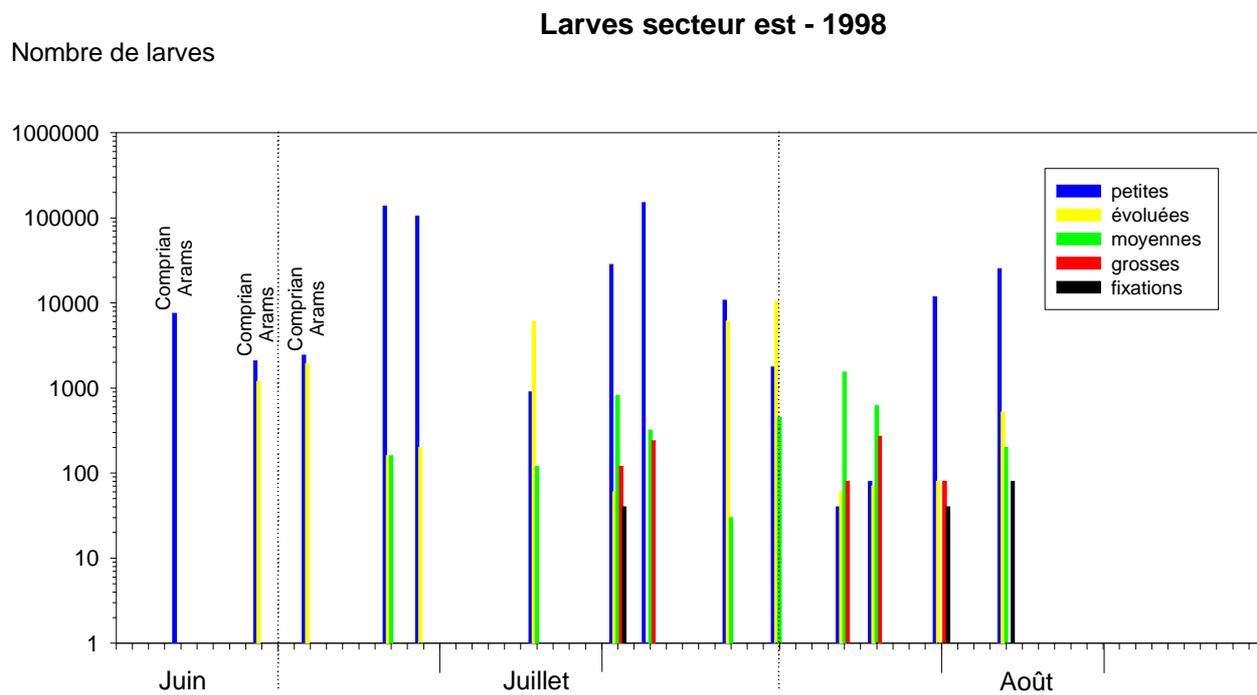
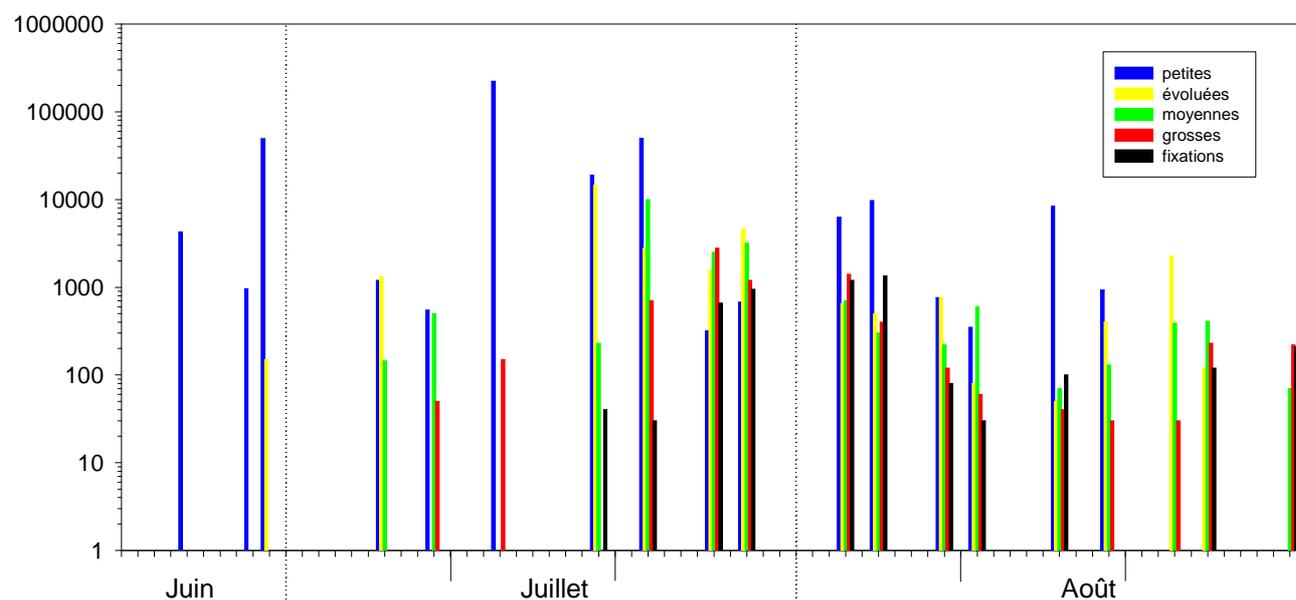


Figure N : Résultats des comptages larvaires dans les secteurs est et ouest du Bassin en 1998.

Nombre de larves

Larves secteur est - 1999



Nombre de larves

Larves secteur ouest - 1999

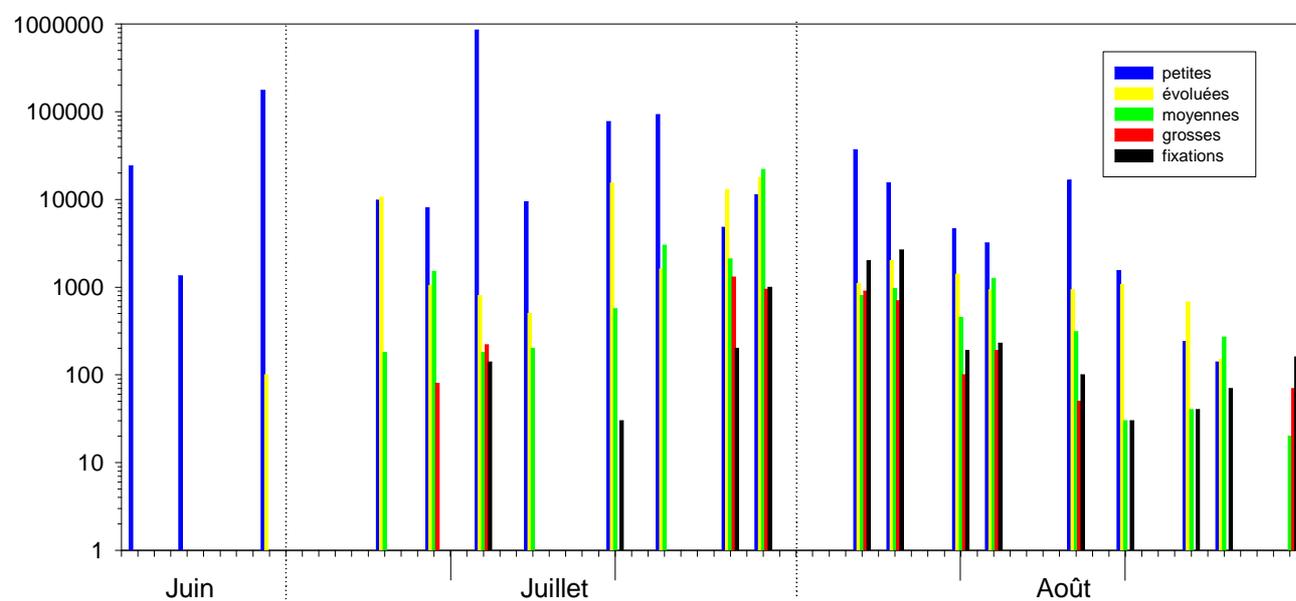


Figure O : Résultats des comptages larvaires dans les secteurs est et ouest du Bassin en 1999.

Annexe 2

Localisation des stations de prélèvement du réseau hydrologique

**Températures de l'eau mesurées en continu à l'extrémité de la jetée
d'Eyrac au cours des étés 1998 et 1999.**

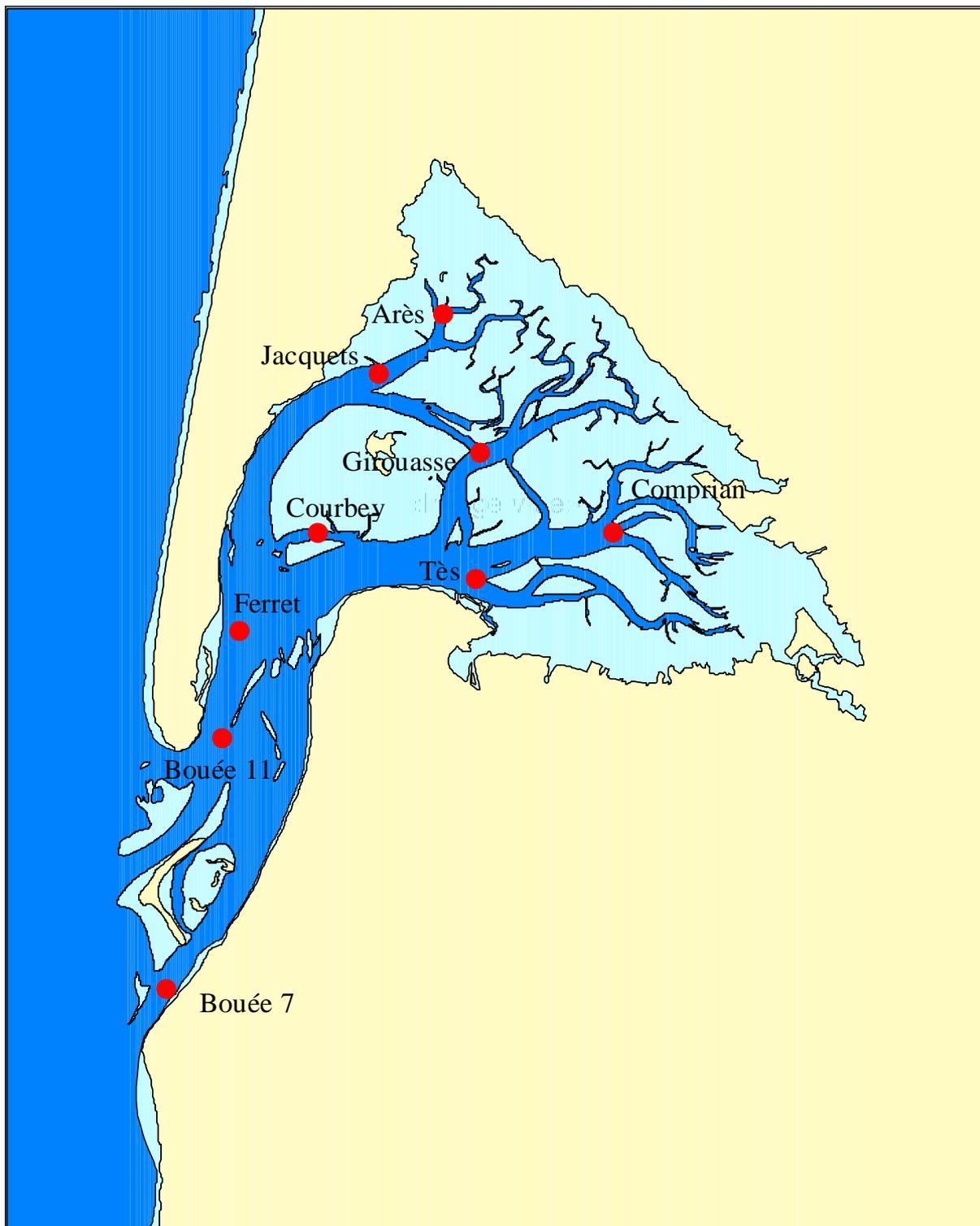


Figure P : Localisation des stations échantillonnées dans le cadre du Réseau hydrologique.



Figure Q : Température de l'eau à la jetée d'Eyrac et coefficient de marée pendant l'été 1998.

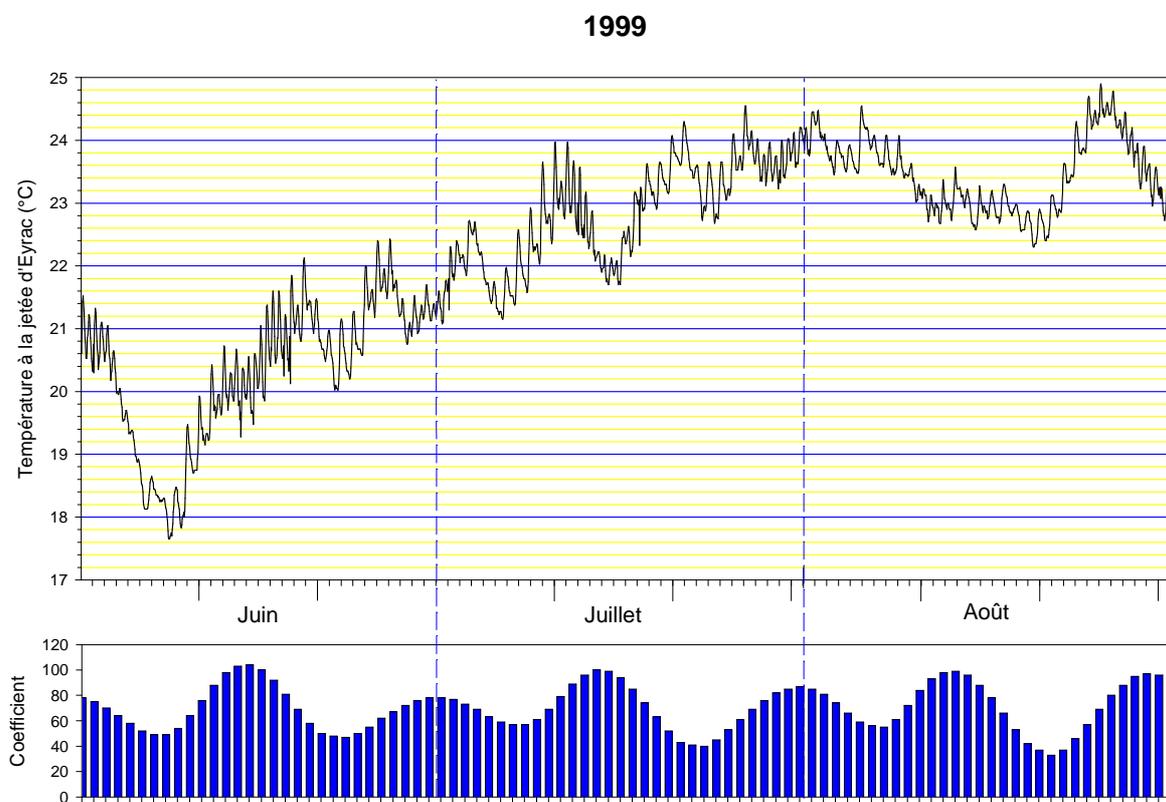


Figure R : Température de l'eau à la jetée d'Eyrac et coefficient de marée pendant l'été 1999.

Annexe 3

Méthodes d'analyse des pesticides. (GIRPA – Beaucouzé)

METHODE MULTIRESIDUS DE DOSAGE DE PESTICIDES DANS L'EAU

Référence méthode : GIR/MET/MULTIRESI/01V1

1. INTRODUCTION

Les résidus de pesticides sont extraits de l'eau par partage liquide/liquide eau/dichlorométhane. Le dosage des résidus est réalisé par chromatographie liquide haute performance sur colonne C₁₈ avec détecteur à barrette de diodes et par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur de masse en tandem sur colonne capillaire.

2. STANDARDS ANALYTIQUES

Matières actives	N°de lot	Formule brute	Masse molaire
2-4 D Sels	70509	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	221.04
flusilazole	DPX-H6573-437	C ₁₆ H ₁₅ F ₂ N ₃ Si	315.4
2-4 MCPA	691-6-1	C ₉ H ₉ ClO ₃	200.62
Alachlore	60506	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂	269.77
Aldicarbe	22DEQ48	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ S	190.3
Atrazine	126/7	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	215.69
Bromoxynil	JRG188	C ₇ H ₃ Br ₂ NO	276.9
Carbofuran	10242E678829	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	221.25
Chlorothalonil	ASJ10125-03S	C ₈ Cl ₄ N ₂	265.92
Chlorpyrifos éthyl	80721	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	350.6
Cymoxanil	71121	C ₇ H ₁₀ N ₄ O ₃	198.18
DEA	70311	C ₆ H ₁₀ ClN ₅	187.63
DIA	71217	C ₅ H ₈ ClN ₅	173.61
DET	61112	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	201.66
Deltaméthrine	5NO415B	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	505.21
Dichlofluanid	1/96	C ₉ H ₁₁ Cl ₂ FN ₂ O ₂ S ₂	333.2
Diméthenamid	CP029795	C ₁₂ H ₁₈ ClNO ₂ S	275.8
Diuron	60819	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	233.1
Folpel	117-63	C ₉ H ₄ Cl ₃ NO ₂ S	296.56
Imazametabenz	AC12140-10	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₃	288.35
Irgarol 1051 (2-méthylthio-4-tertiary-butylamino-6-cyclopropylamino-s-triazine)	0083109S	C ₁₁ H ₁₇ N ₅ S	253.4
Isofenphos	891215ELB02	C ₁₅ H ₂₄ NO ₄ PS	345.4
Isoproturon	133	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O	206.3
lindane	1444	C ₆ H ₆ Cl ₆	290.8
Linuron	28656-094	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	249.10
Métolachlor	71015	C ₁₅ H ₂₂ ClNO ₂	283.8
Oxadiazon	BOS2385	C ₁₅ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₃	345.2
Phosalone	GD7877	C ₁₂ H ₁₅ ClNO ₄ PS ₂	367.8
Simazine	130/102	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	201.7
Sulcotrione	ASW01043-01A	C ₁₄ H ₁₃ ClO ₅ S	328.8
Tébutam	70422	C ₁₅ H ₂₃ NO	233.36
Terbuthylazine	80903	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	229.72
trifluraline	80505	C ₁₃ H ₁₆ F ₃ N ₃ O ₄	335.28

3. PREPARATION DES SOLUTIONS ETALONS

Les solutions étalons sont préparées de la façon suivante:

- Peser avec précision une quantité de pesticide comprise entre 20 et 50 mg (X mg).
- Ajouter à la burette X ml de méthanol de manière à obtenir une solution à une concentration égale à 1 g/L. Agiter (ultrasons) pour obtenir une solubilisation complète. Conserver en flacon en verre teinté.
- Par dilution dans le méthanol, préparer une solution étalon contenant 10 mg/L de pesticide. Conserver dans un flacon en verre teinté.

- Pesticides analysés en HPLC/UV :

Par dilution de ces solutions à 10 mg/L dans une solution eau pH2/acétonitrile(65/35), préparer des solutions étalons contenant 0.010, 0.025, 0.050, 0.0100, 0.200 et 0.500 mg/L de pesticides en mélange. Conserver dans des flacons en verre teinté.

- Pesticides analysés en GC/MS/MS :

Par dilution des solutions à 10 mg/L dans l'acétate d'éthyl préparer des solutions étalons contenant 0.010 mg/L de pesticides en mélange. Conserver dans des flacons en verre teinté.

- Pour les ajouts dans les échantillons non-traités (détermination du taux de récupération), utiliser les solutions à 10 mg/L.

4. APPAREILLAGE, MATERIEL ET PRODUITS

4.1 APPAREILLAGE

- chaîne HPLC avec détecteur à barette de diodes :

- Pompe : modèle 230 (Varian)
- Injecteur : modèle 410 (Varian)
- Détecteur : modèle 330 (Varian)

- GC/MS/MS :

- chromatographe : GC 3400 CX (Varian)
- autosampler : 8200 (Varian)
- détecteur de masse : Saturn 4D (Varian)
- Balance (Sartorius) L2200P
- Balance de précision (Sartorius) M3P
- Bac à ultra-sons (Bioblock)
- pH-mètre (Mettler Toledo)

- Evaporateurs rotatifs sous vide (Büchi)

4.2 MATERIEL

- pipettes automatiques
- Verrerie courante de laboratoire

Toute la verrerie est préalablement rincée au méthanol et séchée avant l'utilisation.

4.3 REACTIFS ET PRODUITS CHIMIQUES UTILISES

- Méthanol pour HPLC (Merck, art.106007)
- Dichlorométhane pour analyses de résidus (SDS, art. 02922A21)
- Acétonitrile pour HPLC (Merck, art 100030)
- Toluène pour analyses de résidus (Merck, art.108389)
- acide orthophosphorique à 85 % (Merck, art.1.002573.1000)
- Eau ultra pure produite par le système SERAL
- Sulfate de sodium anhydre pour analyses (SDS, art 1310517)
- n-dodécane (Prolabo, art.23586236)

5. METHODE DE DOSAGE

- Verser l'échantillon dans une ampoule à décanter de 1L ou réaliser l'extraction directement dans le flacon de prélèvement si le volume à analyser est supérieur à 1L.
- Extraire les pesticides avec environ 75 mL de dichlorométhane en agitant 30 min et en laissant décanter 30 min.
- Récupérer le dichlorométhane dans un ballon rodé de 500 mL en filtrant sur entonnoir muni de coton de verre et environ 30 g de sulfate de sodium anhydre.
- Ajuster le pH de la phase aqueuse à 2+/- 0.05 avec de l'acide phosphorique à 85 %.
- Réextraire la phase aqueuse avec deux fois 75 mL de dichlorométhane (en agitant 30 min et en laissant décanter 30 min)
- Rassembler les phases organiques, ajouter 200 µL de n-dodécane et évaporer à sec à l'évaporateur rotatif (bain marie environ 40°C).
- Reprendre dans le résidu sec 1 mL d'acétate d'éthyle.

- Prélever 100 µL pour analyse en GC/MS/MS

- Evaporer à sec le reste de l'extrait sous flux d'azote, reprendre dans le volume adéquat de phase mobile.

6. ANALYSE INSTRUMENTALE

6.1 CONDITIONS OPERATOIRES DE L'ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE

- 6.1.1. **Chromatographie Liquide Haute Performance équipé d'un détecteur à barrette de diodes :**

Colonne C₁₈ HyPurity Elite (L : 250 mm, D.I. : 4.6 mm) (Hypersil)

Débit : 1 mL/min.

Volume injecté : 100 µl

Durée d'analyse : 65 min.

Technique d'exploitation : surface des pics

pesticide	Temps de rétention (min)	Longueur d'onde (nm)
aldicarbe	12.6-13.1	200
sulcotrione	16.8-17.2	285
cymoxanil	11.6-12.2	249
isoproturon	19.1-20.4	249
diuron	20.5-21.3	249
bromoxynil	20.5-20.8	220
2.4D	21.5-22.0	200
2.4 MCPA	21.7-22.1	200
linuron	30.6-31.8	249

Gradient :

Temps (en min)	Acétonitrile (en %)	Eau pH 2 (en %)
0	85	15
10	62	38
15	62	38
37	55	45
45	20	80
60	10	90
65	10	90

- 6.1.2. **GC/MS/MS :**

-Colonne Varian VA-5MS (30 m x 0.25 mm DI; 0.25 µm)

Programme de température de la colonne :

40°C _____ +10°C/min _____ 200°C _____ +20°C/min. _____ 290°C
 2 min _____ 3 min _____ 6.5 min

-Injecteur SPI on column

Programme de température de l'injecteur :

50°C _____ +250°C/min. _____ 250°C
 1 min _____ 5 min

-Volume d'injection : 2µL

- Température du détecteur : 220°C

Conditions de détection en masse :

Trois injections sont nécessaires pour analyser l'ensemble des pesticides :

Les temps de rétention sont donnés à titre indicatif et susceptibles de varier légèrement au fur et à mesure des analyses, les segments des méthodes de détection sont recalés quotidiennement par rapport aux mélanges de pesticides correspondants.

Injection n°1 :

pesticide	<i>1.1.1.1.1 Temps de rétention (en min)</i>	<i>1.1.1.1.2 M/z des ions retenus pour la quantification</i>
DEA	17.06	79+104
tebutam	17.41	65
atrazine	18.16	94+104+105
chlorothalonil	18.76	133
dichlofluanid	21.26	70+96
isofenphos	22.66	121+185
oxadiazon	23.83	112+147
phosalone	26.29	102+111+138

Injection n°2 :

pesticide	<i>1.1.1.1.3 Temps de rétention (en min)</i>	<i>1.1.1.1.4 M/z des ions retenus pour la quantification</i>
trifluraline	17.13	264
carbofuran	18.03	131+146+149
lindane	18.36	109+144+146
diméthénamid	19.79	111+137
metolachlor	21.48	162
irgarol	22.76	182+196+238
fluzilazole	23.96	152+165
deltamethrine	30.25	172+174

Injection n°3 :

pesticide	<i>1.1.1.1.5 Temps de rétention (en min)</i>	<i>1.1.1.1.6 M/z des ions retenus pour la quantification</i>
DIA	16.91	145+158
DET	17.29	104+145
simazine	18.06	138+173+186
terbutylazine	18.49	104+132+173
alachlor	20.19	132+160
Chlorpyriphos ethyl	21.55	258+286
folpel	22.96	130+200+232
imazametabenz	23.53	89+116

6.2 ETALONNAGE DU CHROMATOGRAPHE

Chaque série d'échantillons est précédée d'une gamme d'étalonnage ou d'un point de gamme.

7. CRITERE DE QUALITE**7.1 SPECIFICITE**

La méthode décrite s'applique à l'eau sous réserve qu'aucun composé ayant le même temps de rétention que les pesticides analysés n'interfère.

La spécificité de la méthode a été vérifiée par l'analyse d'un échantillon d'eau ultra pure.

7.2 LIMITE DE QUANTIFICATION

Matières actives	Limites de quantification (µg/L)	
	Eaux de rivière	Eaux de bassin
2-4 D Sels	0.020	0.010
flusilazole	0.005	0.0025
2-4 MCPA	0.010	0.010
Alachlore	0.005	0.0025
Aldicarbe	0.100	0.50
Atrazine	0.005	0.0025
Bromoxynil	0.020	0.010
Carbofuran	0.005	0.0025
Chlorothalonil	0.005	0.0025
Chlorpyriphos éthyl	0.005	0.0025
Cymoxanil	0.100	0.050
DEA	0.005	0.0025
DIA	0.005	0.0025
DET	0.005	0.0025
Deltaméthrine	0.005	0.0025
Dichlofluanid	0.005	0.0025
Diméthenamid	0.005	0.0025
Diuron	0.025	0.010
Folpel	0.005	0.0025
Imazametabenz	0.005	0.0025
Irgarol 1051 (2-méthylthio-4-tertiary-butylamino-6-cyclopropylamino-s-triazine)	0.005	0.0025
Isofenphos	0.005	0.0025
Isoproturon	0.025	0.010
lindane	0.005	0.0025
Linuron	0.025	0.010
Métolachlor	0.005	0.0025
Oxadiazon	0.005	0.0025
Phosalone	0.005	0.0025
Simazine	0.005	0.0025
Sulcotrione	0.100	0.050
Tébutam	0.005	0.0025
Terbuthylazine	0.005	0.0025
trifluraline	0.005	0.0025

METHODE DE DOSAGE DES RESIDUS D'AMINOTRIAZOLE DANS L'EAU

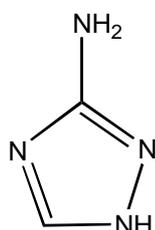
Référence de la méthode : GIR/MET/AMITROLE/01 V1

1. INTRODUCTION

Le dosage de l'aminotriazole est réalisé par chromatographie liquide haute performance avec détection spectrofluorimétrique sur colonne C18 après dérivation de l'aminotriazole par la fluorescamine.

2. STANDARD ANALYTIQUE

AMINOTRIAZOLE (ou AMITROLE) :



- Numéro de lot : RD-655-140-7
- Formule : $C_2H_4N_4$
- Masse moléculaire: 84.1 g/mol
- Point de fusion : 155.7°C
- Tension de vapeur : $3.3 \cdot 10^5$ nPa à 20°C
- **Solubilité :** dans l'eau : 280 g/L (23 °C), 530 g/L (53 °C), Modérément soluble dans le méthanol et l'acétonitrile. Insoluble dans les solvants apolaires .

3. PREPARATION DES SOLUTIONS ETALONS

Les solutions étalons d'aminotriazole sont préparées de la façon suivante :

- Peser avec précision une quantité d'aminotriazole comprise entre 20 et 50 mg (x mg).
- Ajouter à la burette x mL d'eau ultrapure de manière à obtenir une concentration égale à 1 g/L. Agiter pour obtenir une solubilisation totale (ultrasons). Conserver dans un flacon de verre teinté.
- Par dilution dans l'eau ultrapure, préparer une solution étalon contenant 10 mg/L d'aminotriazole conservée dans un flacon de verre teinté.
- Par dilution de la solution contenant 10 mg/L dans la solution de dilution à pH 4.2 (voir réactifs), préparer une solution contenant 100 µg/L, puis par dilution de cette solution

préparer les solutions étalons contenant : 0.025, 0.100, 0.600, 1.000, 10.00 µg/L d'aminotriazole . **Les solutions étalons se conservent 12 heures.**

4. APPAREILLAGE, MATERIEL ET PRODUITS

4.1. APPAREILLAGE

- Pompe (Waters)
- **Colonne : Lichrospher® 100RP-18 (250 ; 4 ; 5) (Merck)**
- Détecteur (Jasco)
- Logiciel d'acquisition : Varian Star
- Balances de précision M3P et R160P (Sartorius)
- Bac à ultra-sons (Bioblock)
- pHmètre (Mettler Toledo)
- Système d'eau ultrapure Séral

4.2. MATERIEL

- Verrerie courante de laboratoire
- Pipettes automatiques

Toute la verrerie est préalablement rincée à l'**acétone** et séchée avant utilisation.

4.3. REACTIFS ET PRODUITS CHIMIQUES UTILISES

- | | |
|--------------------------------------|--|
| - Eau ultra pure | produite par le système SERAL |
| -KH ₂ PO ₄ p.a | (Acros, art.20592-5000) |
| - acide orthophosphorique à 85 % | (Merck, art.1.002573.1000) |
| - fluorescamine | (Sigma Aldrich, art.F9015) |
| - acétonitrile gradient | (SDS, art.00637G21) |
| - acétone pour analyse de résidus | (Merck, art.1.00012.2500) |
| - solutions étalons de pH | (Mettler toledo, pH 4.01, 7.00 et 9.21 resp. 51302069, 51302047 et 51302070) |

- préparation des solutions d'H₃PO₄ 0.8 M et 3.2 M :

H₃PO₄ 0.8 M : dans un tube gradué de 10 mL, verser 9.5 mL d'eau ultrapure puis ajouter 0.5 mL d' H₃PO₄ à 85 %.

H₃PO₄ 3.2 M : dans un tube gradué de 10 mL, verser 8 mL d'eau ultrapure puis ajouter 2 mL d' H₃PO₄ à 85 %.

- préparation de la solution de dilution à pH 4.2 +/- 0.05 :

Verser environ 200 mL d'eau ultrapure dans un bécher. Ajuster le pH de l'eau à 4.2 +/- 0.05 par ajouts successifs à la micropipette de 50 µL d' H_3PO_4 0.8 M . **Durée de conservation : une semaine (sous réserve de vérifier le pH quotidiennement).**

-préparation de la fluorescamine :

La fluorescamine est utilisable **dans le mois** qui suit l'ouverture du flacon.

Peser entre 6 et 8 mg de fluorescamine dans un flacon pour passeur automatique (ou vial) de 2 mL recouvert de papier aluminium. Dissoudre dans 1 mL d'acétonitrile. Agiter au Vortex environ 30 secondes et stocker immédiatement à environ - 18 °C. **Durée de conservation : 12 heures.**

- préparation de l'éluant KH_2PO_4 0.025 M :

Dans une fiole jaugée de 1 L, ajouter 3.40 g +/- 0.01g de KH_2PO_4 , compléter avec de l'eau ultrapure. Transvaser dans le flacon d'éluant pour HPLC et ajuster à pH 2.6 +/- 0.05 par ajouts successifs de 250 µL d' H_3PO_4 3.2 M, sous agitation magnétique.

5. METHODE DE DOSAGE

- Les échantillons sont préparés le jour de l'analyse.

- 10 mL d'eau sont prélevés pour analyse et 20 mL d'eau sont stockés pour réanalyse en cas de résultat supérieur à la limite de quantification (10 mL pour le redosage et 10 mL pour réaliser un ajout dosé).

- Les échantillons à analyser sont ajustés à pH 4.2 +/- 0.05 à l'aide de la solution d' H_3PO_4 0.8 M ou 3.2 M.

- Prélever 1 mL d'échantillon à pH 4.2 +/- 0.05 et l'introduire dans un flacon pour passeur automatique de 2 mL recouvert de papier aluminium. Stocker à 4°C avant dérivation.

- Sortir le vial de fluorescamine dissout dans l'acétonitrile du congélateur, l'échantillon de la chambre froide et procéder rapidement à la dérivation. Prélever 50 µL de réactif de dérivation à l'aide d'une pipette automatique, refermer aussitôt le vial de réactif et introduire lentement le réactif prélevé dans le vial d'échantillon. Remplacer immédiatement le réactif à environ -18 °C.

- Le vial est laissé à température ambiante pendant une heure. Injecter ensuite immédiatement.

6. ANALYSE INSTRUMENTALE

L'extrait final est analysé par chromatographie liquide haute performance avec détecteur spectrofluorimétrique. Le dosage est réalisé par étalonnage externe.

6.1. CONDITIONS OPERATOIRES DE L'ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE

- Chromatographe liquide haute performance équipé d'un détecteur spectrofluorimétrique.
- Colonne : Lichrospher® 100RP-18
Dimensions : L 250 - Ø 4 mm, phase 5 µm
- Débit : 1 mL/min
- Eluant : eau (KH₂PO₄ 0.025 M)/acétonitrile 73/27
- Longueur d'onde :
excitation : 380 nm
émission : 484 nm
- Volume injecté : 100 µL
- Durée d'analyse : 20 min
- Technique d'exploitation : Surface de pic
- Temps de rétention : 14-15 min

La colonne est stockée sous acétonitrile/eau 70/30. Il faut la conditionner de la façon suivante :

- Eau/ACN 30/70 (0.2 mL/min) pendant 10 min
- eau/ACN 30/70 (0.5 mL/min) pendant 5 min
- eau/ACN 30/70 (1 mL/min) pendant 5min
- eau/ACN 73/27 (1 mL/min) pendant 10 min
- eau (KH₂PO₄ 0.025 M)/acétonitrile 73/27 (1 mL/min) pendant 30 min avant la première injection

En fin de journée, la colonne est impérativement rincée de la façon suivante :

- eau/ACN 70/30 (1 mL/min) pendant 20 min
- eau/ACN 30/70 (1 mL/min) pendant 10 min

6.2. ETALONNAGE DU CHROMATOGRAPHE

Chaque série d'échantillons est injectée après passage d'une solution étalon.

Une gamme d'étalonnage est réalisée en début d'étude et à chaque fois que l'on constate une dérive du point de gamme préparé quotidiennement.

Un blanc (1 mL d'eau ultrapure à pH 4.2) est dérivé avant chaque série journalière d'analyses, en cas de présence de pic interférent refaire un blanc en prenant garde aux sources de pollution possibles (verrerie mal nettoyée, vapeurs d'ammoniaque dans le laboratoire...).

7. CRITERES DE QUALITE

7.1. SPECIFICITE

La méthode décrite s'applique à l'eau sous réserve qu'aucun composé ayant le même temps de rétention que l'aminotriazole n'interfère.

La spécificité de la méthode a été vérifiée par l'analyse d'un blanc réactif.

7.2. LINEARITE

Avec le détecteur utilisé, l'aminotriazole a une réponse linéaire dans un domaine de concentrations de 0.025 à 10 µg/L.

7.3 LIMITE DE QUANTIFICATION

La limite de quantification de l'aminotriazole dans l'eau est de 0.025 µg/L.

METHODE DE DOSAGE DU GLYPHOSATE ET ET DE SON DERIVE (AMPA) DANS L'EAU

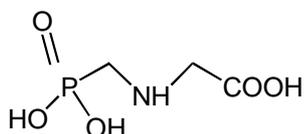
Référence de la méthode : GIR/MET/GLYPHOSA/01 V1

1. INTRODUCTION

La méthode consiste en la purification de l'eau (amenée à pH 2) par chromatographie sur résines échangeuses d'ions (Chelex 100[®] et AG[®]1X8) suivie d'une dérivation et d'une quantification par GC/MS/MS.

2. STANDARDS ANALYTIQUES

* GLYPHOSATE



N° de lot : GLP-9606-7189-A

Formule : C₃H₈NO₅P

MASSE MOLAIRES : 169.07 G.MOL⁻¹

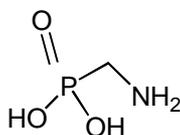
POINT DE FUSION : 230°C

PURETE : 99.9 %

TENSION DE VAPEUR : 3.5 10⁻⁷ MBAR A 45°C

solubilité : 12 g/L dans l'eau
Pratiquement insoluble dans les solvants organiques

*AMPA



N° de lot : PIT/8912-1385-A

Formule : CH₆NO₃P

MASSE MOLAIRES : 111.04 G.MOL⁻¹

POINT DE FUSION : 285°C

PURETE : 99.1 %

TENSION DE VAPEUR : 4.0 10⁻⁶ MBAR A 45°C

solubilité : 58 g/L dans l'eau

Pratiquement insoluble dans les solvants organiques

3. PREPARATION DES SOLUTIONS ETALONS

Les solutions étalons sont préparées de la façon suivante :

- Peser avec précision une quantité de standard, comprise entre 20 et 50 mg (X mg)
- Ajouter à la burette X ml d'eau ultra pure de manière à obtenir une solution à une concentration égale à 1 g/l.
- Agiter (ultrasons) pour obtenir une solubilisation complète, conserver en flacon en verre teinté.
- Par dilution dans de l'eau ultra pure contenant 3 gouttes d'HCl à 37%, préparer des solutions étalons à une concentration égale à 100 mg/l (solution de calibration), 1 mg/l conserver dans un flacon de verre teinté.
- Pour les ajouts dans les échantillons non-traités (détermination du taux de récupération), utiliser la solution à 1 mg/L.

4. APPAREILLAGE, MATERIEL ET PRODUITS

4.1. APPAREILLAGE

- GC MS-MS Saturn 2000 (Varian)
- Balance de précision M3P (Sartorius)
- Balance L2200P (Sartorius)
- Bacs ultrasons (Bioblock et Deltasonic)
- Evaporateurs rotatifs (Büchi et Heidolph)
- Etuve (Memert)
- PHmètre (Mettler Tolédo)
- Bloc chauffant (Lab-Line Instruments INC.)
- Vortex (Bioblock)
- Colonne pour chromatographie type I : 8 cm diamètre interne, 40 cm de long muni d'un fritté
- Colonne pour chromatographie type II : 2,2 cm diamètre interne, 13 cm de long avec réservoir (diamètre : 5,5 cm, longueur : 9 cm)
- Colonne pour chromatographie type III : 1.5 cm diamètre interne, 14 cm de long avec réservoir (2.5 cm de diamètre, 6.5 cm de long)

4.2. MATERIEL

- Coton de verre (Fisher Scientific art. A1058321 ou Prolabo art.23039.293)
- Résine Chelex[®] 100, 100-200 mesh (BioRad art. 142-2832)
- Résine AG[®] 1-X8, 200-400 mesh (BioRad art. 140-1451)
- Verrerie courante de laboratoire

Toute la verrerie est préalablement rincée au méthanol HPLC ou à l'acétone et séchée avant utilisation.

Les ballons de 100 ml sont silanisés (une fois par semaine) de la manière suivante :

- Mettre environ 10 ml d'une solution silanisante (5% v/v de diméthylchlorosilane dans du toluène) dans le ballon. Bien agiter afin de silaniser tout le verre.
- Rincer 2 fois le ballon au méthanol, puis 2 fois à l'eau ultra pure
- Laisser sécher le ballon toute une nuit à l'étuve à environ 120°C.

4.3. REACTIFS ET PRODUITS CHIMIQUES UTILISES

- Méthanol pour HPLC	(Merck art. 106007)
- Eau ultra pure	produite par le système SERAL
- Acétate d'éthyle pour analyses de résidus	(Merck art. 110972)
- Acide chlorhydrique 37%	(Merck art. 1.00317.2500)
- Acide chlorhydrique 1N	(SDS art. 3150015)
- Diméthylchlorosilane	(Sigma art. D-3879)
- Trifluoroacétique anhydre 99%	(Sigma art. T-8258)
- 2,2,3,3,4,4,4 heptafluoro-1-butanol 98%	(Aldrich art. H1,60-4)
- Octanol	(Prolabo art. 20-850-296)
- Citral 95%	(Aldrich art. C8,300-7)
-Azote liquide	(Air Liquide)
- Chlorure de fer	(Merck art. 10.3943)

4.4. PREPARATION DES SOLUTIONS ET RESINES

Chlorure de fer 0.1 M : Mélanger 27 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dans environ 500 mL d'eau ultra pure.

Ajouter 10 mL d'HCl 1 M afin d'avoir une solubilisation complète et ajuster à 1 L avec de l'eau ultra pure.

Solution CAX : 160mL de méthanol, 40 mL d'eau ultra pure et 2.7 mL d'HCl à 37%.

Résine Chelex[®] 100, 100-200 mesh, forme-Na :

Pour 900 g de résine. Mélanger à environ 3 L d'eau ultra pure. Ajouter environ 50 mL d'HCl 6M et environ 1 L de la solution de chlorure de fer 0.1 M. Mélanger pendant au moins 10 min. avec un agitateur magnétique. Laisser reposer et rincer la résine 2 fois avec environ 2 L d'eau ultra pure et d'environ 500 mL de la solution de chlorure de fer 0.1M.

La résine est transférée dans la colonne chromatographique I et est rincée avec environ 4 L d'HCl 0.02M.

Conserver la résine dans de l'eau ultra pure, dans une bouteille en verre teintée. Durée de conservation : 3 mois.

Résine AG[®] 1X8, échangeuse d'anions, 200-400 mesh, forme Cl :

Pour 450 g de résine. Mélanger à environ 1 L d'eau ultra pure et agiter pendant au moins 30 min. avec un agitateur magnétique. Laisser reposer et éliminer le surnageant. Recommencer le lavage.

Conserver la résine dans de l'eau ultra pure, dans une bouteille en verre teintée. Durée de conservation : 6 mois.

5 - Extraction

Peser 500 g d'eau.

Pour les surcharges, prendre la solution à 1mg/L.

Dégazer aux ultra sons pendant environ 15 min.

Ramener l'eau à pH2 (± 0.05) avec environ 1 mL d'HCl 6M

Clean up

Clean up sur résine échangeuse de cations Chelex® 100

Conditionnement de la résine

La résine doit être préparée la veille

Dans la colonne chromatographique II :

Placer un bouchon de laine de verre au fond de la colonne

Mettre précisément 22 ml de résine et 8 ml d'eau ultra pure.

Placer un bouchon de laine de verre (très peu) au dessus de la résine.

La résine est prélevée à la pipette et est placée dans une éprouvette graduée environ 2 heures afin d'avoir un volume précis.

Clean up

Eluer l'eau à un débit de 6 à 8 ml/min. (soit 12 à 16 gouttes en 10 secondes).

Rincer ensuite la colonne avec environ 50 ml d'eau ultra pure et environ 100 ml d'acide chlorhydrique 0.2 M, à débit élevé.

Le glyphosate et l'AMPA sont ensuite élués avec de l'HCl 6M à un débit de 4 ml/min. (soit 8 gouttes en 10 secondes).

Rincer avec 3 ml d'HCl 6M, suivis de 4 ml d'HCl 6M. Jeter les fractions.

Eluer avec 2 fois 7 ml, puis 2 fois 9 ml d'HCl 6M dans un bécher de 100 ml.

Ajouter 10 ml d'HCl 10M à l'éluat.

Clean up sur résine échangeuse d'anions AG1X8

Conditionnement de la résine

La résine doit être préparée la veille

Dans la colonne chromatographique III :

- Placer un bouchon de laine de verre au fond de la colonne (mettre très peu de laine de verre)

Mettre précisément 8 ml de résine (soit 5.5 g de résine) et 8 ml d'eau ultra pure.

Placer un bouchon de laine de verre (très peu) au dessus de la résine.

Clean up

Pré-rincer la colonne avec 3 fois 5 ml d'HCl 6M

Appliquer soigneusement l'éluat provenant du clean up précédent sur la colonne dont le robinet est ouvert à fond et le récupérer dans un ballon de 100 ml. La surface de la colonne ne doit pas être perturbée afin d'éviter que le chlorure de fer (de couleur jaune orange) ne passe à travers la colonne.

Le glyphosate et l'AMPA sont ensuite élués avec 2 puis 2 fois 4 ml d'HCl 6M à un débit élevés

L'éluat est récupéré dans le ballon de 100 ml préalablement silanisé.

L'éluat est récupéré dans un ballon de 100 ml.

Le ballon est évaporé à sec à environ 50 °C. Ajouter quelques gouttes d'octanol dans le ballon afin d'éviter l'apparition de mousse.

Prendre le résidu sec dans 0.5mL de solution CAX (160 ml de méthanol, 40 ml d'eau ultra pure et 2.7 ml d'HCl 37 %).

REMARQUE

Si le chlorure de fer passe à travers la colonne, il faut recommencer le clean-up avec une autre résine.

6. DERIVATION

- 1 - Préparer la solution dérivante dans un flacon avec un bouchon téflonné, en mettant 1 volume de 2,2,3,3,4,4,4-heptafluoro-1-butanol (HFB) et 2 volumes de trifluoroacétique anhydre (TFAA). Fermer le flacon et mélanger doucement. Dévisser avec précaution le bouchon afin de dégazer. Etant donné l'augmentation de pression, ne pas remplir le flacon au delà de 75% de sa capacité.
Préparer la solution dérivante tous les jours.
- 2 - Dans un vial de 2 ml, mettre 1.5 ml de la solution dérivante. Fermer le vial avec un bouchon téflonné. Refroidir le vial en le plaçant dans un récipient en polystyrène contenant de l'azote liquide. Refroidir le vial à une température inférieure à -60°C (environ 10 minutes).
- 3 - Prélever 50 µl de la solution de calibration (solution à 100mg/L) ou de l'extrait avec une pipette munie d'un cône en plastique. Placer le cône sous la surface du dérivant et relarguer doucement le contenu. Rincer immédiatement le cône par pipetages répétés en gardant toujours le cône sous la surface du dérivant.
Fermer le vial, agiter et laisser revenir à température ambiante (environ 15 minutes).
Procéder à la dérivation en plaçant les vials dans le bloc chauffant à 92 - 97 °C pendant une heure.
Retirer les vials du bloc chauffant et laisser les revenir à température ambiante (environ 15 minutes).
Evaporer sous azote l'excès de dérivant et d'acide trifluoroacétique.
Quand le vial semble être à sec, laisser sous azote pendant 20 à 30 min. Les résidus de dérivant ou d'acide trifluoroacétique peuvent dégrader la chromatographie des analytes.
- 4 - Dissoudre le résidu dans le 200µL d'acétate d'éthyle contenant 2 µl de citral/ml pour les extraits et dans 1mL d'acétate d'éthyle contenant 2 µl de citral/ml pour la solution de

calibration. Refermer le vial et mélanger afin de dissoudre le dérivé. Le volume de reprise peut être augmenté.

7. ANALYSE INSTRUMENTALE

Méthode utilisée : **GC/EI/MS/MS** :

→ Colonne : VA-5MS 30 m*0.25 mm*0.25 µm

Programme de température de la colonne :

80 °C _____ + 30°C/min. _____ 260 °C ___+30°C/min. ___ 300°C
 1.5 MIN. _____ 1 MIN. _____ 0 MIN.

Durée de l'analyse : 9.83 min.

Température du détecteur : 220 °C.

- Injecteur Splitless à 200°C

- Programme du split :

Temps (min.)	Split	Ratio du split (ml/min.)
Initial	Ouvert	25
0.01	Fermé	Fermé
1.50	Ouvert	25
8.00	Ouvert	25

Débit du gaz vecteur : 1 ml/min.(constant flow)

Volume injecté : 2 µl

Concentration détectable : 2.5 µg/l

Temps de rétention : AMPA : 3.95 min.

Glyphosate : 4.7 min.

Quantification

AMPA: Ion parent : 446.0 m/z

- $q_z = 0.3$

- Amplitude d'excitation CID : 82 volts

- Mode d'excitation non-résonant

- Quantification : Somme des ions de rapports m/z 283, 223 et 181.

- S/N>4

GLYPHOSATE:

- Ion parent : 612.0 m/z

- $q_z = 0.3$

- Amplitude d'excitation CID : 95 volts

- Mode d'excitation non-résonant

- Quantification : Somme des ions de rapports m/z 440, 321 et

261.

8. CRITERE DE QUALITE

8.1. SPECIFICITE

La méthode décrite s'applique à l'eau sous réserve qu'aucun composé ayant le même temps de rétention que les composés dérivés n'interfère.

8.2. LINEARITE

Avec le détecteur utilisé, les dérivés ont une réponse linéaire dans un domaine de concentration de 2.5 à 200 µg/L.

8.3. LIMITE DE DETERMINATION

La limite de quantification des composés (glyphosate et AMPA) est de 0.05 µg/l.

Annexe 4

**Résultats des analyses de pesticides dans les cours d'eau
et dans le Bassin d'Arcachon pendant l'été 1999.**

Station	Date	LQ (ng/l) =						
		Salinité	10 Diuron	10 Linuron	10 2.4 MCPA	2.5 Alachlore	2.5 Atrazine	2.5 Irgarol
Vigne	02/06/99		<LQ	<LQ	50	<LQ	<LQ	<LQ
Jacquets	02/06/99		<LQ	<LQ	150	<LQ	<LQ	<LQ
Tessillat	02/06/99		<LQ	<LQ	120	3	7	<LQ
Port Arcachon	02/06/99		35	<LQ	1110	4	9	23
Vigne	21/06/99							
Jacquets	21/06/99							
Tessillat	21/06/99	32,3	15	13	720	11	88	9
Port Arcachon	21/06/99	31,2	310	<LQ	<LQ	<LQ	34	95
Vigne	05/07/99	34,3	<LQ	<LQ	90	4	7	<LQ
Jacquets	05/07/99	32,8	<LQ	<LQ	60	<LQ	<LQ	<LQ
Tessillat	05/07/99	32,6	<LQ	<LQ	10	<LQ	<LQ	<LQ
Port Arcachon	05/07/99	31,8	74	<LQ	30	<LQ	5	45
Vigne	19/07/99	34,3	<LQ	<LQ	30	<LQ	<LQ	<LQ
Jacquets	19/07/99	33,6	20	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Tessillat	19/07/99	33,1	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	9.3
Port Arcachon	19/07/99	32,8	165	<LQ	140	<LQ	<LQ	73
Vigne	04/08/99	34,4	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Jacquets	04/08/99	33,5	20	<LQ	40	<LQ	<LQ	<LQ
Tessillat	04/08/99	33,1	<LQ	<LQ	70	<LQ	<LQ	<LQ
Port Arcachon	04/08/99	32,9	<LQ	<LQ	20	<LQ	3	23
Vigne	17/08/99	34,2	<LQ	<LQ	10	<LQ	<LQ	<LQ
Jacquets	17/08/99	33,4	<LQ	<LQ	180	<LQ	3	4
Tessillat	17/08/99	33,0	17	<LQ	30	<LQ	5	<LQ
Port Arcachon	17/08/99	32,8	55	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	34

Tableau A : Concentrations (ng/l) en pesticides mesurées dans les eaux du Bassin en 1999
(LQ = limite de quantification).

Station	Date	LQ (ng/l) = Salinité	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
			Métolachlore	Oxadiazon	Simazine	Dimethenamid	Lindane	Terbutylazine	Tebutame
Vigne	02/06/99		< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Jacquets	02/06/99		< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Tessillat	02/06/99		4	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Port Arcachon	02/06/99		< LQ	9	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Vigne	21/06/99								
Jacquets	21/06/99								
Tessillat	21/06/99	32,3	21	< LQ	< LQ	10	< LQ	3	< LQ
Port Arcachon	21/06/99	31,2	7	< LQ	< LQ	< LQ	102	3	< LQ
Vigne	05/07/99	34,3	3.6	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	13.8
Jacquets	05/07/99	32,8	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Tessillat	05/07/99	32,6	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Port Arcachon	05/07/99	31,8	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Vigne	19/07/99	34,3	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Jacquets	19/07/99	33,6	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Tessillat	19/07/99	33,1	12.5	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Port Arcachon	19/07/99	32,8	13.9	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Vigne	04/08/99	34,4	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	4
Jacquets	04/08/99	33,5	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Tessillat	04/08/99	33,1	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Port Arcachon	04/08/99	32,9	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Vigne	17/08/99	34,2	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Jacquets	17/08/99	33,4	2.6	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Tessillat	17/08/99	33,0	2.7	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Port Arcachon	17/08/99	32,8	2.8	< LQ	3.6	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ

Tableau B : Concentrations (ng/l) en pesticides mesurées dans les eaux du Bassin en 1999
(LQ = limite de quantification).

seuil (ng/l) =		25	25	10	5	5
Rivière	Date	Diuron	Amitrole	2,4 MCPA	Alachlore	Atrazine
Canal du Porge	02/06/99	<LQ	<LQ	60	<LQ	7
Cirès	02/06/99	<LQ	<LQ	340	7	<LQ
Lanton	02/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Ponteils	02/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Eyre	02/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Canal des Landes	02/06/99	<LQ	<LQ	220	<LQ	<LQ
Canal du Porge	21/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	22
Cirès	21/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Lanton	21/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Ponteils	21/06/99	<LQ	<LQ	140	<LQ	<LQ
Eyre	21/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	122	1161
Canal des Landes	21/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Canal du Porge	05/07/99	<LQ	<LQ	160	<LQ	<LQ
Cirès	05/07/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Lanton	05/07/99	<LQ	<LQ	<LQ	5	12
Ponteils	05/07/99	<LQ	<LQ	150	<LQ	<LQ
Eyre	05/07/99	<LQ	170	<LQ	<LQ	6
Canal des Landes	05/07/99	150	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Canal du Porge	19/07/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Cirès	19/07/99	<LQ	<LQ	90	<LQ	<LQ
Lanton	19/07/99	<LQ	<LQ	80	<LQ	<LQ
Ponteils	19/07/99	<LQ	<LQ	130	<LQ	<LQ
Eyre	19/07/99	<LQ	<LQ	<LQ	5	<LQ
Canal des Landes	19/07/99	20	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Canal du Porge	04/08/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Cirès	04/08/99	<LQ	<LQ	30	<LQ	<LQ
Lanton	04/08/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	22
Ponteils	04/08/99	<LQ	<LQ	310	<LQ	<LQ
Eyre	04/08/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Canal des Landes	04/08/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Canal du Porge	17/08/99	<LQ	<LQ	20	<LQ	<LQ
Cirès	17/08/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Lanton	17/08/99		<LQ			
Ponteils	17/08/99	<LQ	<LQ	30	<LQ	<LQ
Eyre	17/08/99	<LQ	<LQ	900	<LQ	<LQ
Canal des Landes	17/08/99	<LQ	<LQ	560	<LQ	<LQ

Tableau C : Concentrations (ng/l) en pesticides mesurées dans les eaux des rivières en 1999 (LQ = limite de quantification).

seuil (ng/l) =		5	5	5	5	5
Rivière	Date	Métolachlore	Oxadiazon	Simazine	DET	Folpet
Canal du Porge	02/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Cirès	02/06/99	22	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Lanton	02/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Ponteils	02/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Eyre	02/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	8
Canal des Landes	02/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Canal du Porge	21/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	7	10
Cirès	21/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Lanton	21/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Ponteils	21/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Eyre	21/06/99	167	88	<LQ	73	6
Canal des Landes	21/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Canal du Porge	05/07/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Cirès	05/07/99	<LQ	19.6	<LQ	<LQ	<LQ
Lanton	05/07/99	54	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Ponteils	05/07/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Eyre	05/07/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Canal des Landes	05/07/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Canal du Porge	19/07/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Cirès	19/07/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Lanton	19/07/99	9.5	20.6	47.5	<LQ	<LQ
Ponteils	19/07/99	<LQ	<LQ	13.8	<LQ	<LQ
Eyre	19/07/99	21	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Canal des Landes	19/07/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Canal du Porge	04/08/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Cirès	04/08/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Lanton	04/08/99	<LQ	30.1	12	<LQ	<LQ
Ponteils	04/08/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Eyre	04/08/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Canal des Landes	04/08/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Canal du Porge	17/08/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Cirès	17/08/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Lanton	17/08/99					
Ponteils	17/08/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Eyre	17/08/99	<LQ	<LQ	5	<LQ	<LQ
Canal des Landes	17/08/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

Tableau D : Concentrations (ng/l) en pesticides mesurées dans les eaux des rivières en 1999 (LQ = limite de quantification).

seuil (ng/l) =		5	5	5	5
Rivière	Date	Lindane	Terbutylazine	Tebutame	Dichlofluamid
Canal du Porge	02/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Cirès	02/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	14
Lanton	02/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Ponteils	02/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Eyre	02/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Canal des Landes	02/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Canal du Porge	21/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	57
Cirès	21/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Lanton	21/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Ponteils	21/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	90
Eyre	21/06/99	7	34	<LQ	1133
Canal des Landes	21/06/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Canal du Porge	05/07/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Cirès	05/07/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Lanton	05/07/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Ponteils	05/07/99	<LQ	<LQ	14.5	20
Eyre	05/07/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Canal des Landes	05/07/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Canal du Porge	19/07/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Cirès	19/07/99	<LQ	<LQ	<LQ	6
Lanton	19/07/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Ponteils	19/07/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Eyre	19/07/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Canal des Landes	19/07/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Canal du Porge	04/08/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Cirès	04/08/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Lanton	04/08/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Ponteils	04/08/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Eyre	04/08/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Canal des Landes	04/08/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Canal du Porge	17/08/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Cirès	17/08/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Lanton	17/08/99				
Ponteils	17/08/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Eyre	17/08/99	<LQ	<LQ	27	7
Canal des Landes	17/08/99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

Tableau E : Concentrations (ng/l) en pesticides mesurées dans les eaux des rivières en 1999 (LQ = limite de quantification).

Annexe 5

**Analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques contenus
dans des échantillons d'eaux du Bassin d'Arcachon.
Ecotoxicité des HAP sur les larves de Bivalves**

Annexe 5

ANALYSE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES CONTENUS DANS DES ECHANTILLONS D'EAUX DU BASSIN D'ARCACHON

ECOTOXICITE DES HAP SUR LES LARVES DE BIVALVES

H. Budzinski, K. Le Menach, O. Geffard

LPTC - UMR 5472 CNRS

Université Bordeaux I, 351 cours de la Libération 33405 Talence

1. Introduction

Les composés aromatiques sont ubiquistes. On les rencontre dans tous les environnements anciens ou récents. Ils sont considérés comme des contaminants prioritaires des écosystèmes tant terrestres que marins du fait de leur activité cancérigène et mutagène vis-à-vis de la faune et de la flore.

Leurs sources sont multiples (McElroy *et al.*, 1989). Il est établi que les HAP sont essentiellement d'origine pyrolytique. Néanmoins à côté de cette source majoritaire, les HAP sont également introduits dans l'environnement par contamination à partir de produits pétroliers (origine pétrogénique). Ils peuvent également dériver de la transformation de précurseurs naturels comme les triterpènes, pigments, stéroïdes (origine diagénétique ou biogénique), composés présents dans les organismes vivants. De nombreux auteurs ont montré également l'importance des apports de HAP par retombées atmosphériques sèches ou humides (Baek *et al.*, 1990). On peut trouver jusqu'à 7,9 ng/m³ (hiver 1986) de benzo(a)pyrène dans la phase particulaire de l'atmosphère d'une zone urbaine comme Paris (Masclat et Mouvier, 1988). Dans le cas de zones non urbaines, les apports par voie atmosphérique peuvent être relativement conséquents. Ainsi, dans le cas d'aérosols marins prélevés en Mer Méditerranée, Grimalt et Albaiges (1988) ont trouvé des concentrations en HAP pouvant aller jusqu'à 410 pg/m³. Ils ont pu estimer que les retombées atmosphériques par voie humide pouvaient représenter jusqu'à 120 µg/m²/an de HAP. Dans les eaux de pluies d'Europe centrale, on peut trouver jusqu'à 0,60 µg/L de HAP (Ballschmitter, 1992).

Il est apparu intéressant de caractériser le contenu des eaux en HAP du Bassin d'Arcachon car plusieurs sources potentielles de HAP peuvent exister dans ce bassin : tourisme nautique (moteurs), ostréiculture (moteurs et goudrons utilisés pour protéger les bois), eaux de ruissellement, apports atmosphériques, apports des cours d'eaux.

2. Analyse des HAP dans les eaux du Bassin d'Arcachon

2.1. Méthodes

Les prélèvements ont été réalisés sur les quatre même sites que pour les pesticides, à une seule occasion, le 19 août 1999, c'est à dire pendant la période où la navigation de plaisance (embarcations à moteur, notamment) est à son maximum dans la Baie. A chaque station, des prélèvements étaient réalisés en surface et au fond.

Les eaux brutes (2 l - eaux totales non filtrées - les eaux étaient très peu chargées en particules) sont extraites par extraction liquide/liquide avec du dichlorométhane (2 x 3 x 100 mL). Avant l'extraction, les eaux sont dopées avec des étalons internes aromatiques perdeutérés (phénanthrène d10, fluoranthène d10, chrysène d12, benzo(a)pyrène d12, benzo(e)pyrène d12, benzo(ghi)pérylène d12). L'extrait organique obtenu est séché sur Na₂SO₄ puis est reconcentré. Cet extrait est analysé directement par chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse (CG/SM) en mode de sélection des ions (ions moléculaires des HAP recherchés). La quantification se fait par étalonnage interne après avoir calculé les coefficients de réponse pour chaque composé avec des solutions étalons.

2.2. Résultats et discussion

Les résultats des dosages sont rassemblés dans le tableau F.

Les eaux de fond apparaissent comme plus chargées à l'exception du port d'Arcachon. On remarque que la station Jacquets, située dans l'angle nord de la Baie est plus polluée par les HAP que Tessillat, au sud-est.

Les concentrations mesurées sont très largement en dessous des solubilités théoriques des HAP qui vont de 1 mg/l pour le phénanthrène à moins de 1 µg/l pour les composés penta- et hexa-aromatiques.

On peut comparer ces résultats à des données concernant d'autres environnements. Bouloubassi et Saliot (1992) dans le cas des eaux de surface du delta du Rhône ont trouvé des concentrations en phénanthrène de quelques ng/l (2 à 115), en pyrène et fluoranthène de 5 à 15 ng/l et allant de quelques centaines de pg/l à quelques ng/l pour les penta-aromatiques (benzofluoranthènes et benzopyrènes).

Boussugue *et al.* (1976) ont trouvé des concentrations en hydrocarbures aromatiques totaux au large du cap blanc (atlantique tropical est) allant de quelques ng/l à quelques centaines de ng/l.

Maki (1991) fait état de valeurs considérées comme "bruit de fond" pour les HAP d'environ 20 ng/L dans le cas des eaux d'Alaska dans une étude concernant la marée noire de l'Exxon Valdez.

Nos résultats se situent dans le même ordre de grandeur mais se positionnent plutôt vers le niveau bas de leurs gammes de concentrations. Les concentrations mesurées apparaissent comme assez faibles et tout à fait compatibles avec un milieu marin relativement peu contaminé en HAP à l'état dissous.

Il est néanmoins important de faire une remarque quant à la représentativité de l'échantillonnage. Les eaux analysées étaient très peu chargées en matériel particulaire; hors il est reconnu que les HAP ont tendance à s'adsorber sur les particules. On peut supposer que dans le cas d'eaux plus chargées en particules les concentrations auraient été plus importantes. Il aurait d'ailleurs alors été judicieux d'effectuer une double détermination de concentrations pour la phase dissoute et la phase particulaire.

Composés	Concentrations des composés (pg /l)							
	La Vigne		Jacquets		Comprian		Port Arcachon	
	S	F	S	F	S	F	S	F
Phénanthrène	510	1900	220	1900	nq	1460	70	1100
Anthracène	nq	310	80	200	nq	60	nq	210
Fluoranthène	600	1320	2110	2900	860	1370	2420	1190
Pyrène	830	1650	2220	2950	720	1710	3820	2830
Benz(a)anthracène	220	320	506	710	204	410	560	260
Chrysène + Triphénylène	670	640	1500	1640	400	720	1970	650
Benzofluoranthènes	nq	810	890	2210	420	1010	2810	520
Benzo(e)pyrène	nq	960	365	860	150	420	890	170
Benzo(a)pyrène	nq	540	350	1080	140	560	750	230
Perylène	nq	210	60	220	nq	230	170	60
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	260	460	80	710	20	400	1130	120
Benzo(ghi)pérylène	480	410	160	680	60	410	640	130
TOTAL	3570	9530	8541	16060	2974	8760	15230	7470

Tableau F : Concentrations mesurées pour les HAP dans les eaux du Bassin d'Arcachon.
(S = surface ; F = Fond, nq = non quantifiable)

3. Toxicité des HAP sur les larves de l'huître creuse *Crassostrea gigas*

Il existe peu de travaux traitant de la toxicité des HAP sur les organismes aquatiques. Notamment, nous n'avons pas trouvé dans la littérature de données concernant l'effet de ces molécules sur le développement du phytoplancton.

Par contre, on dispose des résultats récents, non encore publiés, de travaux réalisés par le laboratoire DEL/PC d'Arcachon au sujet de la toxicité des HAP sur le premier (embryotoxicité) ou les premiers (croissance larvaire selon la méthode décrite au chapitre 7) stade(s) du développement des larves d'huîtres creuses.

3.1. Tests d'embryotoxicité

Dans ces tests, les œufs fécondés sont placés dans les différents traitements et, après 24 heures, le pourcentage d'anomalie des larves formées est comptabilisé. Ce test présente l'avantage de s'adresser au stade le plus fragile du développement larvaire des bivalves.

La toxicité de deux HAPs (Phénanthrène, Benzo(a)pyrène) présents dans les eaux du Bassin a été déterminée à l'aide de tests d'embryotoxicité chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Ces trois HAP ont été mis à saturation dans de l'eau de mer, puis testés à différentes dilutions. Par ailleurs, l'effet de solutions contenant plusieurs HAP a été testé dans les mêmes conditions.

Résultats

- **Phénanthrène** : Ce HAP présente des effets délétères sur le développement embryonnaire de *C. gigas*. La EC50 (concentration ayant un effet sur 50 % de la population) calculée est de

1.1 mg.l⁻¹, et la NOEC (concentration la plus forte testée sans effets) est de 0,4 mg.l⁻¹, soit environ une concentration 200 fois supérieure à la valeur maximale que l'on a mesurée dans le Bassin.

- **Benzo(a)pyrène** : A saturation, c'est à dire à la concentration de 3,78 µg.l⁻¹ (seuil de solubilité du produit), aucun effet délétère n'est mis en évidence. Par conséquent, la LOEC (plus faible concentration ayant un effet significatif sur les embryons) se situe au-dessus de cette concentration. Les concentrations maximales mesurées dans le Bassin sont près de 4 fois inférieures au seuil de solubilité de cette molécule.

- **Solution contenant un mélange de HAPs :**

Des études de toxicités ont été réalisées avec des eaux de mer enrichies en HAPs par agitations avec un sédiment naturel, caractérisé par sa contamination en HAP. Cette eau a ensuite été testée sur des embryons et larves de *Crassostrea gigas*.

Les concentrations en HAP de cette eau sont consignées dans le tableau G.

Composés	1.1.1.1.2 Concentration (pg/l)
Phénanthrène	189000
Anthracène	27000
Fluoranthène	326000
Pyrène	417000
Benz(a)anthracène	144000
Chrysène + Triphénylène	170000
Benzofluoranthènes	401000
Benzo(e)pyrène	130000
Benzo(a)pyrène	189000
Pérylène	55000
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	169000
Benzo(ghi)pérylène	133000
Total (pg/l)	2350000

Tableau G : concentration en HAP (pg/l) dans l'eau de mer enrichie par agitation de sédiments pollués.

Ce traitement n'a induit aucun effet délétère sur le développement embryonnaire de l'huître *Crassostrea gigas*. Il faut remarquer que les concentrations mesurées dans cette eau sont beaucoup plus élevées que celles qui ont été mesurées dans les eaux du Bassin.

3.2. Tests de croissance larvaire

Des tests sur la croissance larvaire de *Crassostrea gigas* (méthode décrite au chapitre 7) ont été réalisés avec différentes eaux de mer enrichies en HAPs, dont les concentrations sont rapportées dans le tableau H.

Ces différents traitements, dans lesquels les concentrations en HAPs sont beaucoup plus élevés que celles mesurées dans les eaux du Bassin, n'ont pas affecté la croissance des larves par rapport à un élevage témoin réalisé sans ajout d'HAP.

Composés	1.1.1.1..3 Concentration (pg/l)				
	Phénanthrène	141000	238000	297000	327000
Anthracène	55000	76000	0	92000	63000
Fluoranthène	396000	355000	608000	422000	300000
Pyrène	620000	573000	472000	636000	342000
Benz(a)anthracène	124000	169000	172000	167000	42000
Chrysène + Triphénylène	465000	684000	516000	351000	636000
Benzofluoranthènes	649000	589000	538000	610000	410000
Benzo(e)pyrène	227000	205000	196000	219000	151000
Benzo(a)pyrène	316000	299000	276000	315000	200000
Pérylène	76000	76000	73000	77000	57000
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	288000	273000	245000	293000	223000
Benzo(ghi)pérylène	274000	228000	203000	259000	183000
Total (pg/l)	3631000	3765000	3596000	3768000	2918000

Tableau H : concentration en HAP (pg/l) dans l'eau de mer enrichie.

Les résultats de ces expériences montrent que les concentrations en HAP mesurées dans les eaux du Bassin pendant l'été ne sont pas susceptibles d'occasionner des troubles dans le développement des larves de *Crassostrea gigas*.

4. Conclusion

Les teneurs en HAP mesurées au mois d'août 1999 dans les eaux du Bassin sont basses et caractéristiques d'eaux marines faiblement contaminées.

On ne dispose pas de renseignements concernant la toxicité de ces concentrations vis à vis du phytoplancton mais il apparaît qu'elles sont inoffensives pour le développement larvaire des huîtres creuses.

Annexe 6

Annexe 6

Evaluation du niveau de contamination du Bassin d'Arcachon par le Tributylétain (TBT) et ses produits dérivés par un indicateur biologique : l'imposex chez *Ocenebra erinacea*.

Proposition de programme

Présentation de la problématique

Entre le début des années 1970 et 1980, le Bassin d'Arcachon a subi des perturbations liées à l'utilisation de peintures antisalissures à base d'organostaniques (Tributylétain - TBT). Deux espèces marines ont été particulièrement affectées par les effets du TBT : l'huître creuse *Crassostrea gigas* (forte incidence sur la calcification des coquilles et sur les stades larvaires) et le Bigorneau perceur *Ocenebra erinacea*.

Chez ce dernier, le TBT induit une anomalie du tractus génital (Féral, 1982), se traduisant par une masculinisation des femelles, le processus ultime étant la stérilité de celles-ci. Ce mécanisme est désigné sous le terme d'imposex. A terme, ces anomalies provoquent une forte diminution des abondances de ce gastéropode.

Gibbs *et al.* (1990), ainsi que Stroben *et al.* (1995) ont montré que l'imposex chez le bigorneau perceur, *Ocenebra erinacea*, était un bon indicateur biologique du niveau de contamination par les TBT et ses produits dérivés. Ces auteurs ont établi une échelle de contamination en fonction du développement de cette anomalie (VDSI : Vas Deferens Sequence Index).

Par rapport à des analyses chimiques, l'utilisation de cet indice présente un triple intérêt :

- intégrer la variabilité spatiale et temporelle de la pollution
- donner une réponse biologique spécifique de ce type de micropolluant.
- présenter enfin un coût plus réduit que les méthodes analytiques.

Bien que l'usage de ces peintures à base de TBT ait été strictement réglementé à partir de 1982, des mesures récentes réalisées dans les eaux et les sédiments du Bassin (Sarradin *et al.*, 1991 ; Michel et Averty, 1998) montrent que les niveaux de contamination résiduelle de certaines zones de la Baie demeurent encore relativement élevés.

Parallèlement, une étude réalisée au printemps 1995 (Fernandez-Castro *et al.*, 1996) sur les populations de Bigorneaux perceurs de 9 stations du Bassin a permis de montrer que toutes les femelles examinées étaient atteintes par l'imposex, à des niveaux plus ou moins importants selon les zones.

D'autres expériences, réalisées en 1997, ont consisté à rechercher les sources possibles de contamination en réalisant des transferts de populations d'*Ocenebra* entre différentes zones du Bassin ; elles indiquent que les ports (Arcachon et La Vigne) sont contaminés toujours par le TBT (résultats non publiés).

Proposition de programme :

Au cours du printemps 1999, nous nous proposons d'effectuer deux actions différentes :

1)- Dépouillement des résultats acquis en 1997. Avec mise en évidence des sources de contamination possible.

2) - Nouvelle campagne de prélèvements au printemps d'une année à définir sur les mêmes points que ceux qui ont été échantillonnés en 1995 pour évaluation du degré d'atteinte par l'imposex des populations d'*Ocenebra erinacea*. Comparaison de la contamination avec les observations antérieures, pour rechercher une éventuelle modification de l'étendue de la contamination.

Coût :

- Prélèvements :		
Temps agent IFREMER : 2 jours non cadre		4800 F
- Observations et rédaction d'un rapport		
2 mois de salaire étudiant		25 000 F
Total		29 800 F

Références bibliographiques

- Gibbs P. E., G. W. Bryan, P. L. Pascoe & G. R. Burt, 1990. Reproductive abnormalities in female of *Ocenebra erinacea* resulting from tributyltin-induced imposex. *J. mar. biol. Ass U. K.*, **70**, 639-656.
- Féral C. F., 1982. Etude expérimentale des mécanismes assurant l'apparition, le maintien et le cycle d'un tractus génital mâle externe chez les femelles de *Nucella lapillus* (L), *Nassarius reticulatus* (L), *Ocenebra erinacea* (L), Mollusques néogastéropodes gonochoriques. Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Caen, 183 p.
- Fernandez Castro N., E. His & C. Cantin, 1996. Contamination par le tributylétain du Bassin d'Arcachon évaluée à l'aide d'un indicateur biologique : l'imposex chez *Ocenebra erinacea*. Résultats préliminaires. *Cons. Intern. Explor. Mer, Marine Environm. Quality Committee*, CM 1996 : **10**, 6p.
- Michel P. & Averty B., 1998. Bilan 1997 de la contamination des eaux côtières françaises par les composés organostanniques. Rapport Interne IFREMER, DEL/98.05/Nantes, 39 p.
- Sarradin P. M., A. Astruc, V. Dezauniers, R. Pinel & M. Astruc, 1991. Butyltin pollution in surface sediments of Arcachon Bay after ten years of restricted use of TBT-based paints. *Environm. Technol.* **12**, 537-543.
- Stroben, E., U. Schulte-Oehlman, P. Fioroni & J. Oehlman, 1995. A comparative method for easy assessment of coastal pollution by the degree of imposex in Prosobranch species. *Haliotis* **24**, 1-12.