

# **THESE DE DOCTORAT**

présentée à

**L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE**

En vue de l'obtention du titre de

**DOCTEUR EN CHIMIE**

Spécialité : chimie marine

**LE CYCLE DE L'AZOTE EN ECOSYSTEME COTIER :  
DEVELOPPEMENT D'UN ANALYSEUR  
SUBMERSIBLE POUR LA MESURE IN SITU DES  
NITRATES ET NITRITES; VARIATIONS  
SAISONNIERES DE LA PRODUCTION AZOTEE  
PHYTOPLANCTONIQUE**

par

**Anne DANIEL**

Soutenue en mai 1995 devant le jury composé de :

Pr. Paul TREGUER, Université de Bretagne Occidentale, Brest  
Pr. Paul WORSFOLD, University of Plymouth, Plymouth  
Dr. Léo GOEYENS, Université libre de Bruxelles, Bruxelles  
Dr. Dominique BIROT, Ifremer, Brest  
Dr. Bernard QUEGUINER, Université de Bretagne Occidentale, Brest  
Dr. Jacques PONCIN, Université de Bretagne Occidentale, Brest

## Avant propos

*La conduite de ce travail n'aurait pu être menée à terme sans le concours de nombreuses personnes. Aussi je tiens à remercier sincèrement tous ceux qui, de près ou de loin, par un moyen ou un autre, ont contribué à l'élaboration de cette étude.*

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance aux membres du jury pour avoir accepté d'examiner cette étude. Ils m'ont apporté chacun à divers titres leur aide précieuse et leurs avis critiques, et permis de bénéficier de leur grande expérience dans leur domaine respectif. J'ai ainsi eu l'opportunité d'appréhender deux spécialités différentes mais très complémentaires.

Monsieur Paul Tréguer, professeur à l'Université de Bretagne Occidentale et directeur de l'URA CNRS 1513, est l'initiateur de ce projet de recherche. Je le remercie pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et pour les conseils qu'il m'a prodigué durant ces trois années.

Monsieur Dominique Birot, ingénieur au laboratoire d'instrumentation océanographique à l'Ifremer, m'a permis de découvrir le domaine des capteurs chimiques. Ses conseils et ses encouragements m'ont été précieux dans la réalisation de ce travail.

Monsieur Léo Goeyens, docteur à l'Université libre de Bruxelles, m'a accueillie chaleureusement à Bruxelles lors d'un stage au sein de son équipe où j'ai pu profiter de sa grande expérience sur les mesures de productions basées sur le traceur  $^{15}\text{N}$ .

Monsieur Paul Worsfold, professeur à l'Université de Plymouth, spécialiste de la FIA en milieu marin, me fait l'honneur d'accepter de participer à ce jury. Je lui adresse mes remerciements les plus sincères.

Monsieur Michel Glémarec, professeur à l'Université de Bretagne Occidentale, a accepté avec beaucoup de gentillesse de faire partie de ce jury.

Monsieur Bernard Quéguiner, maître de conférence à l'Université de Bretagne Occidentale, m'a permis de bénéficier de sa grande connaissance du phytoplancton marin au cours de nombreuses discussions.

Monsieur Jacques Poncin, maître de conférence à l'Université de Bretagne Occidentale, a accepté de prendre part à ce jury.

Merci, merci à Bernard Leïldé, Eric Menut et Henri Floc'h grâce à qui le colo est passé d'un bricolage de labo à la formule tout terrain d'aujourd'hui. C'est grâce à leur soutien quotidien que ce travail s'est toujours déroulé dans la bonne humeur. Je tiens à associer à ces remerciements toutes les personnes des services IO et ECP à qui j'ai pu emprunter du matériel et qui m'ont beaucoup appris en optique, informatique, électronique et mécanique.

Je ne saurai oublier la disponibilité et l'aide technique de Annick Masson ainsi que l'aide des nombreuses personnes avec qui j'ai eu le plaisir d'aller visiter R3, de filtrer, d'analyser et enfin d'avoir des discussions toujours très enrichissantes (la liste est trop longue pour ne pas oublier quelqu'un). Je remercie également le plus grand bénévole de ce travail qui n'a pas hésité à aller se mouiller les pieds à Guily-Glaz.

C'est grâce à l'aide des équipages des navires Ste Anne du Portzic, Valeureux, Efficace, Laborieux, Utile, Thalia, Gwen Drez et Côte d'Aquitaine que le travail en mer a pu se dérouler dans les meilleures conditions.

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	1
------------------------------------	---

## PREMIERE PARTIE

### DEVELOPPEMENT D'UNE INSTRUMENTATION POUR LA MESURE IN SITU DES NITRATES ET NITRITES EN MILIEU COTIER

<b>INTRODUCTION</b> .....	4
<b>CHAPITRE 1 : ETAT DE L'ART EN ANALYSE DES NITRATES DANS L'EAU DE MER</b> .....	5
1.1. Revue de différentes méthodes analytiques .....	5
1.2. La loi de Beer-Lambert .....	7
1.3. La méthode manuelle .....	8
1.3.1. <i>L'analyse des nitrites</i> .....	8
1.3.2. <i>L'analyse des nitrates</i> .....	9
1.4. Automatisation de la méthode d'analyse .....	13
1.4.1. <i>Flux segmenté</i> .....	14
1.4.2. <i>Flow Injection Analysis (FIA)</i> .....	19
<b>CHAPITRE 2 : CHOIX D'UNE METHODE ANALYTIQUE ADAPTEE A LA MESURE IN SITU</b> .....	22
2.1. Objectifs .....	22
2.2. Avantages et inconvénients de différentes méthodes d'analyse .....	23
2.2.1. <i>Méthode volumétrique</i> .....	23
2.2.2. <i>Flux segmenté</i> .....	23
2.2.3. <i>Flux non segmenté</i> .....	25
2.2.4. <i>Flow Injection Analysis</i> .....	27
2.3. Adaptation de la FIA à la mesure in situ .....	29
2.3.1. <i>Effet de sel</i> .....	29

**2.3.2. "Characterization and reduction of interferences in flow injection analysis for in situ measurements of nitrate and nitrite in seawater."**

Anne Daniel, Dominique Birot, Michel Lehaitre, Jacques Poncin

*Article sous presse dans Analytica Chimica Acta*



<b>CHAPITRE 3 : MISE AU POINT D'UNE MAQUETTE DE FAISABILITE POUR LA MESURE IN SITU DES NITRATES EN MILIEU COTIER</b>	31
3.1. La marinisation	31
3.2. Caractéristiques de la maquette de faisabilité	32
3.2.1. <i>Présentation générale de la maquette de faisabilité</i>	32
3.2.2. <i>Structure mécanique</i>	34
3.2.3. <i>Module analytique</i>	34
3.2.4. <i>Module optique</i>	38
3.2.5. <i>Module électronique immergé</i>	40
3.2.6. <i>Système de contrôle à bord</i>	40
3.3. Essais des différents composants dans un caisson hyperbare	40
3.3.1. <i>Description du caisson hyperbare</i>	43
3.3.2. <i>Essai de la pompe en pression</i>	43
3.3.3. <i>Essai des vannes en pression</i>	43
3.4. Validation du système en rade de Brest :	45

**"A submersible flow-injection analyser for the in situ determination of nitrite and nitrate in coastal waters."**

Anne Daniel, Dominique Birot, Stéphane Blain, Paul Tréguer,  
Bernard Leïldé, Eric Menut

*Article sous presse dans Marine Chemistry*

## DEUXIEME PARTIE

### LA PRODUCTION AZOTEE PHYTOPLANCTONIQUE EN RADE DE BREST

#### INTRODUCTION

<b>CHAPITRE 1 - METHODOLOGIE</b>	48
1.1. Stratégie de prélèvement	48
1.2. Paramètres physiques	50
1.2.1. <i>Les débits</i>	50
1.2.2. <i>L'ensoleillement et les précipitations</i>	50
1.2.3. <i>La température de l'eau</i>	50
1.2.4. <i>La salinité</i>	50
1.2.5. <i>L'irradiance</i>	50
1.2.6. <i>L'oxygène dissous</i>	51

1.3. Les sels nutritifs.....	51
1.3.1. Les nitrates et nitrites.....	51
1.3.2. L'ammonium.....	51
1.3.3. L'urée.....	51
1.3.4. Les silicates.....	52
1.3.5. Les phosphates.....	52
1.4. Composition de la matière particulaire.....	52
1.4.1. Chlorophylle <i>a</i> et phéopigments.....	52
1.4.2. Carbone et azote particulaire.....	53
1.4.3. Détermination des espèces phytoplanctoniques.....	53
1.4.4. Validation de la technique de fractionnement.....	53
1.5. La production primaire.....	54
1.5.1. Incubation <i>in situ</i> simulée.....	54
1.5.2. La production carbonée.....	54
1.5.3. La production azotée.....	54

## **CHAPITRE 2 - LA RADE DE BREST : CARACTERISTIQUES GENERALES ET FLUX D'AZOTE INORGANIQUE DISSOUS**.....

2.1. Présentation de la rade de Brest.....	61
2.1.1. Le cadre géographique.....	61
2.1.2. Les apports fluviaux.....	61
2.1.3. L'influence des marées.....	62
2.1.4. Hydrologie de la rade.....	62
2.2. La relation rade-fleuves.....	63
2.2.1. Description des deux principaux fleuves.....	63
2.2.2. Variation interannuelle et saisonnière de la teneur en azote inorganique dissous dans l'Aulne et l'Elorn.....	65
2.2.3. Relation débit-teneur en azote inorganique dissous.....	68
2.3. La relation rade-Iroise.....	70
2.4. Les rejets urbains.....	72
2.5. Les apports atmosphériques.....	73
2.6. Les échanges à l'interface eau-sédiment.....	73
2.7. L'azote inorganique dissous en rade de Brest.....	74
2.7.1. Evolution de l'azote inorganique dissous en surface.....	74
2.7.2. Evolution saisonnière de l'azote inorganique dissous dans la colonne d'eau.....	76

# **CHAPITRE 3 - LA FLORAISON PRINTANIERE EN RADE DE BREST : EVOLUTION INTERANNUELLE DE LA PRODUCTION D'AZOTE ORGANIQUE PARTICULAIRE**

3.1. Conditions générales du milieu.....	81
3.1.1. Paramètres météorologiques et hydrologiques.....	81
3.1.2. Paramètres physiques.....	82
3.1.3. Paramètres chimiques.....	87
3.1.4. Paramètres biologiques.....	88
3.2. La production primaire en rade de Brest.....	96
3.2.1. Evolution interannuelle des productions azotée et carbonée dans les eaux de surface de la rade de Brest.....	96
3.2.2. Absorption des différentes formes d'azote dissous.....	99
3.2.3. Absorption de l'azote inorganique dissous et du carbone par les différentes classes de taille du phytoplancton au printemps 1993.....	103
3.2.4. Absorption de l'azote inorganique dissous dans la colonne d'eau.....	107
3.3. Discussion.....	109
3.3.1. Déclenchement de la floraison printanière.....	109
3.3.2. Absorption azotée et disponibilité des sels azotés dissous.....	109
3.3.3. Déphasage de la production azotée avec la biomasse et la production carbonée.....	111
3.3.4. Evolution comparée des rapports de biomasse et de production en carbone et en azote.....	114
3.3.5. Relation entre l'absorption des nitrates et la teneur en ammonium.....	116
3.3.6. Détermination de la forme azotée préférée (RPI).....	118
3.3.7. Régime de production.....	121

<b>CONCLUSION GENERALE</b>	124
----------------------------	-----

<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	128
----------------------	-----

<b>ANNEXES</b>	140
----------------	-----

## Introduction Générale

Depuis les travaux de Boussingault au XIX<sup>ème</sup> siècle, l'azote est considéré comme un élément essentiel à la croissance des plantes. La généralisation de l'usage de fertilisants en agriculture après la mise au point de la synthèse industrielle de l'ammoniac, à la veille de la première guerre mondiale, a entraîné la première révolution verte. Cette utilisation massive d'engrais azotés a provoqué une croissance des rendements agricoles : ils ont été multipliés par cinq en France depuis l'après guerre. Mais, cet important apport de fertilisants n'est pas sans conséquences pour l'environnement. En effet, suivant la quantité azotée (fumure minérale ou organique) épandue et le moment de l'application (saison et niveau de la pluviosité), les nitrates peuvent être entraînés par lessivage des sols vers les cours d'eaux ou diffusés à travers le sol en direction des nappes phréatiques. L'ammonium ne subit pas le même phénomène car il est lié aux argiles du sol par des forces électrostatiques chargées négativement. Ainsi, depuis une vingtaine d'années, on assiste à un accroissement du nombre de publications traitant de l'augmentation de teneur en nitrates dans les cours d'eaux (Casey et al. 1979, Van Bennekom et al. 1981, Meybeck et al. 1989, Smayda 1990, Materne et al. 1991, Nixon 1993). Si la cause de cette pollution est généralement imputée aux cultivateurs et éleveurs, il faut aussi tenir compte des apports urbains et industriels directs ou indirects (stations d'épurations, pluies acides : Smetacek et al. 1991, Guillaud et al. 1992, Scudlark et al. 1993). Cette pollution a plusieurs effets néfastes. Tout d'abord, les nitrates et nitrites représentent une source de toxicité pour les êtres vivants: l'organisation mondiale pour la santé a fixé la dose journalière maximale admissible par un adulte à  $3.65 \text{ mg NO}_3 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ . Au delà de cette dose, il peut s'en suivre des troubles plus ou moins graves (manque d'oxygénation des tissus dû à la méthémoglobinémie, ou encore formation de nitrosamines cancérigènes, Meyer et al., 1993). D'autre part, l'augmentation constante de la teneur en azote dans les eaux fluviales et côtières contribue au déséquilibre écologique provoquant le phénomène d'eutrophisation. Si un apport

d'éléments nutritifs peut être bénéfique dans une certaine mesure en constituant une fertilisation du milieu, un excès devient vite dommageable pour la vie de l'estuaire : il entraîne une augmentation de la production phytoplanctonique qui peut aboutir à des développements anormaux d'algues vertes (ulves sur les côtes de Bretagne nord et dans les lagunes telles que Venise, Piriou 1990), à des efflorescences phytoplanctoniques dont la dégradation bactérienne provoque une anoxie surtout au niveau du fond (German Bight, Kattegat, Baie de Vilaine) ou encore, à des floraisons exceptionnelles de phytoplancton dont certaines espèces synthétisent des biotoxines toxiques pour les organismes aquatiques (*Gyrodinium aureolum*) et pour l'homme, en temps que consommateur de coquillages (*Gyrodinium Dinophysis*).

De nombreuses mesures techniques et administratives ont été proposées pour protéger la qualité des eaux douces, côtières et marines contre la pollution causée par les composés azotés. Ainsi, l'agriculture peut considérablement contribuer à la réduction de la pollution nitrique en équipant les élevages de fosses à lisiers ou à purin ayant une capacité de stockage de 6 mois, en encourageant les cultures d'hiver pour ne pas laisser le sol nu pendant les périodes à risques, en ajustant les apports d'azote minéral aux besoins des cultures en tenant compte de la fourniture propre au sol et en fractionnant les épandages d'engrais, etc... De même, l'élimination des sources ponctuelles (traitement des eaux urbaines et industrielles) est possible par l'installation d'étages de dénitrification dans les stations d'épuration.

Mais, parallèlement à l'effort collectif entrepris pour réduire la pollution azotée, la surveillance des teneurs des sels azotés dans le temps et l'espace reste essentielle pour permettre une meilleure compréhension du fonctionnement des écosystèmes côtiers et par conséquent, pour évaluer le degré d'eutrophisation du milieu. Ce suivi de la qualité des eaux implique une augmentation de la collecte de données en temps réel. De ce fait, de multiples programmes internationaux et diverses activités (aquaculture, tourisme) font de plus en plus appel à l'utilisation de techniques de suivi des paramètres de qualité du milieu à haute fréquence. Les premiers paramètres de base sont d'ores et déjà accessibles aux capteurs de mesures (température, salinité, oxygène dissous, turbidité). Par contre, les sondes permettant la mesure in-situ des sels nutritifs dans le milieu marin sont peu nombreuses. ***La connaissance en temps réel de ces paramètres-clefs de la qualité des eaux côtières étant primordiale, la première partie de ce travail s'est portée sur le développement d'une instrumentation pour la mesure in-situ des nitrates et nitrites en milieu côtier.*** Cette étude a débuté au laboratoire par l'évaluation des différentes techniques analytiques (basées sur la colorimétrie) permettant le dosage de ces sels. La technique répondant le mieux aux contraintes opérationnelles fixées par le cahier des charges a ensuite été testée dans des conditions simulant la mesure in situ (variation de température, de pression et de salinité). Un travail portant sur le circuit optique et le traitement du signal a permis de réduire les interférences observées lors des tests menés dans les conditions *in situ* simulées. Les résultats sont présentés au sein d'un article sous presse dans *Analytica Chimica Acta*. La phase ultérieure de marinisation de l'appareillage a porté sur la

ultérieure de marinisation de l'appareillage a porté sur la recherche de composants les plus aptes à remplir les conditions fixées par le cahier des charges, puis à les tester en milieu simulé. La description de la maquette de faisabilité de l'analyseur, ainsi que les tests menés en rade de Brest et en mer d'Iroise, font l'objet d'une publication sous presse dans *Marine Chemistry*.

En parallèle à cette étude technologique, **la seconde partie de ce travail a porté sur la dynamique de la production azotée dans un écosystème soumis à d'importantes perturbations : la rade de Brest**. En effet, si les programmes déjà entrepris sur ce site dans le passé (SAUM, ECORADE, TBA,...) ont permis de connaître les bases du fonctionnement de ce site très représentatif des eaux côtières bretonnes, la réalisation d'une étude détaillée sur le comportement des composés azotés dans le dissous et le particulaire s'est révélée particulièrement importante en raison de l'accroissement spectaculaire des teneurs en nitrates observé au cours des dernières années. Pour ce faire, un suivi des teneurs des sels nutritifs, de la composition de la matière particulaire et de la production phytoplanctonique a été mené entre 1991 et 1993 à R3, station représentative de la rade de Brest. Le premier objectif est de dresser un bilan des flux d'azote inorganique dissous en rade de Brest au niveau des fleuves, de l'Iroise, du sédiment, des apports atmosphériques, des rejets urbains. Le but principal de ce travail est d'observer la relation entre la disponibilité des différentes sources azotées (nitrates, ammonium, urée) et leur absorption, puis, d'en déduire la forme azotée préférentiellement absorbée et le régime de production (nouvelle ou régénérée) opérant en rade. Afin d'aider à la compréhension du système, la part de chaque classe de taille (microplancton, nanoplancton et picoplancton) dans l'absorption des nitrates et de l'ammonium a été observée dans les eaux de surface en 1993. De même, il a semblé indispensable de déterminer le comportement de l'absorption des nitrates et de l'ammonium sur l'ensemble de la colonne d'eau. Enfin, l'évolution de la production azotée sera comparée à celle de la biomasse et celle de la production carbonée.

## **Première partie**

### **Développement d'une instrumentation pour la mesure in situ des nitrates et nitrites en milieu côtier**



# Introduction

Aujourd'hui, les sciences de la mer passent d'une période d'exploration, d'observation et de prélèvements ponctuels à une ère de mesure multi-paramètres et de collectes de données sur de grandes échelles spatiales et temporelles. Cette évolution de l'océanographie est intimement associée aux possibilités qu'offre une nouvelle instrumentation, où les capteurs tiennent une place déterminante. Un capteur peut être défini comme "un dispositif qui permet d'avoir une représentation quantitative de la valeur d'une grandeur" (Martinat, 1992). Généralement, la grandeur à mesurer est appréhendée grâce à une loi physique permettant la traduction de la grandeur en une autre (souvent électrique) plus facilement manipulable. L'information résultante est alors traitée grâce à une électronique de conditionnement plus ou moins sophistiquée. L'ensemble est rassemblé dans un boîtier qui sera disposé dans le milieu à mesurer (sans le perturber) et qui devra transmettre à l'observateur l'information à exploiter par le biais de connexions.

L'élaboration d'un analyseur submersible permettant d'effectuer la mesure in-situ des nitrates comporte plusieurs phases. Tout d'abord, les capteurs doivent avoir une sensibilité et précision comparables à celles obtenues en laboratoire. Aussi, la conception d'un tel équipement doit être basée sur une technique reconnue et avoir une contrainte de crédibilité (étalonnage et intercalibration). La recherche au laboratoire d'une méthode d'analyse qui ne soit, ni influencée par les variations des conditions extérieures (température, pression), ni soumise à d'éventuelles interférences provoquées par des composants présents dans le milieu à analyser, est donc fondamentale. Ensuite, la phase de marinisation du système implique une recherche de composants compatibles aux exigences fixées par le cahier des charges puis leurs tests en milieu simulé. L'évaluation de la méthode analytique pourra ensuite s'effectuer à l'aide de la maquette de faisabilité lors de campagnes en mer.



# Chapitre 1

## Etat de l'art en analyse des nitrates dans l'eau de mer

### 1.1. Revue de différentes méthodes analytiques

De nombreuses méthodes électrochimiques et spectrométriques ont été proposées pour déterminer la teneur des nitrates dans l'eau. Mais, un grand nombre d'entre elles sont souvent difficiles à utiliser en océanographie en raison d'interférences provoquées par certains ions présents dans l'eau de mer, de limites de détection trop élevées, de temps de réaction trop importants.

La méthode polarographique, mise au point par Chow et Robinson (1953), possède une bonne précision et une faible sensibilité, mais elle n'est pas du tout adaptée à une utilisation à bord de navires océanographiques. De même, l'électrode sélective à nitrates est très efficace pour les analyses en eau douce (Langmuir et al., 1970) mais soumise, lors d'analyses en eau de mer, à des effets interférents causés par les ions  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  et  $\text{HCO}_3^-$  (Keeney et al., 1970). La seule façon de les supprimer est de précipiter les ions  $\text{SO}_4^{2-}$  en  $\text{BaSO}_4$  et d'adsorber les ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{HCO}_3^-$  sur des résines échangeuses d'ions. Le seuil de sensibilité demeure cependant très élevé.

Le dosage des nitrates peut aussi s'effectuer par différentes méthodes spectrométriques. La détermination de très faibles concentrations de nitrates en eau de mer a pu se faire récemment grâce à la chemiluminescence (Garside 1982, Eppley et al. 1988). Mais cette technique est lente (10 éch./h) et nécessite un appareillage encore peu développé dans les laboratoires.

L'absorption UV des nitrates traités dans des solutions d'acide perchlorique à 5% (Bastian et al., 1957) ou dans des solutions d'hydroxyde (McDonald et al., 1970) est une méthode simple et directe. Malheureusement, les chlorures interfèrent sur la mesure et la limite de détection n'est pas suffisante (17  $\mu\text{M}$ ) pour des mesures dans le milieu marin. La méthode basée sur l'absorption UV du chlorure de nitrosyl, proposée par Armstrong (1963), a une sensibilité suffisante pour une utilisation en eau de mer, mais elle implique l'utilisation d'acide sulfurique concentré. Une autre méthode basée sur la spectrométrie UV est développée actuellement à l'Université de Montpellier II par Collos et à Marseille par Thomas (1990, 1991). Elle est basée sur le principe de Crumpton et al. (1992) : la mesure est effectuée sur un échantillon pur (filtré si turbide) sans ajout de réactifs. La méthode de Collos est basée sur l'absorption UV à une seule longueur d'onde alors que celle de Thomas considère l'ensemble du spectre. Ces deux techniques présentent de bons résultats lorsque les analyses sont effectuées en eau douce. Mais, en eau de mer, les ions bromures et chlorures interfèrent sur la mesure car leurs spectres d'absorption recouvrent celui des nitrates. Aucun résultat n'a été à ce jour publié.

La concentration des nitrates dans l'eau peut également être déterminée par le biais de méthodes colorimétriques. Une méthode directe consiste à oxyder des composés organiques par les nitrates en solution acide pour former des produits colorés (rouges). Ces composés organiques sont nombreux et on peut citer par exemple, le resorcinol (Costa, 1951), la diphenylbenzidine (Atkins, 1954), la diphenylamine (Isaeva, 1956), la strychnidine en solution d'acide sulfurique concentré (Harvey, 1926, 1930 ; Zwicker et Robinson, 1944 ; Dal Pont, 1962), l'acide phénoldisulfurique, la brucine (Jenkins et Medsker, 1964) ou l'acide chromotrope (Basargin et al., 1968). Ces mesures présentent l'avantage d'utiliser de très faibles volumes d'échantillons. Mais, elles sont dépendantes de la température et du degré de mélange. De plus, en présence d'ions chlorures, leur fiabilité diminue encore.

Les méthodes colorimétriques, dites indirectes, consistent à réduire les nitrates puis à doser colorimétriquement le composé réduit. Les nitrates peuvent ainsi être réduits en ammonium selon la procédure de Keay et Menage (1970). Cette méthode donne de bons résultats même en présence de chlorure, mais seulement pour de fortes concentrations en nitrates.

En fait, en accord avec Huxley et Wisel (1974), la méthode d'analyse la plus fiable consiste à réduire les nitrates en nitrites, puis à former un complexe coloré. L'Agence de la Protection de l'Environnement aux U.S.A considère cette procédure comme la méthode officielle pour le dosage des nitrates (APHA, 1980). Le principe repose sur la loi de Beer-Lambert. Cette méthode n'a cessé d'évoluer au cours du temps pour atteindre les performances rencontrées aujourd'hui. La procédure manuelle a été progressivement remplacée par des méthodes automatisées de plus en plus sophistiquées.

## 1.2. La loi de Beer Lambert

Lorsqu'un faisceau lumineux traverse un matériau, l'intensité du rayonnement émergent ( $I$ ) est toujours inférieure à l'intensité du rayonnement incident ( $I_0$ ). La fraction absorbée du rayonnement incident est fonction de l'épaisseur du matériau (trajet lumineux) et de la concentration des espèces absorbantes qu'il contient. Les relations mathématiques correspondantes ont été établies par Bouguer, Lambert et Beer.

$$T = I/I_0 = 10^{-\xi cb}$$

et

$$A = -\log(T) = \xi cb$$

avec :  $I_0$  : intensité de la lumière incidente,

$I$  : intensité de la lumière transmise,

$A$  : absorbance,  $T$  : transmittance,

$\xi$  : coefficient d'extinction molaire ( $\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ),

$c$  : concentration ( $\text{mol.l}^{-1}$ ),

$b$  : trajet de la lumière (cm).

La relation obtenue entre l'absorbance et la concentration est linéaire et constitue la base de la plupart des analyses quantitatives. Mais, cette relation, plus connue sous le nom de loi de Beer-Lambert, ne doit pas être appliquée sans certaines précautions. Il existe en effet de nombreuses raisons d'ordre instrumental, chimique et physique pouvant créer des écarts par rapport à cette loi. Les interférences d'ordre chimique sont principalement dues aux effets du pH sur l'état chimique d'un composé, aux éventuelles réactions chimiques avec le solvant, et enfin à la décomposition et à la présence d'impuretés qui, lorsqu'elles ne sont pas détectées peuvent donner lieu à de grossières erreurs. Les interférences d'ordre physique sont provoquées par l'homogénéité de la solution, la formation de liaisons hydrogène avec le solvant, la solvation, les interactions molécule-molécule aux fortes concentrations, la température, la fluorescence et la dispersion. Ces effets perturbateurs peuvent modifier fortement la valeur du coefficient d'absorption, et par conséquent, entraîner des déviations négatives ou positives. Il est donc essentiel, lors du développement d'une méthode, de mesurer des étalons couvrant la gamme de concentration attendue afin de vérifier si l'analyse obéit à la loi de Beer-Lambert sur toute la gamme de mesure.

## 1.3. La méthode manuelle

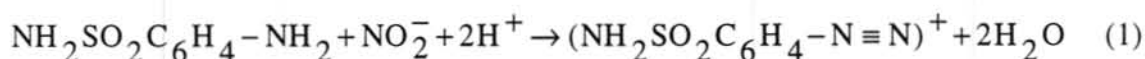
### 1.3.1. L'analyse des nitrites

La formation de pigments à partir de composés azotés (l'acide nitrique, les dérivés de l'aniline et du naphthalène,...) a été décrite pour la première fois par Johann Peter Griess (1864). Cette réaction, dite de Griess, a été très étudiée en raison de l'importance des composés azoïques dans l'industrie de la teinture. Mais, en 1879, Griess a démontré que cette réaction pouvait également permettre le dosage des nitrites. Le principe de la réaction repose sur la diazotation des nitrites avec l'acide sulfanilique, puis sur la formation d'un complexe coloré avec des composés tels que les  $\alpha$ -naphthylamines. Ilosway (1889) améliore la réaction en recommandant l'utilisation d'acide acétique pour obtenir un pH entre 2.5 et 3 lors de la réaction entre l'acide sulfanilique et la 1-naphthylamine. Mais, cette méthode présente deux inconvénients : (1) les diazoïques formés à partir de l'acide sulfanilique sont instables et difficiles à préparer, (2) la réaction entre le diazoïque et les  $\alpha$ -naphthylamines est relativement lente car il faut de 10 à 30 minutes pour obtenir un développement total de la coloration.

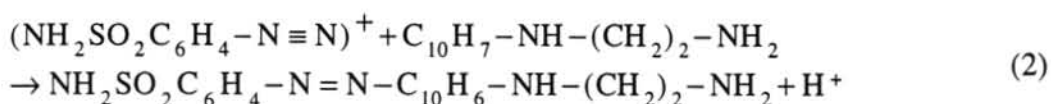
Shinn (1941) met alors au point une méthode basée sur l'utilisation de la sulfanilamide (SAN) et de chlorhydrate de N-(1 naphthyl)-éthylènediamine (NED). Ces nouveaux réactifs présentent de nombreux avantages. SAN est en effet plus stable que l'acide sulfanilique. De plus, la réaction entre les nitrites et SAN est stoechiométrique, alors qu'avec l'acide sulfanilique, elle doit être 100 fois molaire en excès. NED a l'avantage d'être soluble dans l'eau, d'être moins toxique que les  $\alpha$ -naphthylamines, d'être moins sensible aux variations de pH car il réagit de façon similaire dans une gamme de concentration acide variant de 0.1 à 1 N. Le temps de développement de la coloration est également plus court et cette coloration demeure stable quelques heures.

Benschneider et Robinson (1952) adaptent cette méthode simple et précise à la détermination des nitrites en eau de mer. Ils montrent ainsi que la salinité n'a pas d'effet sur le maximum de coloration mais que, par contre, elle augmente la cinétique de réaction. Le principe de la réaction aboutissant à la formation d'un composé azoïque est le suivant :

(1) les ions nitrites forment un diazoïque avec la sulfanilamide en milieu acide ( $\text{pH} < 2$ ) selon la réaction :



(2) le diazoïque est ensuite copulé avec le chlorhydrate de N-naphtyl-éthylènediamine pour former un colorant :



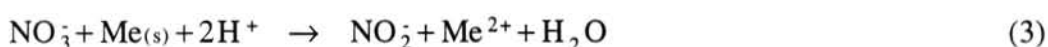
Le maximum d'absorption de ce colorant rose se situe à 543 nm.

L'efficacité de différentes amines aromatiques diazotables ainsi que les interférences provoquées par différents composés ont été étudiées par Norwitz et al. (1984, 1985, 1986). Les résultats montrent que la sensibilité de la mesure est meilleure avec respectivement les couples 4 nitroaniline-NED, sulfanilamide-NED, acide sulfanilique-NED. Les interférences provoquées par certains sels et par des substances modifiant l'acidité de la solution ou provoquant des précipitations sont moins importantes lorsque les couples 4 nitroaniline-NED et sulfanilamide-NED sont utilisés.

### 1.3.2. L'analyse des nitrates

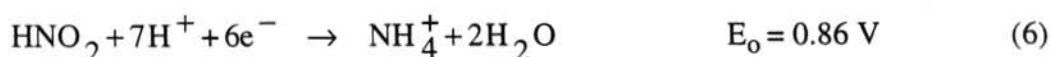
Différents réducteurs ont été proposés pour réduire les nitrates en nitrites. Mullin et Riley (1955) ont développé la technique de réduction homogène des nitrates en nitrites par l'hydrazine en utilisant du cuivre comme catalyseur. Mais cette méthode de réduction, modifiée par Austin et Strickland (1959), dure 24 h et ne doit subir aucune variation de température (Dal Pont, 1962). Cette méthode n'est pas quantitative, surtout lorsqu'il s'agit d'échantillons d'eau de mer, et de fortes concentrations en nitrites inhibent la réaction (Morris et Riley, 1963).

D'autres méthodes de réduction mettent en oeuvre l'utilisation de métaux. Le principe de cette réduction hétérogène est le suivant :

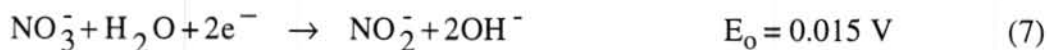


Le pourcentage de réduction des nitrates en nitrites dépend du métal utilisé, du pH de la solution et de l'activité de la surface du métal. En effet, les réactions en solutions trop alcalines ou sur des surfaces de métal inactives ne sont pas totales. Par contre, en utilisant des solutions très acides, un métal trop électro-négatif ou des surfaces très actives, les nitrates sont réduits à un degré de réduction inférieur à celui des nitrites. Les potentiels d'oxydations  $E_0$  de ces réactions sont les suivants :

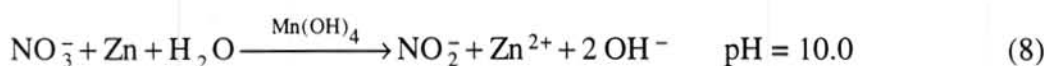
\* en milieu acide,



\* en milieu neutre ou alcalin,



Le zinc a beaucoup été utilisé comme mode de réduction hétérogène des nitrates. Nelson et al. (1954) l'ont utilisé pour la première fois pour l'analyse des nitrates dans le sol et les plantes. Leur travail a été suivi par celui de Middleton (1957), Price et Priddy (1959) et plus tard par celui de Lambert et Zitomer (1960) qui adaptent la méthode à la mesure des nitrates dans l'eau douce. Chow et al. (1962) l'utilisera pour l'analyse en eau de mer. La réduction est basée sur du zinc en solution ammoniacale en présence d'hydroxyde de manganèse comme catalyseur.



Cette réaction est sensible à la température et comporte une phase de filtration (ou de centrifugation) de l'échantillon avant l'analyse colorimétrique des nitrites. De plus, la réduction n'est pas très reproductible et seulement 85 à 90 % des nitrates sont réduits (Morris et Riley, 1963).

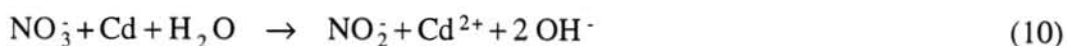
L'utilisation de cadmium comme agent réducteur a été suggérée par Pötl et Reiter (1960) car elle comporte de nombreux avantages pour une analyse en eau de mer. La méthode de Morris et Riley (1963) permet une réduction à 91 % ( $\pm 1$  %) lorsque les échantillons sont percolés à travers une colonne remplie de cadmium amalgamé. Les ions présents dans le milieu marin n'interfèrent pas sur la mesure. La méthode est également peu sensible aux variations de salinité et à l'influence de la température. Mais l'efficacité de la colonne décroît rapidement en raison de la formation de  $\text{Cd(OH)}_2$  (et même de  $\text{CdCO}_3$ ). En effet, lorsqu'on utilise des grains de cadmium en milieu neutre ou légèrement alcalin, les ions cadmium formés au cours de la réduction (éq. 3) peuvent réagir avec les ions  $\text{OH}^-$  et former un précipité. De plus, en accord avec l'équation de Nernst, le potentiel de réaction requis pour la réduction est dépendant de l'activité de l'ion hydrogène :

$$E = E_0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{\text{NO}_2^-} a_{\text{OH}^-}^2}{a_{\text{NO}_3^-}} \quad (9)$$

Ceci induit au cours de la réaction une variation de pH si la solution n'est pas tamponnée. L'eau de mer possède un pouvoir tampon mais il n'est pas suffisant. Grasshoff (1964) modifie la méthode de Morris et Riley (1963) en choisissant de traiter le métal par une solution alcaline



de chlorure d'ammonium qui possède la caractéristique d'être à la fois une solution tampon et une solution complexante.



La durée de vie de la colonne est alors prolongée car les ions cadmium forment un ion complexé avec l'ammoniaque obtenu dans l'équation (11) et l'eau est formée avec les ions  $\text{H}^+$  de l'équation (11) et  $\text{OH}^-$  de l'équation (10).

Cette procédure d'analyse a été revue par Strickland et Parsons (1965). Ils remplacent le chlorure d'ammonium par de l'EDTA lors du conditionnement de la colonne. Ils suggèrent également de laver le cadmium avec de l'acide nitrique afin de former de petits trous dans le métal pour augmenter la surface de contact.

Wood et al. (1967) change de cathode en remplaçant le mercure par du cuivre. Ce changement de cathode permet de faire passer le potentiel de réduction de - 0.403 V à - 0.740 V. Une fine pellicule cuivrée poreuse est formée sur les grains de cadmium après passage d'une solution de sulfate de cuivre. Le cadmium cuivré permet d'obtenir un rendement stable et plus élevé que le cadmium amalgamé. Strickland et Parsons (1972) revoient alors l'efficacité des solutions tampons vis à vis de ce nouveau réducteur et préfèrent le chlorure d'ammonium à l'EDTA. Nydalh (1976) a comparé les colonnes Hg-Cd et Cu-Cd et a conclu que la colonne Cu-Cd est meilleure car la vitesse de réduction est plus rapide.

Pour obtenir des résultats reproductibles, il est essentiel d'apporter beaucoup de soin à la préparation de la colonne de réduction, tout comme à son utilisation. Ainsi, la colonne (Fig. 1) ne doit jamais venir à sec et elle doit être conservée dans une solution de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  entre deux utilisations. Il est également nécessaire de contrôler le rendement de la réduction. Le rendement peut en effet être différent d'une colonne à l'autre et surtout décroître au cours du temps en raison de la précipitation d'hydroxydes sur le cadmium et de l'effet réducteur de l'oxygène de l'eau qui diminue la quantité de cuivre présent dans la colonne. Le passage de solutions contenant de faibles concentrations de nitrates contribue à diminuer la durée de vie de la colonne (Aminot, 1983). Il est préférable de remplacer la colonne lorsque son rendement n'est plus que 80 à 85 % afin d'obtenir une meilleure précision et de diminuer les risques de réduction des ions nitrites lors de leur passage dans la colonne (le pourcentage des ions nitrites

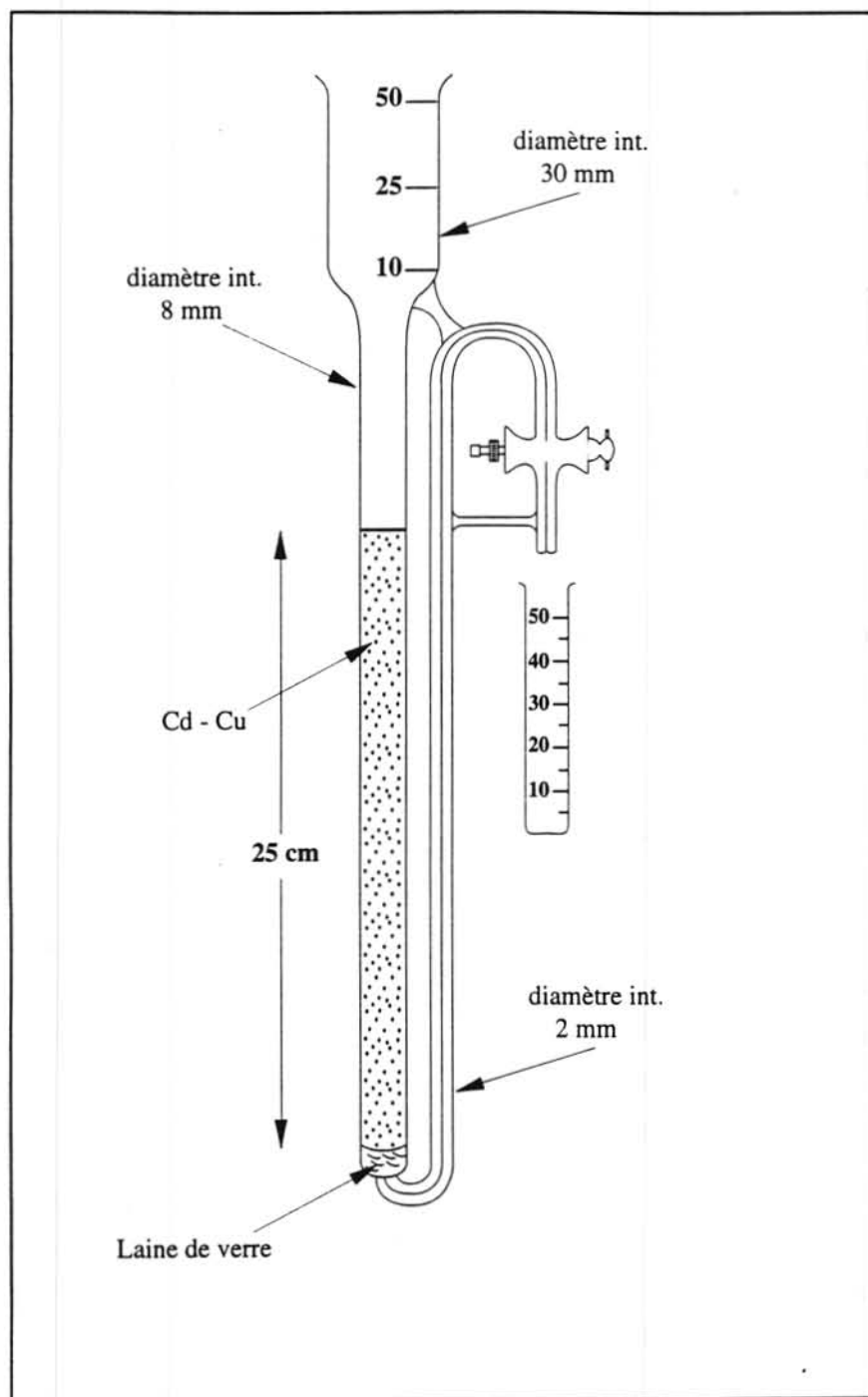


Fig 1: Colonne de cadmium - cuivre utilisée pour la réduction des nitrates en nitrites par la méthode manuelle.



réduits croît et devient aléatoire lorsque la colonne vieillit). Pour revenir à un rendement de 100%, il faut réactiver la colonne et même la régénérer si le pourcentage de réduction n'a pas augmenté. Une méthode de réactivation a été proposée par Otsuki (1978). Il s'agit de "recuivrer" le cadmium par passage d'une solution d'EDTA et d'une solution de sulfate de cuivre dont le pH a été ajusté à 7. La régénération consiste à vider la colonne et à retraiter entièrement les grains de cadmium.

La méthode manuelle de détermination des nitrates dans l'eau est une méthode encore couramment utilisée et décrite dans de nombreux ouvrages de référence (Strickland et Parsons 1972, Tréguer et Le Corre 1975, Aminot et al. 1983, Grasshoff 1983).

## 1.4. Automatisation de la mesure en laboratoire

La méthode manuelle de dosage des nitrates dans l'eau de mer possède de nombreux inconvénients : (1) un volume d'échantillon important (100 ml au minimum), (2) l'utilisation d'une grande quantité de cadmium pour la réduction, (3) un temps de réaction minimal de 30 minutes. De plus, les risques de pollution sont très importants à chaque niveau de la procédure d'analyse (ajout de réactifs, contact de l'échantillon avec l'atmosphère ambiante) surtout à bord de navires. Pour éviter ces problèmes, la méthode a été automatisée dès les années 1950.

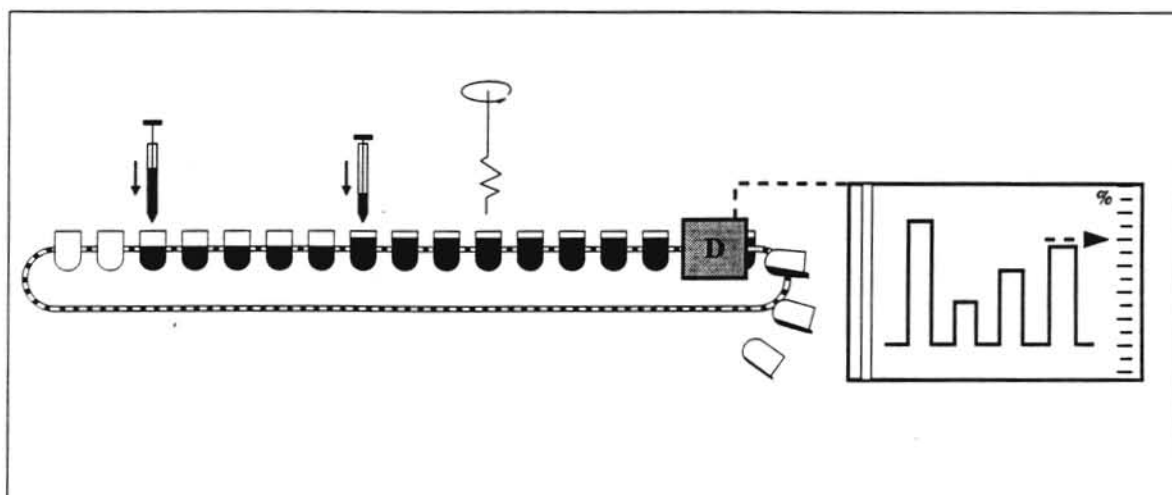


Fig. 2 : Première automatisation du dosage des nitrates.

Le premier type d'analyseur (Fig. 2) permettant une analyse automatique est en fait une simple mécanisation de la procédure d'analyse manuelle : les échantillons sont transportés dans de petits récipients sur une chaîne où différentes étapes consistent à ajouter les réactifs, à mélanger, à chauffer et à passer à travers un détecteur. Puis, James (1952) présente un nouveau système (Fig. 3a) basé sur le pompage de l'échantillon dans un flux continu de réactifs

(Flux Non Segmenté, FNS). Mais, ce système possède un grand défaut : la contamination entre les échantillons successifs. Skeggs (1957) modifie alors le système en segmentant le flux continu de réactifs par des bulles d'air (Fig. 3b). Ce système, nommé flux segmenté (FS), est commercialisé par Technicon et devient un appareil très courant dans les laboratoires d'analyses. Une nouvelle technique mise au point par Ruzicka et Hansen apparaît en 1975 : la Flow Injection Analysis. Elle est basée non plus sur le pompage en continu d'un échantillon, mais sur l'injection d'un volume déterminé d'échantillon dans le flux non segmenté de réactifs (Fig. 3c). L'état du signal ainsi obtenu n'est plus stable, mais transitoire. Cette technique a le mérite de diminuer considérablement le temps d'analyse, de diminuer le volume d'échantillon nécessaire à l'analyse et de simplifier l'appareillage. Ces deux dernières techniques ont été adaptées pour des mesures très diverses en agro-alimentaire, en environnement et dans l'industrie. Elles ont contribué à l'amélioration constante de l'analyse (sensibilité, précision, temps de mesure, volume minimal de réactifs et d'échantillon,...) de différents composés, et plus particulièrement des nitrates.

#### 1.4.1. Flux segmenté

##### 1.4.1.1. Présentation de l'AutoAnalyseur Technicon

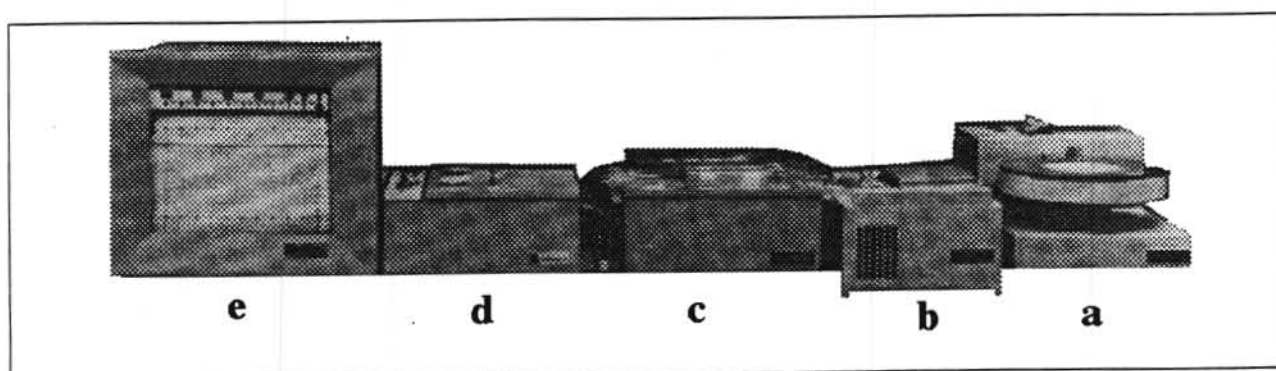


Fig. 4 : Vue générale de l'AutoAnalyseur Technicon. (a : passeur, b : pompe, c : circuit analytique, d : colorimètre, e : enregistreur).

Les principaux éléments constituant l'appareillage de l'AutoAnalyseur Technicon sont un passeur, une pompe péristaltique, un manifold, un colorimètre et un enregistreur (Fig. 4). Le pompage des réactifs et la formation de bulles d'air sont assurés en continu dans le système. Les échantillons, placés dans des godets sur le passeur, sont aspirés par la pompe et introduits dans la chaîne de mesure. Le volume de l'échantillon est déterminé par le temps de

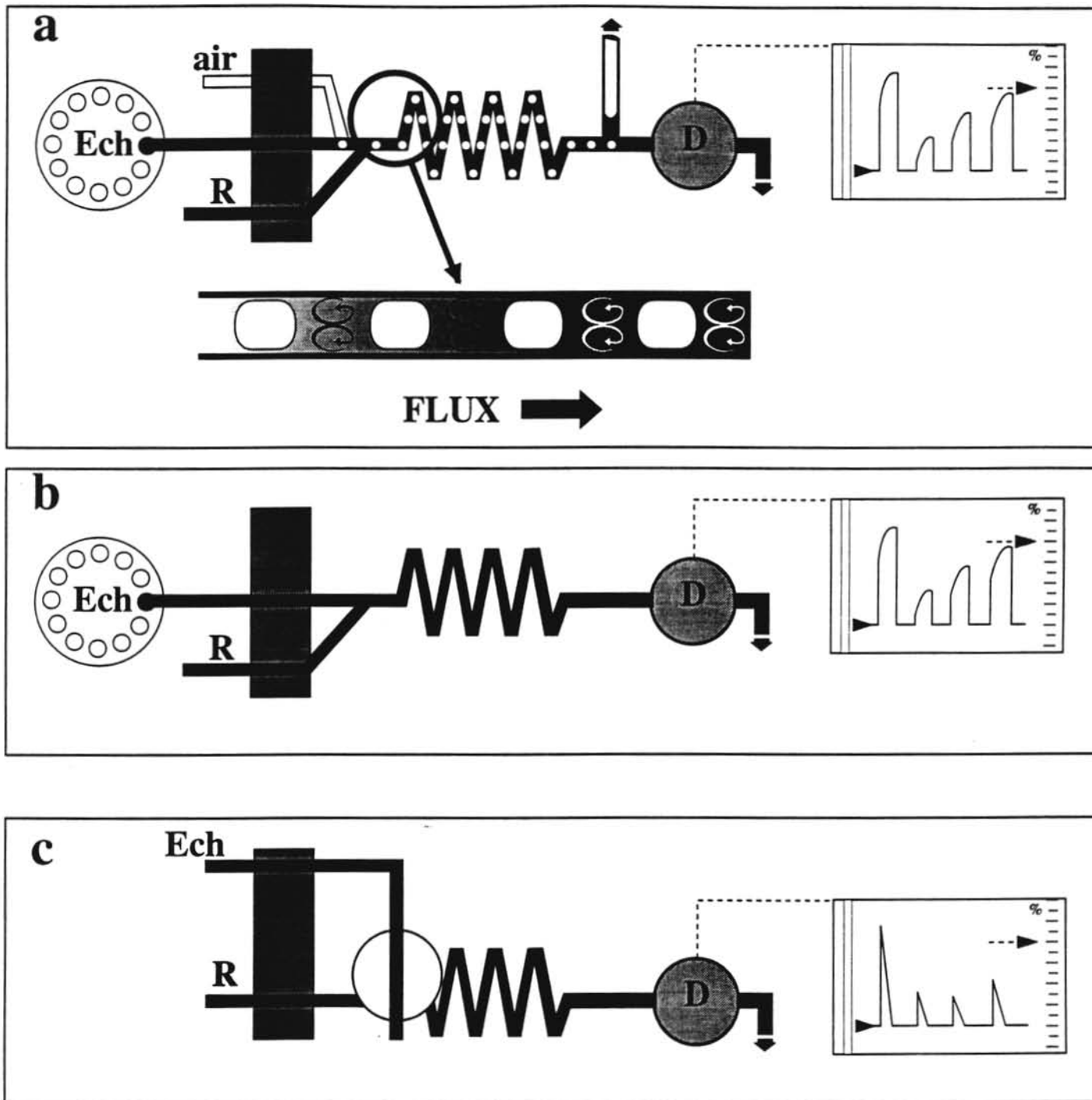


Fig.3 : Principe des différentes analyses automatiques : (a) le flux segmenté, (b) le flux non segmenté, (c) la Flow Injection Analysis.

prélèvement, le diamètre des tubes de pompe et la vitesse de la pompe. Entre deux échantillons, l'aiguille du passeur se place dans une solution dite de "lavage" (c'est à dire une solution ne contenant pas le composé à analyser, d'où généralement de l'eau distillée) qui détermine le blanc et empêche une contamination entre deux échantillons successifs. A l'entrée du circuit analytique, le flux est segmenté par des bulles d'air pour former des zones réactionnelles et limiter les effets de traînées (mélange de 2 échantillons successifs). Le temps de réaction est déterminé par la concentration des réactifs, mais aussi par le diamètre et la longueur du circuit analytique et par la vitesse de rotation de la pompe. Le flux est débullé avant de passer dans la cellule de mesure à l'intérieur du colorimètre. La longueur de cette cellule dépend de la gamme de concentration attendue et de la sensibilité choisie par l'utilisateur. L'intensité de la coloration de la solution est mesurée par le détecteur et transmise sur un enregistreur. Le signal obtenu correspond à un état stable de réaction. La concentration de l'échantillon est déterminée grâce à une droite d'étalonnage obtenue par le passage préliminaire de standards de concentrations connues.

#### *1.4.1.2. Adaptation de l'analyse des nitrates à l'AutoAnalyseur II*

O'Brien and Fiore (1962) ont été les premiers à utiliser une méthode automatique pour la détermination des nitrates dans les rejets urbains. Mais, cette méthode, basée sur la réduction au zinc, ne peut être appliquée à l'eau de mer en raison d'une limite de détection trop élevée. Henriksen (1965) adapte ensuite la méthode basée sur l'hydrazine au Technicon. La fréquence d'échantillonnage obtenue est de 27 échantillons par heure et la précision de  $\pm 2.2 \mu\text{M NO}_3$  dans une gamme de 10-200  $\mu\text{M NO}_3$  (précision obtenue de façon manuelle égale à  $\pm 15 \mu\text{M}$ ). Mais, même si les performances obtenues avec l'automate sont meilleures qu'avec la méthode manuelle, le temps de mesure demande au total une demi-heure et le manifold utilisé est très complexe car il met en oeuvre 12 tuyaux de pompe.

Brewer et al. (1965) adapte la technique manuelle de Morris et Riley (1963) à l'AutoAnalyseur Technicon I. Un problème majeur apparaît : le cadmium amalgamé est oxydé par les bulles d'air segmentant le flux et par conséquent, les performances de réduction de la colonne diminuent. De plus, le cadmium ainsi oxydé forme de petits granules qui bloquent le flux à travers la colonne. Un régulateur de pression placé à l'entrée de la colonne n'est pas suffisant pour rétablir un flux constant. En mélangeant l'échantillon à une solution d'EDTA à 1%, Brewer et al. (1965) réussit à conserver un cadmium actif et à rétablir un flux constant à travers la colonne. La fréquence d'échantillonnage est alors de 30 échantillons par heure, la gamme de mesure de 0 à 400  $\mu\text{M NO}_3$ , la précision de  $\pm 3.2 \mu\text{M NO}_3$  au niveau de 200  $\mu\text{M}$  et le pourcentage de réduction de 75 %.

Des améliorations ont été portées au cours des années suivantes. Ainsi, Armstrong et al. (1967) remplace la colonne de cadmium amalgamé par la colonne de cadmium cuivrée suggérée par Wood et al. (1967). Cette méthode est étendue à l'analyse des nitrates dans l'eau

douce et dans les sols (10-1000  $\mu\text{M NO}_3$ ) par Henriksen et al.(1970). Oudot et al. (1988) et Raimbault et al. (1990) améliorent la gamme de mesure très sensible (100-7000 nM  $\text{NO}_3$ ) de Strickland et Parsons (1972) en la portant respectivement à 50-5000 nM  $\text{NO}_3$  et à 0-100 nM en diminuant le rapport de dilution échantillon-réactif. Collos (1992) augmente la sensibilité et la reproductibilité de la réduction en diminuant le pourcentage de nitrites réduit lors du passage de l'échantillon sur la colonne grâce à une solution de chlorure d'ammonium dont le pH a été ajusté à 8.5.

La préparation de colonnes de cadmium est assez longue et laborieuse. C'est pourquoi Stainton (1974) propose une nouvelle génération de colonnes qui consistent en un fil de cadmium de 1 m de long (recouvert d'une pellicule de cuivre) placé à l'intérieur d'un tube en Téflon. Cette colonne permet d'une part, d'assurer un très bon contact entre la solution et le métal et d'autre part, de diminuer les risques de contamination d'un échantillon sur l'autre grâce au faible volume contenu à l'intérieur de ce type de colonne (Gardner et al., 1976). Malheureusement, la manipulation de ces fils de cadmium est assez délicate car ils sont très souples. De plus, leur coût est assez élevé et il est difficile de s'en procurer. Pour éliminer la phase de traitement du cadmium par une solution de cuivre, Hydes et al. (1985) propose une nouvelle colonne constituée d'un alliage de grains de cadmium et de cuivre. Une colonne constituée d'un fil en alliage à 95 % de cadmium et 5 % de fer a également été proposé par Willis (1980). Mais, si ces colonnes sont faciles à préparer, leur rendement est très fluctuant car il dépend de la longueur de la colonne et du temps de contact.

#### *1.4.1.3. Comparaison des mesures obtenues avec la méthode manuelle et la méthode automatisée*

L'AutoAnalyser Technicon a contribué pour une large part à l'extension des études sur les sels nutritifs en devenant un appareil de référence très courant dans les laboratoires d'océanographie (Armstrong et al. 1967; Brewer et al. 1967). Une comparaison entre la méthode manuelle de Wood et al. (1967) et la méthode automatisée de Armstrong et al. (1967) a été entreprise par Brewer and Riley (1967), Hager et al. (1973) et Tréguer et Le Corre (1975) : une excellente cohérence entre les deux méthodes a été mise en évidence.

D'après Hager (1973),

$$\text{NO}_3_{\text{auto}} = (0.974 \pm 0.008) \text{NO}_3_{\text{man}} + (0.399 \pm 0.193) \quad r = 0.99 \quad n = 76$$

D'après Tréguer et Le Corre (1975),

$$\text{NO}_3_{\text{auto}} = 0.98 \text{NO}_3_{\text{man}} + 0.3 \quad r = 0.99 \quad n = 14$$

Les performances ainsi obtenues sont meilleures que celles de la méthode manuelle : le volume de l'échantillon prélevé est de 2 ml, le temps de mesure entre 2 échantillons est de 3 min. et la précision de 0.01  $\mu\text{M}$  (Tréguer et Le Corre, 1975).



#### *1.4.1.4. Interférences*

D'après Grasshoff (1969), les sulfures ne provoquent aucune interférence sur l'analyse des nitrites car ils sont généralement en trop petite quantité dans l'eau de mer pour pouvoir influencer la mesure. Les résultats de Timmer-Ten Hoor (1974) montrent cependant que l'intensité de la coloration d'une solution de  $5 \mu\text{M}$   $\text{NO}_2$  diminue dès qu'il y a  $2 \mu\text{M}$  de sulfure dans l'échantillon. Cette diminution peut atteindre 30 % lorsque la concentration en nitrites est de  $10 \mu\text{M}$  et même 80 % pour une concentration de  $70 \mu\text{M}$ . Cette interférence peut être supprimée en ajoutant en excès des ions cadmium ou mercure afin de former des complexes  $\text{CdS}$  ou  $\text{HgS}$ .

Si Atlas et al. (1971) n'observe aucune interférence lorsque la solution de nitrates à doser contient  $2.5 \mu\text{M}$   $\text{PO}_4$ , Olson (1980) montre que l'intensité de la coloration du diazoïque peut être modifiée en présence de phosphates. L'effet interférent ne peut provenir que de la phase de réduction car aucune interférence n'est observée lors de l'analyse de nitrites. Il est probablement causé par des effets de surface (formation de liaisons entre l'ion phosphate et les particules de  $\text{Cd-Cu}$ ). Mais, comme cette interférence dépend de l'âge de la colonne et des réactifs, il est très difficile de l'éliminer. En présence de fortes concentrations de phosphates, il est donc conseillé d'utiliser une colonne neuve (les phosphates interfèrent alors seulement à partir de  $20 \text{ mM}$   $\text{PO}_4$ ), une solution de détergent (ether laurique de polyoxyéthylène, Brij® 35) fraîche et d'augmenter la concentration de la solution de chlorure d'ammonium. Si la concentration en nitrates est assez élevée, une dilution de l'échantillon est également envisageable.

Un autre problème apparaît lors de l'analyse d'échantillons de salinité différente (par exemple en milieu estuarien) : l'effet de sel. Cet effet, dû à la différence des indices de réfraction entre les solutions de différentes salinités, rend difficile la détermination du blanc. L'importance de l'effet de sel est fonction de la solution tampon : une solution de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  provoque une augmentation de 10 % de la concentration apparente (Loder et al., 1976) alors qu'une solution d'EDTA diminue cette concentration de 16 à 19 % (Brewer et al., 1965). L'erreur peut être corrigée car elle est constante sur toute la gamme de salinité (Loder et al., 1976).

#### *1.4.1.5. Evolution de l'appareillage*

Le Technicon AutoAnalyser I a été progressivement remplacé par de nouvelles instrumentations plus sophistiquées. Le Technicon AutoAnalyser II met en oeuvre une pompe péristaltique plus performante (débit moins pulsé) et des tuyaux de pompe de plus faible diamètre qui permettent de réduire les volumes de réactifs et d'échantillon nécessaires à la réaction. Dans les années 1980, Alpkem a mis sur le marché un appareil dont les volumes morts sont réduits grâce à un manifold de très faible diamètre intérieur et possédant des tuyaux

de pompe permettant d'obtenir des débits de l'ordre du  $\mu\text{l}$ . Cet appareil permet également d'obtenir un temps d'analyse de l'ordre de la minute, une sensibilité de  $0.1 \mu\text{M NO}_3$  et une reproductibilité  $< 1 \%$  (Gordon et al., 1993).

## 1.4.2. Flow Injection Analysis

### 1.4.2.1. Développement de la FIA

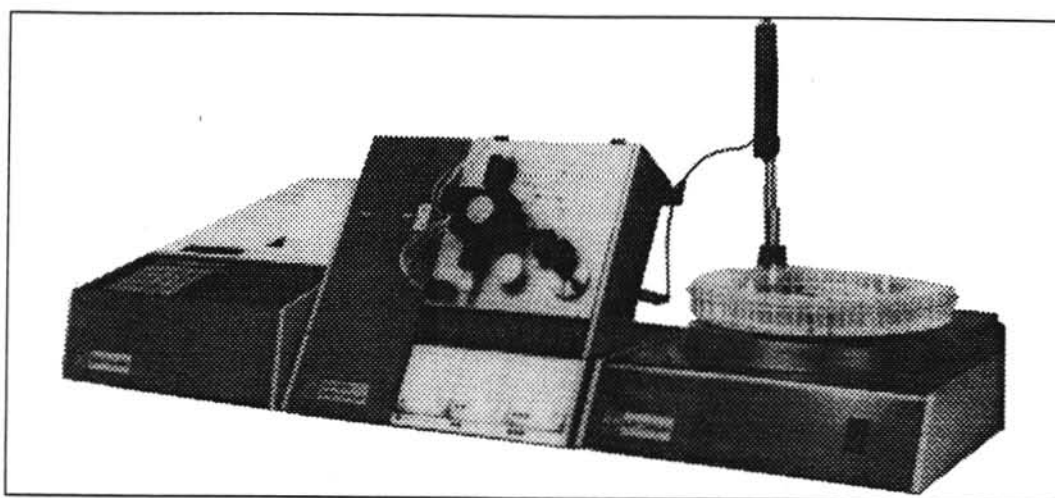


Fig. 5 : Vue générale de l'analyseur Aquatec system.

La Flow Injection Analysis (FIA) peut être définie comme un processus analytique automatique qui consiste à injecter un volume défini d'échantillon dans un flux de liquide puis à détecter le signal transitoire obtenu par différentes méthodes analytiques. Par rapport au flux segmenté, cette technique a l'inconvénient de recourir à l'utilisation d'une vanne d'injection. Mais, du point de vue du circuit analytique, elle est beaucoup plus simple car, comme le bullage est supprimé, une pompe courante peut être utilisée. De plus, le fait de ne pas atteindre le maximum de coloration (l'état stable) et donc de mesurer un signal transitoire, permet de diminuer le temps d'analyse. Le circuit analytique proposé par Nagy et al. (1970) pour une analyse voltamétrique aurait pu être la première expérience à porter le nom de FIA. La méthode consiste en effet à injecter l'échantillon à l'aide d'une seringue dans un flux non segmenté d'électrolyte. Une agitation magnétique du flux analytique est nécessaire avant le passage sur l'électrode pour obtenir un mélange suffisant. Ruzicka et al. (1975) et Stewart (1976) modifient cette technique en utilisant un circuit analytique de très faible diamètre intérieur ( $0.8 \text{ mm}$ ) qui permet d'assurer un mélange suffisant avant le passage sur

l'électrode. Ruzicka et al. (1975) nomme alors cette technique Flow Injection Analysis. Les travaux menés par Ruzicka, pour adapter les analyses effectuées en flux segmenté à la FIA, et ceux de Stewart, pour utiliser la FIA lors d'analyses en HPLC, suscitent un réel intérêt de la part de la communauté scientifique. Le nombre de publications mettant en oeuvre cette méthode ne cesse alors de croître. Cette technique a été commercialisée par de nombreuses sociétés. Bifok développe ainsi un premier automate (FIA 05) très simple (Fig. 5). Une nouvelle génération d'automates fut distribuée plus tard aux Etats-Unis par FIATron, Lachat, Control Equipment, au Japon par Hitachi, Jasco, Soma Kazaku, au Brésil par Micronal et en Europe par Tecator.

#### *1.4.2.2. Adaptation de l'analyse des nitrates à la FIA*

Si la méthode d'analyse des nitrates généralement utilisée en FIA est la méthode classique basée sur la réduction des nitrates en nitrites et sur la formation d'un composé azoïque, l'adaptation de diverses méthodes analytiques a également été entreprise. Fogg et al. (1983) a mis au point une méthode voltamétrique qui mesure le bromure de nitrosyle formé lors de la réaction entre les nitrites (obtenus après passage sur une colonne classique de cadmium) et une solution de bromure de potassium. L'analyse des nitrates en FIA a aussi été effectuée par différentes méthodes de réduction homogène. Madsen (1981) a adapté à la FIA la méthode basée sur la réduction par l'hydrazine. Mais cette méthode est aussi contraignante en FIA qu'en flux segmenté car la réaction est assez lente (40 échantillons par heure), se déroule à 65°C et possède une limite de détection élevée (1 mM-10 mM  $\text{NO}_3\text{-N}$ ). Al-Wehaid et al. (1986) met au point une méthode utilisant le chlorure de titane (III) comme réducteur. Mais, si la réaction est plus rapide qu'avec l'hydrazine, elle ne permet pas non plus la détermination de faibles concentrations. La solution de chlorure de titane étant violette, elle absorbe dans la même zone que le complexe coloré final. Cette méthode est également sensible aux ions  $\text{Cu}^{2+}$  et nécessite la présence d'une colonne échangeuse d'ions à l'entrée du circuit.

Anderson (1979) adapte la méthode classique de réduction des nitrates en nitrites, à l'aide d'une colonne de cadmium cuivrée, suivie de la formation d'un composé azoïque à la technique FIA. Il mesure ainsi simultanément nitrates et nitrites en séparant le flux de l'échantillon en deux. Une partie est introduite dans le circuit d'analyse des nitrites et l'autre dans celui des nitrates (qui contient une colonne de réduction). La FIA possède l'avantage de ne pas avoir besoin de débuller le flux analytique avant son passage sur la colonne. La colonne de réduction développée par Anderson (1979) est très petite (pour éviter tout problème de traînées) et sa durée de vie est seulement de 8 heures. Le volume d'échantillon nécessaire à l'analyse est de 0.1 ml, la fréquence d'échantillonnage est de 60 échantillons par heure et la précision de 1 % entre 0 et 20  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3$ . Anderson (1979) supprime les problèmes d'effet de sel, lors de l'analyse en eau de mer, en ajustant les indices de réfraction des deux milieux par ajout d'une certaine quantité de chlorure de sodium dans les solutions de réactifs. Giné et al. (1980) simplifie le



circuit analytique en utilisant seulement un manifold et un détecteur pour l'analyse des deux sels azotés : l'introduction d'une vanne au niveau de la colonne de réduction permet en effet par une simple rotation d'analyser soit les nitrites, soit les nitrates plus les nitrites. Afin de diminuer le volume d'échantillon et de réactifs utilisés, Zagatto et al. (1980) propose une méthode qui change le débit dans le circuit analytique au cours de la réaction grâce à un commutateur. Pour augmenter la fréquence d'échantillonnage, Van Staden (1982) place la colonne de cadmium avant la vanne d'injection de l'échantillon dans le circuit analytique. Le nombre d'échantillons analysés par heure est alors de 72. Une méthode dérivée de la FIA a été utilisée par Koupparis et al. (1982) : l'analyse par "stopped-flow". Le principe est d'arrêter la pompe lorsque le volume d'échantillon injecté a atteint la cellule de mesure. La concentration de l'échantillon est calculée en tenant compte de la cinétique de réaction.

## **Chapitre 2**

### **Choix d'une méthode analytique adaptée à la mesure in situ**

#### **2.1. Objectifs**

Si l'automatisation a permis de faciliter le travail du manipulateur, d'augmenter la précision de la mesure et de diminuer le temps d'analyse, il reste nécessaire de collecter des échantillons à l'aide d'une bouteille de prélèvement ce qui induit une observation en temps différé. Or la tendance générale en océanographie est d'obtenir les résultats en temps réel pour décrire avec précision l'évolution temporelle et spatiale d'un composé. Des capteurs permettant de donner le résultat d'une mesure "en direct" ont été mis au point pour la mesure de paramètres (température, pH, pression, oxygène, conductivité, irradiance) dont la mesure repose sur des méthodes physiques ou électrochimiques. La mesure in-situ des sels nutritifs est plus difficile à réaliser car, basée sur la colorimétrie, elle nécessite des procédés plus complexes.

Les exigences auxquelles doit répondre le colorimètre ont été établies en fonction des besoins des scientifiques pour la surveillance du milieu côtier. Deux formes d'automates ont été envisagées : l'une de type "contrôle" à un point fixe et l'autre de type "profileur" pour des mesures dans la colonne d'eau. Comme un appareil de type "profileur" peut être facilement adapté au type "contrôle", nous avons choisi de développer un analyseur chimique submersible pouvant fonctionner en profileur dans la colonne d'eau (0 - 300 m) dans des milieux où la salinité varie de 0 à 35 PSS, la température de 4 à 30 °C et la teneur en nitrates de 0 à

50  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3$  (avec une limite de détection de 0.2  $\mu\text{M}$  et une précision de 0.1  $\mu\text{M}$ ). Pour effectuer un profil dans la colonne d'eau, il est nécessaire d'avoir un temps de mesure analytique et un temps d'analyse entre deux échantillons successifs très courts : ces temps ont été fixés respectivement à 1 minute 30 secondes et à une minute.

La première étape de ce travail a consisté à mettre au point une méthode analytique dont les caractéristiques correspondent aux exigences du cahier des charges de l'analyseur. Pour ce faire, une analyse des avantages et inconvénients des différentes méthodes de flux basées sur la colorimétrie a été dressée.

## 2.2. Avantages et inconvénients des différentes méthodes d'analyse en flux

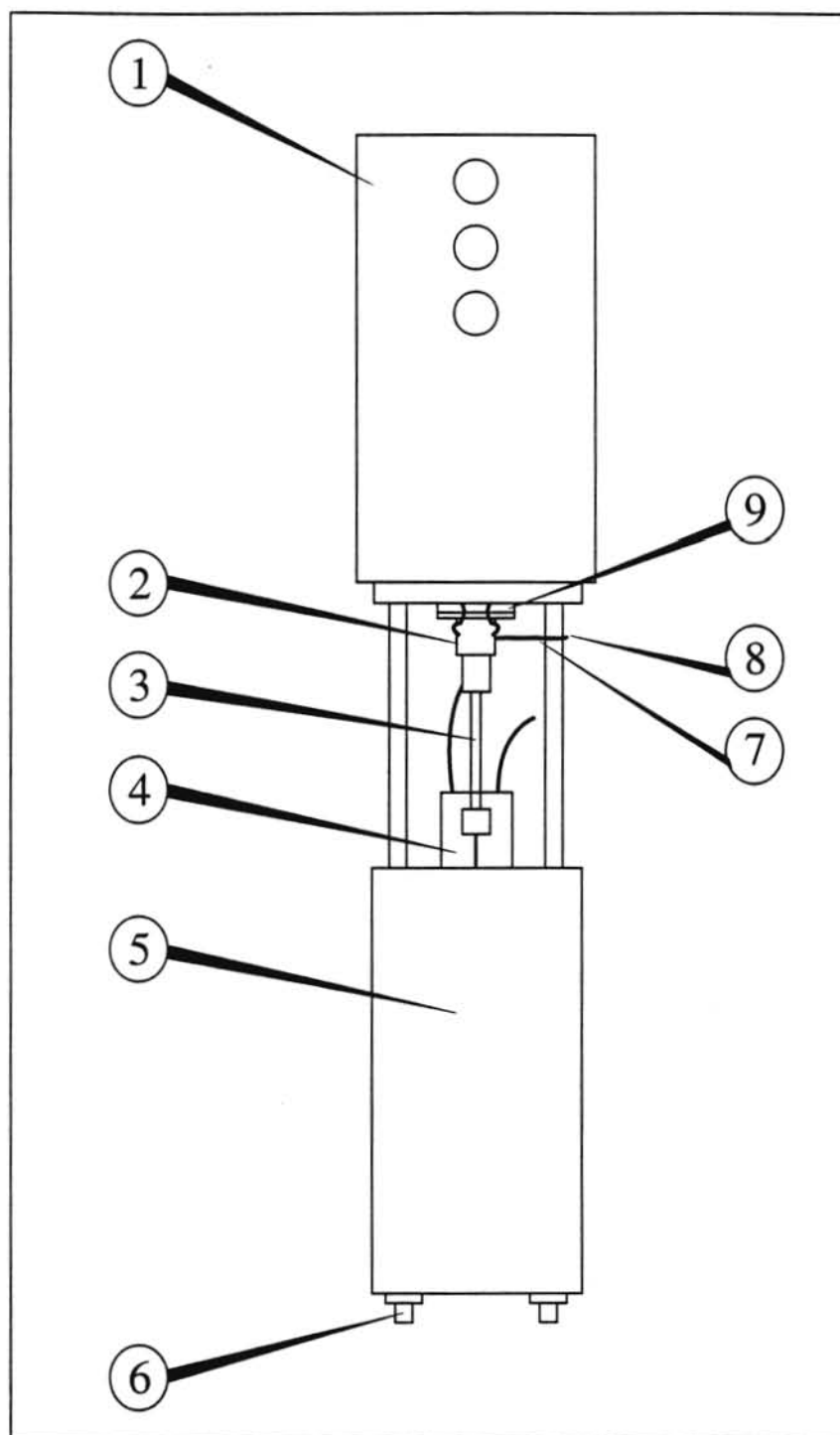
### 2.2.1. Méthode volumétrique

La méthode volumétrique est facilement adaptable sur un analyseur submersible. Il suffit en effet d'aspirer l'échantillon (par exemple à l'aide d'une seringue) à l'intérieur d'une cellule dans laquelle sont ajoutés les réactifs. L'intensité de la coloration est mesurée après un temps de réaction de 20 à 30 minutes, la cinétique de la réaction étant dépendante de la température.

Depuis le début des années 1990, la société allemande ME (Meerestechnik and Elektronik GmbH), après un travail en collaboration avec le professeur Hansen de l'université de Kiel dans le cadre du programme européen Euromar, a mis sur le marché un analyseur submersible (APP 4002, Automated Pumping Photometer) basé sur ce principe. Le pompage de l'échantillon se fait à l'aide d'une petite seringue autonome. Le temps de mesure est très long ( $\approx 20$  min) et cet analyseur ne peut supporter une pression supérieure à 1 bar. Le SOAFD (Scottish Office of Agriculture and Fisheries Dept.) utilise également régulièrement un analyseur in-situ basé sur ce principe (Fig. 6) pour l'analyse des nitrates, le NAS-1 (commercialisé par l'entreprise W.S. Oceans System Ltd). Ce système peut opérer jusqu'à 100 m dans la colonne d'eau. Le temps de mesure est assez long (10 min.) et le passage d'une solution de lavage entre deux échantillons est nécessaire.

### 2.2.2. Flux segmenté

Un analyseur chimique permettant une mesure in-situ basée sur le flux segmenté (FS) a été mis au point dès 1966 (Bernhard et al., 1966). Cet appareil prélève l'échantillon à la profondeur désirée à l'aide d'un tuyau et d'une pompe puis effectue la mesure à bord du navire à l'aide d'un Technicon. Pour éviter des contaminations, dues à la diffusion, entre deux échantillons successifs, un caisson d'air comprimé est placé à l'extrémité du tuyau pour segmenter le flux de l'échantillon par des bulles d'air. La pression de l'air à l'intérieur du caisson est régulée à une pression supérieure de 2 bars à celle du milieu. Mais ce type de prélèvement ne permet pas



- |   |                                 |
|---|---------------------------------|
| ① Caisson contenant les poches de réactifs              | ⑥ Connecteurs électrique        |
| ② Vanne de rotation 6 positions                         | ⑦ Colonne de réduction          |
| ③ Seringue  | ⑧ Entrée de l'échantillon       |
| ④ Colorimètre   | ⑨ Caisson du moteur de la vanne |
| ⑤ Caisson du moteur de la seringue et de l'électronique |                                 |

Fig. 6 : Vue générale de l'analyseur submersible NAS-1 (W.S. Ocean Systems Ltd)

d'obtenir une mesure très rapidement car le trajet de l'échantillon le long du tuyau est assez long. En France, ce principe a été repris par Prieur et al. (1993). Ils utilisent en effet un système de pompage (Système Hydro-Electrique Tracté, SHET) permettant de prélever l'échantillon à une profondeur donnée pour l'analyser ensuite à bord du navire sur chaîne Technicon.

Berhnard et al. (1967) a également proposé un analyseur submersible basé sur le flux segmenté. Ce système est constitué d'un container dans lequel est placé un appareillage de type Technicon automatiquement maintenu à une pression supérieure de deux bars à la pression environnante, les résultats étant enregistrés à bord du navire. Le délai entre le prélèvement et le résultat de l'analyse est seulement le temps de la réaction. Mais, aucune autre manipulation avec cet appareil n'a été entreprise en raison de la difficulté de former des bulles d'air sous l'eau à haute pression. Nous avons donc écarté l'utilisation du flux segmenté sur notre analyseur submersible.

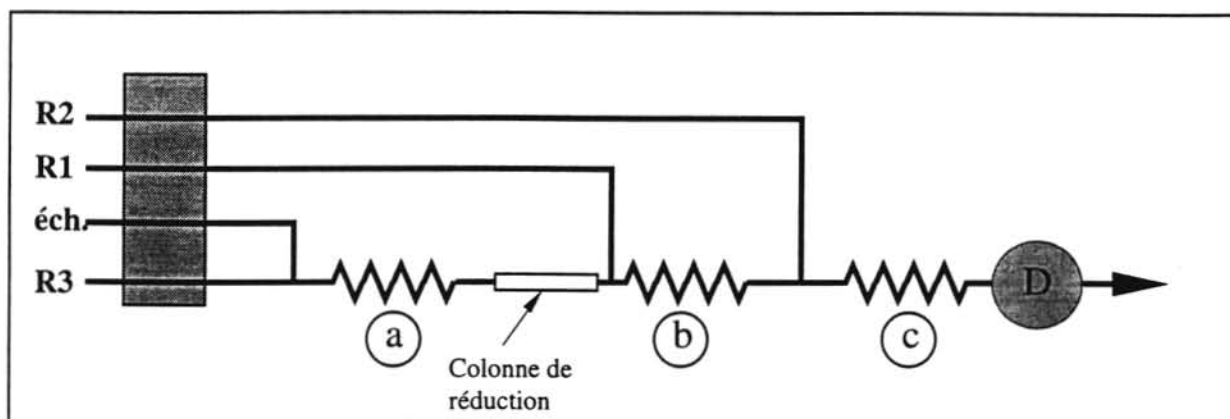
### 2.2.3. Flux non segmenté

Le circuit analytique de flux continu non segmenté (FNS) est un circuit de flux segmenté sans système de bullage. Ce système est en équi-pression car tous les tuyaux sont pleins. Johnson et al. (1986) a adapté ce principe sur un analyseur submersible (le Scanner). Cet analyseur est capable de mesurer des paramètres tels que les sulfures et les silicates (Johnson et al., 1986), les nitrates-nitrites (Johnson et al., 1989), le manganèse et le fer (Coale et al. 1991, Chin et al. 1992). Il a été testé avec succès jusqu'à 330 bars en bassin et jusqu'à 2500 m de profondeur en mer. Son utilisation a surtout contribué à l'étude des communautés animales vivant à proximité des sources hydrothermales. Lors des expériences, l'analyseur est, soit installé à l'extérieur du submersible ALVIN pour fonctionner à une profondeur fixe (Sakamoto, 1986), soit attaché à la rosette d'une sonde CTD pour effectuer des profils jusqu'à 1900 m de profondeur (Johnson et al., 1989).

Le FNS est une méthode est très intéressante pour ce genre d'utilisation car elle est facile à mettre en oeuvre et a un temps de réaction assez rapide. Pour évaluer les performances du FNS dans des milieux où la salinité varie de 0 à 35 PSS, des tests ont été menés avec différents circuits pour déterminer le temps minimum de l'analyse, la limite de détection et la précision de la méthode.

#### 2.2.3.1. Tests effectués en flux non segmenté

Les tests ont été effectués sur un analyseur Alpkem en supprimant les injecteurs d'air et les débulleurs et en testant différentes longueurs de circuit (Fig. 7). Le diamètre des tuyaux en Téflon est de 0.8 mm. Dès les premiers tests, il s'est avéré nécessaire de pomper une solution de lavage (eau distillée) entre deux échantillons successifs car des effets de traînées très



#### Circuit sans billes :

1	2	3
Ⓐ = 25	25	25 cm
Ⓑ = 50	100	50 cm
Ⓒ = 150	125	125 cm

#### Circuit avec billes :

1	2	3	4
Ⓐ = 25	25	75	25 cm
Ⓑ = 150	100	50	50 cm
Ⓒ = 125	125	125	125 cm

Fig.7 : Présentation des différents circuits utilisés en FNS avec ou sans billes.

importants sont apparus. Pour obtenir une bonne linéarité et une bonne reproductibilité, le temps de pompage minimum de l'échantillon est de 120 s avec le circuit 2. Il est nécessaire de pomper une solution de lavage au minimum pendant 95 s pour éviter toute contamination lorsqu'un échantillon de 20  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_2$  précède un échantillon de concentration de 5  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_2$ . En appliquant les mêmes temps pour le dosage de solutions de nitrates, des pics difformes et non reproductibles sont obtenus. Le passage de la solution à l'intérieur de la colonne de cadmium semble donc augmenter les effets de trainées en raison du volume mort contenu dans la colonne. Pour obtenir un signal correct, il est nécessaire d'utiliser un temps de lavage de 120 s et un temps de pompage d'échantillon de 120 s. La seule façon de diminuer ces temps de réaction relativement longs est d'améliorer le mélange à l'aide de petites billes de verre de 0.5 -0.75 mm de diamètre placées à plusieurs endroits du circuit analytique.

#### *2.2.3.2. Tests effectués en flux non segmenté avec billes*

Différents circuits ont été testés. Ils se différencient par des portions de circuit contenant des billes plus ou moins nombreuses et longues (Fig. 7). La configuration optimale (circuit 3) permet d'obtenir une coloration totale lorsque le temps de prélèvement de l'échantillon est de 45 s (pour les nitrites) et de 60 s (pour les nitrates), le temps de lavage restant toujours de 100 s.

#### *2.2.4. Flow Injection Analysis*

Le premier analyseur effectuant des mesures in situ avec la FIA construit par Johnson et al. (1983) n'est pas submersible. L'échantillon est en effet prélevé à l'aide d'un tuyau et d'une pompe avant d'être analysé à bord du navire par un système classique de FIA. Ce procédé sera repris par Clinch et al. (1987) et Worsfold et al. (1987) pour effectuer des mesures en continu sur le bord de rivières. Ce mode de prélèvement présente l'avantage d'éliminer toute contamination extérieure. Par contre, le délai entre l'entrée de l'échantillon dans le tuyau et son analyse à bord provoque un mélange entre les différents échantillons successifs tout comme une modification de la température.

Aucun analyseur submersible basé sur l'injection de flux n'a encore été réalisé. Ce type d'analyse nécessite de nombreuses adaptations pour passer d'un appareil de paillasse à un appareil submersible. Notre premier objectif a donc été d'évaluer les performances analytiques de la mesure en FIA pour pouvoir les comparer à celles de la mesure en flux non segmenté.

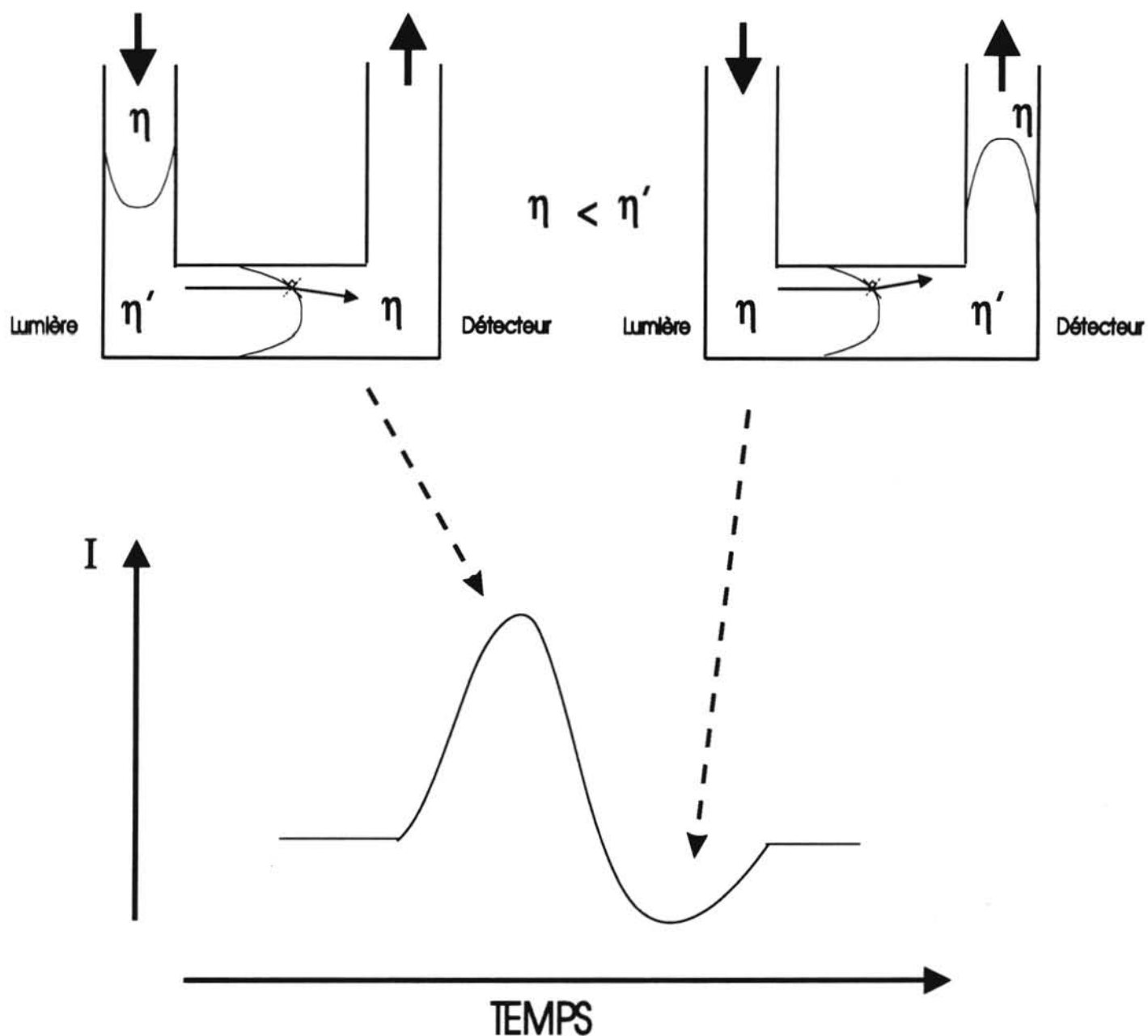


Fig. 8 : Représentation de la formation de l'effet de sel lors du passage du flux injecté dans la cellule de mesure ( $\eta$  et  $\eta'$  étant respectivement les indices de réfraction du flux continu et du flux injecté).



## 2.3. Adaptation de la FIA à la mesure in situ

### 2.3.1. Effet de sel

En FIA, l'injection d'un volume d'échantillon dans un courant de réactifs provoque un flux hétérogène qui crée un gradient d'indice le long de l'axe de la zone réactionnelle. Lors du passage du flux dans la cellule de mesure (Fig. 8), les interfaces entre les deux milieux de composition différente (d'indice de réfraction différent) agissent comme des "lentilles liquides" qui focalisent puis divergent la lumière incidente sur le photorécepteur. Le système est en réalité plus complexe car il est évident que les deux milieux diffusent l'un dans l'autre car il n'y a pas d'interfaces nettes mais un milieu hétérogène dû à une variation continue de l'indice de réfraction. Le signal provoqué par cet effet, dit de "Schlieren", a la forme d'un pic positif suivi d'un pic négatif. L'amplitude de ce signal dépend de nombreux facteurs tels que la différence des indices de réfraction des deux milieux, l'extension de la dispersion de l'échantillon et la forme de la cellule de mesure.

Cet effet qui se superpose à la mesure de l'intensité de la coloration de la solution provoque une erreur importante lors de la détermination de l'absorbance de la solution, particulièrement lorsque les concentrations à mesurer sont faibles. Différentes solutions peuvent être proposées pour atténuer voire éliminer l'effet de Schlieren : (1) augmenter le mélange entre les deux solutions, (2) ajuster la matrice des réactifs à celle de l'échantillon injecté en y ajoutant une solution inerte à la réaction chimique (par exemple du NaCl), (3) séparer le flux de l'échantillon en deux et mélanger à chaque moitié un réactif, (4) diminuer la vitesse du flux et utiliser une cellule de mesure dont le diamètre intérieur soit plus important que celui du circuit analytique, (5) utiliser un système de détection mesurant le signal à deux longueurs d'onde différente.

(1) Lorsqu'on augmente le mélange entre les deux flux, on revient à un principe de mesure comparable à celui utilisé en FNS avec un problème de temps de mesure important et des risques de contamination d'un échantillon sur l'autre.

(2) Le mélange des réactifs avec une solution de salinité comparable à celle de l'échantillon permet de supprimer les problèmes de changement d'amplitude de l'effet de Schlieren lorsque la salinité de l'échantillon varie. Mais, l'effet de Schlieren ne peut être totalement éliminé car il existe toujours une différence d'indice de réfraction entre deux milieux de composition différente.

(3) Comme en (2), la séparation en deux du flux de l'échantillon permet seulement d'avoir un effet de Schlieren d'amplitude constante lorsque la salinité de l'échantillon varie.

(4) Le mélange peut être amélioré en augmentant le diamètre de la cellule de mesure et en diminuant la vitesse du flux. Le temps de mesure est alors plus long et les risques de contamination par la présence d'un volume mort dans la cellule sont amplifiés.

(5) La méthode de mesure à deux longueurs d'onde est couramment utilisée en chromatographie liquide pour supprimer les pics de solvant (Snyder, 1979) et en spectrométrie d'absorption atomique (Welz, 1985). Cette méthode qui permet d'éviter toute intervention chimique sur la mesure semble bien être la plus apte pour éliminer l'effet de Schlieren.

### 2.3.2. Characterization and reduction of interferences in flow-injection analysis for the in situ determination of nitrate and nitrite in sea water

Une comparaison a été menée entre une méthode prenant comme référence le signal obtenu pour une solution de 0  $\mu\text{M}$  et une méthode effectuant la mesure à deux longueurs d'onde différentes. L'influence des paramètres extérieurs (variations de température, de salinité et de pression) sur la mesure lors d'une utilisation in-situ a également été évaluée. Les résultats obtenus sont rassemblés dans un article publié dans un volume spécial de la revue *Analytica Chimica Acta* consacré aux comptes-rendus de la 6<sup>ème</sup> conférence internationale sur l'analyse de flux (Tolède, 8-11 juin 1994).

# Characterization and reduction of interferences in flow-injection analysis for the in situ determination of nitrate and nitrite in sea water

Anne Daniel <sup>a,b</sup>, Dominique Birot <sup>a,\*</sup>, Michel Lehaitre <sup>a</sup>, Jacques Poncin <sup>b</sup>

<sup>a</sup> IFREMER, Centre de Brest, Laboratoire d'Instrumentation Océanographique, B.P 70, F-29280 Plouzané, France

<sup>b</sup> URA CNRS D1515, Institut Universitaire Européen de la Mer, BP 452, F-29275 Brest Cedex, France

Received 6 May 1994; revised 19 September 1994

## Abstract

The aim of this work is to improve the precision and the sensitivity of nitrite and nitrate determination by flow-injection analysis (FIA) for an in situ utilization. Two kinds of signal treatment are proposed in order to eliminate the refractive index provoked by the heterogeneous flow in FIA and the errors induced by temperature, salinity and pressure variations. The concentration range of this method is 0–100  $\mu\text{M NO}_3^-$ -N with a detection limit ( $3\sigma_b$ ) of 0.45  $\mu\text{M NO}_3^-$ -N ( $A_t = 0.151C_{\text{NO}_3} + 0.072$ ,  $n = 40$ ,  $r^2 = 0.997$ ). The relative standard deviation is 5% for nitrate solutions containing 0.5  $\mu\text{M NO}_3^-$ -N. The sampling rate is about 45  $\text{h}^{-1}$ .

**Keywords:** Flow-injection analysis; In situ measurements; Nitrate; Refractive index; Sea water

## 1. Introduction

The development of instrumentation able to measure in situ physical, chemical and biological parameters represents a real need of the oceanographic community for the study of the distribution of physical-chemical parameters and of biogeochemical cycles of elements in the ecosystem. Today, traditional sampling methods and laboratory analysis appear to be insufficient and inadequate: large volumes of water are represented by a few samples, and the collection of water samples subject to external influences can provide large sources of error in the

concentration determination. There are some sensors that can be used to measure such parameters as temperature, pressure, pH, conductivity, oxygen, but there is no instrumentation in current use for the routine in situ measurement of dissolved nutrients in sea water. So, our objective is to develop a submersible analyser based on flow-injection analysis (FIA) to measure the nitrate and nitrite in sea water. A quite similar analyser has been previously reported [1] but no studies were undertaken on the influence of exterior parameters on flow analysis. We present results that show that there are specific factors which interfere with the FIA method which must be taken into account during an in situ utilization.

As far as the analysis of nutrients is concerned, the colorimetric methods are still the easiest and

\* Corresponding author.

most reliable. The advantages of FIA and r-FIA (reverse FIA) for oceanographical measurements have been described by several authors [2–5], these including fast analyses and simple equipment readily adapted to in situ measurements of dissolved nutrients in sea water. However, the heterogeneous composition of the carrier stream, which is caused by injection of the reagent in the sample stream, can create a refractive index gradient along the reaction tube axis. There are various techniques which try to eliminate this interference. According to Johnson et al. [2], the simplest way to do this is to match the index of the carrier stream and the injected solution. They showed that the refractive index, observed in the determination of  $\text{NO}_3^-$ , is completely suppressed by adding 10 g of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  to each litre of *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (NED) reagent solution. We have utilized this technique on our manifold and observed no total disappearance of the interference. Another approach combines the reagent which is injected with a portion of the sample stream before the injection valve [6]. The resulting solution

should then have the same refractive index as the sample stream. This process is not entirely satisfactory because the refractive index is not determined by the salinity differences but by differences in the composition of reagents.

In spectrophotometry suitable dye solutions are known to produce a linear concentration–absorbance relationship. However, this relationship is sometimes difficult to obtain in FIA because of the interference caused by the refractive index (the Schlieren effect) which contributes significantly to the observed signal. To preserve this fundamental relationship, we propose an original method without any chemical intervention. This method is obtained by a simple modification of the conventional Beer–Lambert law. The problem is to define a good reference signal. Two signal treatments are proposed: the first one can be easily used in the laboratory and the second one is more adapted to an in situ utilization, where combined effects of temperature, pressure and salinity can provoke some changes in the behaviour of the blank signal. This last signal treatment is based on a

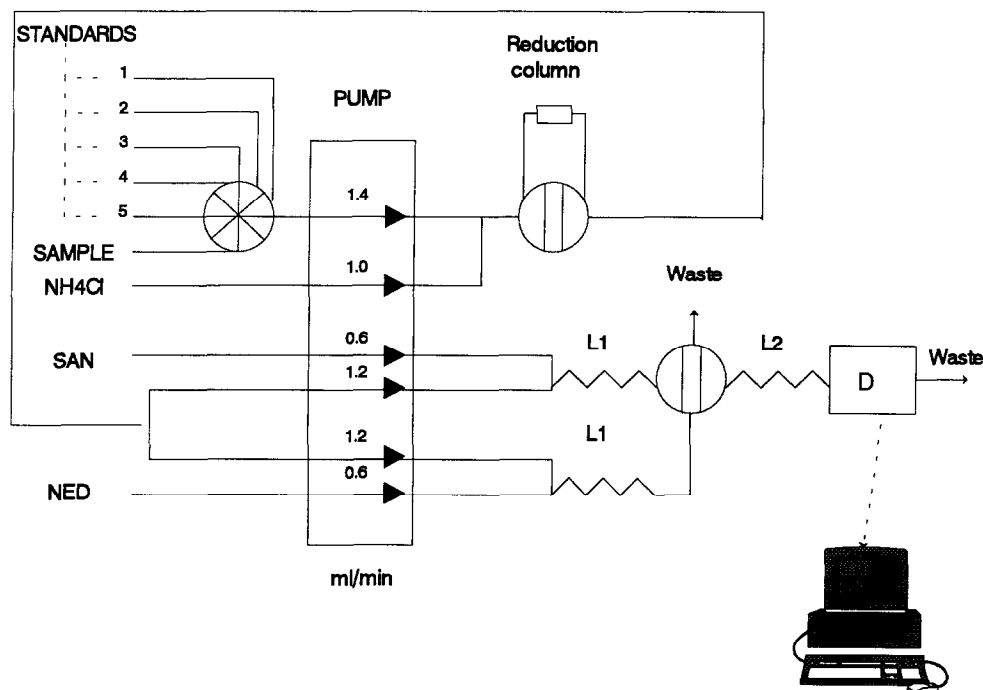


Fig. 1. Flow manifold for the determination of nitrate and nitrite by flow-injection analysis. D is the colorimetric detector,  $L_1$  (10 cm) and  $L_2$  (100 cm) are respectively the pre- and post-injector lines.

dual-wavelength monitoring approach of the FIA. This method is currently exploited in liquid chromatography to suppress the solvent peak [7]. Dual-wavelength spectrophotometry has been utilized before by Zagatto et al. [8] and Chung et al. [9], who proved that it is a powerful means of overcoming Schlieren effects in FIA and stopped-flow techniques. The principle is to measure simultaneously the signal at two different wavelengths: one at which the product predominantly absorbs light and a reference wavelength at which no absorbance change due to the chemical reaction is observed. The precision and sensitivity of both signal treatments are compared when varying temperature, salinity and pressure conditions.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and standards

All solutions were of analytical-reagent grade and distilled, deionized water (Millipore Milli-Q water system) was used. Standard nitrite and nitrate stock solutions were prepared to contain 5000  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ -N and 5000  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_2^-$ -N (506 mg of  $\text{KNO}_3$  and 345 mg of  $\text{NaNO}_2$  dried for 2 h at 105°C, respectively). Working standards were prepared daily by serial dilution of the stock solutions.

The concentration of the nitrate solutions was determined by the conventional technique of reducing nitrate to nitrite with a cadmium column and measuring the nitrite as an azo dye. The sulphanilamide reagent (SAN) was prepared by dissolving 10 g of the compound in 1.0 l of 10% (v/v) HCl. The *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (NED) reagent was prepared by dissolving 1 g of the compound in 1.0 l of deionized water. The buffer solution was prepared by dissolving 30 g of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in 1.0 l of deionized water. The pH of this buffer was adjusted to 8.5 with ammonia [10]. The cadmium reactor columns are prepared according to Tréguer and Le Corre [11]. The cadmium granules (0.25–0.31 mm) are copperized according to the method described by Wood et al. [12] and packed into glass tubes (10 cm long and 0.2 cm I.D.) plugged with glass wool. The reduction rate of this reductor is 100%.

### 2.2. Flow scheme

The flow-injection manifold used to optimize the system is shown in Fig. 1. This manifold is based on the system proposed by Thomsen et al. [6]. The sample stream is separated in two equal streams, each mixed with one reagent. A peristaltic pump (Ismatec IPN) is used to propel the reagents and samples through a PTFE tubing (0.8 mm I.D.). Tygon pump tubes are used to transfer the sample (sea water or standards) and reagents. A 4-way valve (Rheodyne Model 5020) is used to switch the cadmium reduction column in and out of line. Nitrite or the total nitrate and nitrite concentrations can then be determined. A rotary injection valve (Rheodyne Model 5020) is used to automatically inject the sample and the diamine mixing reagent. The lag time for water to flow from the inlet to the detector is 70 s. A halogen lamp is used as the light source. A 200–280  $\mu\text{m}$  optical fibre joins the lamp and the flow cell. The flow cell is constructed from plexiglass and has a 3 cm path length and 1 mm I.D.. Although increasing the diameter of the flow cell can result in a decrease in the refractive index signal [2], we decided to maintain an internal diameter of 1 mm in order to prevent any flow perturbation in the manifold. The absorbance is simultaneously measured at two wavelengths (540 and 630 nm) using filters (10 nm bandwidth) placed at the end of a multimode coupler (1:2). The signal obtained from the detector is digitized via a 12-bit analog–digital converter and computed by the Notebook software.

### 2.3. Manifold optimization

The sensitivity of the reaction will be influenced by the residence time in each segment of the reaction manifold (preinjector line and postinjector line). The optimum length of the mixing coils ( $L_1$ ,  $L_2$ ) was examined over the range 10–60 cm and 50–100 cm, respectively, so as to obtain a good sample rate. The length of coil  $L_1$  has little effect on the coloration because the kinetics of the initial diazotation reaction is very rapid [13]. A minimal length of 10 cm is then chosen for  $L_1$ . The sensitivity is more dependent on the extent of the reaction between  $\text{NO}_2^-$  and NED reagent. The absorbance increases with the time of contact. Thus, a length of 100 cm for  $L_2$  was chosen.

Table 1

Percentage of reduction rate of two kinds of column reactors for a 30  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ -N solution

	Reduction rate of column reactor (%)		
	0 PSU	17 PSU	34 PSU
Column 1 (I.D = 1.5 mm, $l$ = 8 cm)	84	76	71
Column 2 (I.D = 2 mm, $l$ = 10 cm)	100	100	100

The volume of the sample injected has a significant effect on the coloration. The signal increases with increasing sample volume in the range of 50–150  $\mu\text{l}$ . A compromise sample loop length of 20 cm (100  $\mu\text{l}$ ) was used for subsequent experiments. Varying the flow-rates of SAN and NED reagent solutions over the range 0.32–1.2  $\text{ml min}^{-1}$  produce changes in the coloration. The sensitivity is somewhat improved at lower flow-rates because of the increase in the reaction time. This reflects the larger influence of reaction time over the molar ratio reagent: $\text{NO}_2^-$ . A flow-rate of 0.6  $\text{ml min}^{-1}$  was then chosen as lower flow-rates did not permit us to observe a linear regression line between 0 and 100  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ -N. In order to obtain dilutions which permit work in this

concentration range, the flow-rate of the  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution was fixed to 1.4  $\text{ml min}^{-1}$ .

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Adaptation of the column reactor to *in situ* measurements

For an *in situ* utilization, the column reactor should be adapted for temperature, pH, and salinity variations. According to Collos et al. [10], if the pH of the  $\text{NH}_4\text{Cl}$  buffer was adjusted to 8.5 with ammonia, sea water and fresh water samples were brought to a uniform pH of 8.2–8.3. The loss of nitrite is

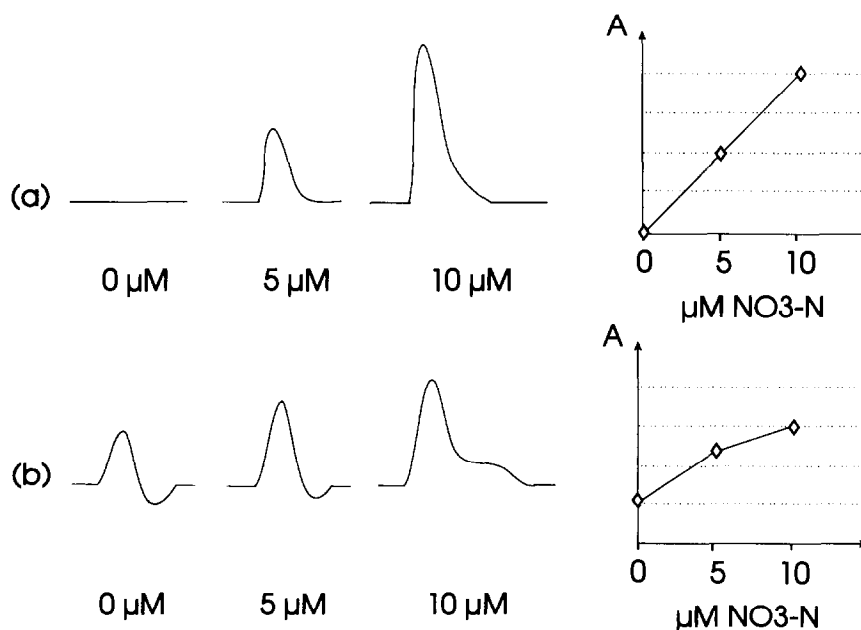


Fig. 2. Influence of the Schlieren effect on the relationship between absorbance and concentration. Behaviour of peak profile when varying nitrate concentration (a) without Schlieren effect and (b) with Schlieren effect. The absorbance is obtained by measuring the maximum height of the transient signal.

then only about 5%, the sensitivity is improved by a factor two and the precision by a factor five. The effect of temperature on the reduction rate of the column is discussed by various authors. According to Brewer and Riley [14], there is no temperature influence between 0 and 35°C. Elsewhere, Nydahl [15] established that between 20 and 30°C there was little temperature effect on the reduction, but at 10°C the reduction was slower. Another interference is caused by chloride ions which have a strongly retarding effect on the reduction rate because of interferences with the reaction mechanism [15]. To compensate for temperature and chloride interferences, we can either increase the length of the column reactor or decrease the flow-rate of the sample in the manifold, in order to increase contact time between metal and solution. The time analysis is considerably increased when using this last solution and is thus not suitable for *in situ* utilization. Results obtained with two reduction columns (Table 1) show that the effect of salinity on the reduction rate is eliminated when using a column of 10 cm length and 2 mm I.D. In order to prevent any flow perturbation in the manifold, the design of

this last reductor was modified (62.5 cm  $\times$  0.8 mm I.D.). However, the flow of the sample stream was then badly restricted and this set up back pressures which tended to burst joints.

### 3.2. Single wavelength measurement

The Beer–Lambert law is the conventional signal treatment used in spectrophotometry. The absorbance represents the log ratio of sample and reference intensities (Eq. 1).

$$A = \varepsilon cb = \log(I_0/I) \quad (1)$$

where  $A$  is the absorbance,  $\varepsilon$  the molar absorptivity,  $c$  the solution concentration and  $b$  the path length of the cell.  $I$  and  $I_0$  are respectively the radiation intensities transmitted by the sample and the reference. In FIA, a linear concentration–absorbance relationship is recorded when the signal obtained for a solution containing no nitrate is considered as the reference intensity (the baseline) and when the absorbance of the sample is measured at the maximum height of the transient signal (Fig. 2a). However, because of the refractive index, a sinusoidal shape is

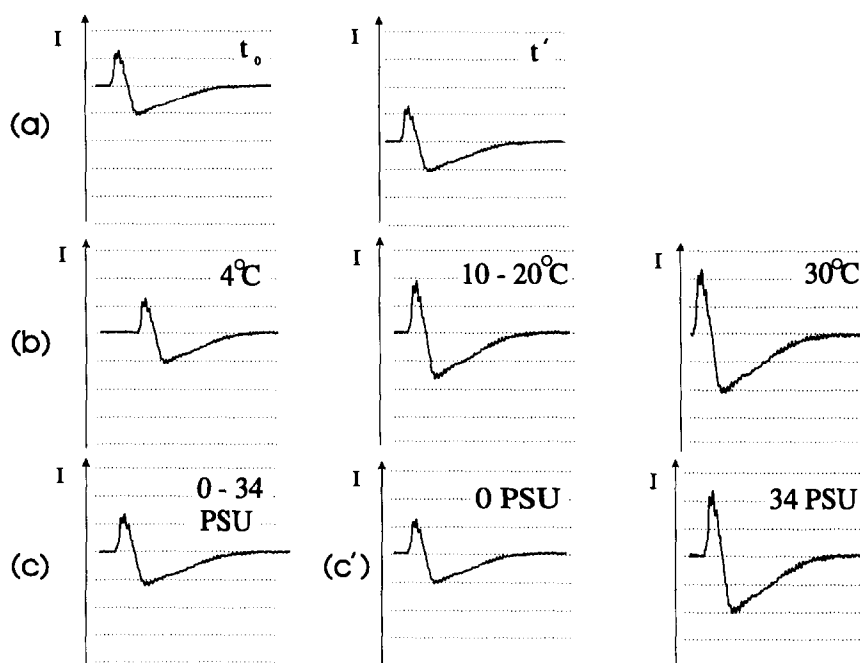


Fig. 3. Change in the refractive index behaviour observed for a 0  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ -N solution when there is (a) lamp fluctuations with time, (b) temperature variations, (c) salinity variations with the proposed manifold, and (c') salinity variations with classical manifold.



often obtained in FIA for a 0  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ -N solution [16] (Fig. 2b). The reference is then more difficult to define so as to obtain good precision and sensitivity. To obtain the linear concentration–absorbance relationship, a time-integrated absorbance is calculated. The most common way to eliminate the error due to the refractive index is to consider the reference as the integrated area ( $A_t$ ) of the signal obtained for a 0  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ -N solution during 60 s. The following signal treatment is obtained:

$$A_t = \log \left[ \frac{\int_{t=0}^{60} R(t) dt}{\int_{t=0}^{60} S(t) dt} \right] \quad (2)$$

where  $R(t)$  is the intensity of the reference signal = signal of a 0  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ -N standard solution obtained at 540 nm and  $S(t)$  is the intensity of the sample signal at 540 nm. Applying this equation, a linear relationship between integrated absorbance ( $A_t$ ) and concentration is obtained. However, we observe that some fluctuations in the measured light intensities can induce a shift in the signal behaviour of the reference (Fig. 3a). In order to compensate for such fluctuations, we introduce a corrective term  $k$  into Eq. 2:

$$A_t = \log \left[ k \frac{\int_{t=0}^{60} R(t) dt}{\int_{t=0}^{60} S(t) dt} \right] \quad (3)$$

where  $k = i_s/i_r$ ,  $i_s$  is the baseline intensity of the sample and  $i_r$  is the baseline intensity of the reference. For ease of presentation we call Eq. 3 the green signal treatment (measurement at 540 nm).

This signal treatment can be used for laboratory measurements, where experimental conditions are usually quite stable; however, it is not totally satisfactory for in situ utilization. In this case, exterior parameters which are difficult to control such as temperature, salinity and pressure must be taken into account. Laboratory experiments were then conducted to observe the behaviour of the refractive index obtained for a 0  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ -N solution at various temperatures, salinities and pressures. When the manifold was placed in a pressure vessel in which fresh water is injected to realize the immersion simulation up to 30 bar (pump and valves motors are pressure-compensated using oil), no variation of the refractive index signal was observed between 0 and 30 bar. With a classic FIA manifold (injection of reagent in the sample stream), the refractive index amplitude is considerably amplified when the difference of salinity between the injected solution and the flowing stream solution increases [16] (Fig. 3c'). As the refractive index observed with our manifold (sample stream separated into two streams, each mixed with one reagent before the

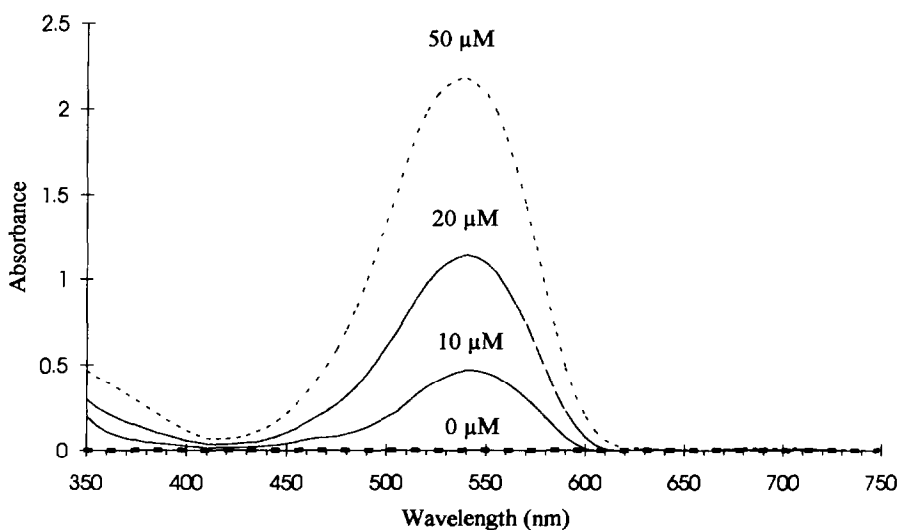


Fig. 4. Spectral scans of several azo dyes derivatized from nitrite solutions (0, 10, 20 and 50  $\mu\text{M}$ ).

injection valve) results only from differences in the composition of reagents, variations of the salinity were found not to change the shape of the signal (Fig. 3c). The influence on the refractive index of temperature variations is shown in Fig. 3b. It is characterized by changes in amplitude and by a shift in the time of the signal (due to variations of the flow-rate). A refractive index measured at 4°C then looks very different to a refractive index measured at 30°C. Thus any measurement of the 0  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ -N reference solution must be conducted at the same temperature as the sample if it is to be used as a meaningful reference signal. Eventual fluctuations due to pump pulsations during an in situ utilization represent also a possible source of error in the behaviour of the refractive index. Thus, in order to consider a blank representative of the external conditions influence, the reference signal must be measured simultaneously with the sample signal. This enforces the use of a dual-wavelength monitoring approach.

### 3.3. Dual-wavelength measurement

The principle of the dual-wavelength method is to measure the signal at two different wavelengths: one at which the absorbance change due to chemical reaction is observed and another one which reflects no influence of coloration but which permits observation of the refractive index. To determine these wavelengths, a visible absorption spectrum of the azo dye derived from nitrite solutions was plotted (Fig. 4) using a conventional spectrophotometer (Philips PU 8625). From 630 to 750 nm, the absorbances of distilled water and of the azo dye solutions are the same. So, 630 nm was chosen in the present study as the reference wavelength although experiments conducted at 660 nm provide similar results. 540 nm is the conventional wavelength chosen to measure the colour intensity of the nitrate and nitrite azo dye solutions. The light intensity passing through the sample solution in the cell for 60 s was measured simultaneously at 540 and 630 nm (Fig. 5). According to Zagatto et al. [8], the magnitude of the Schlieren effect is independent of the wavelength. The signals observed at 540 and 630 nm for a 0  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ -N solution are similar. Furthermore, the signal observed at 630 nm remains the same whatever the

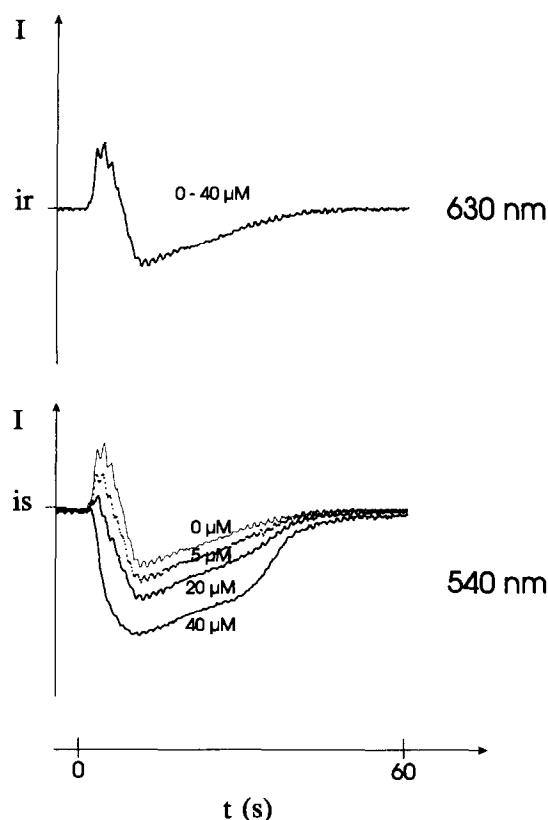


Fig. 5. Behaviour of signals received (top) at 630 nm and (bottom) at 540 nm during 60 s for several nitrate standards.

nitrate concentration. The  $\text{NO}_3^-$  concentration can then be deduced from the dual-wavelength measurement via the following signal treatment:

$$A_t = \log \left[ k \frac{\int_{t=0}^{60} R(t) dt}{\int_{t=0}^{60} S(t) dt} \right] \quad (4)$$

where  $R(t)$  is the intensity of the reference signal = signal of the sample measured at 630 nm and  $S(t)$  is the intensity of the sample signal = signal of the sample measured at 540 nm. In this case, the factor  $k = i_s/i_r$  represents the intensity ratio of the sample baseline ( $i_s$ ) at 540 nm and the reference baseline ( $i_r$ ) at 630 nm. As opposed to the green treatment (measurement at 540 nm), the name of green–red treatment (measurement at 540 and 630 nm) is given to Eq. 4.

Table 2

Relative standard deviation obtained with both signal treatments at several nitrate concentrations for each pressure step (0, 2, 10 and 30 bar)

Pressure (bar)	<i>n</i>	Concentration ( $\mu\text{M}$ )				
		0.5	1	10	20	30
0	10					
Green		1.267	0.327	0.037	0.025	0.013
Green–red		0.057	0.070	0.022	0.017	0.013
2	5					
Green		0.991	0.253	0.021	0.019	0.010
Green–red		0.062	0.059	0.016	0.013	0.007
10	5					
Green		0.862	0.375	0.031	0.017	0.013
Green–red		0.132	0.098	0.019	0.018	0.011
30	5					
Green		1.089	0.127	0.027	0.021	0.016
Green–red		0.073	0.068	0.017	0.019	0.012

### 3.4. Calibration graph: detection limit and reproducibility

A calibration run obtained with 0–40  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ -N standards by the proposed flow-injection system was established. The results obtained with the two kinds of signal treatment presented above are compared. Two linear calibration graphs were obtained with both signal treatments over this range ( $r^2 = 0.999$ ) which are described by the following equations:

$$A_t = 0.390C + 0.098 \quad (\text{green signal treatment})$$

$$A_t = 0.394C - 0.551 \quad (\text{green–red signal treatment})$$

where  $C$  is the concentration ( $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ -N).

The relative standard deviation (R.S.D.) of 10 injections, each of the solutions containing 0.5, 1, 10, 20 and 30  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ -N, are calculated (Table 2). We observed that both treatments gave us values of

R.S.D. of about 1% for solutions containing more than 10  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ -N. However, for solutions of 0.5  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ -N, using the green–red signal treatment, R.S.D. values of about 5% were obtained, whereas an R.S.D. of 126% was obtained with the green signal treatment. The detection limit ( $3\sigma_b$ ) [17] is also better for the green–red signal treatment (0.45  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ -N) compared to 0.9  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ -N obtained with the green treatment ( $n = 10$ ). The green–red treatment seems to be more precise for determining low nitrate concentrations. The linear concentration range can be extended up to 150  $\mu\text{M}$  when using a cell with a path length of 1 cm (Table 3).

### 3.5. Pressure influence

Johnson et al. [18] notice that the pressure does not seem to have any influence on the chemical

Table 3

Concentration range and relative standard deviation ( $n = 5$ ) obtained with several path lengths of cells

Path length of the cell (cm)	R.S.D. (20 $\mu\text{M}$ )	Concentration range ( $\mu\text{M}$ )							
		0–40		0–70		0–100		0–150	
		Equation	$r^2$	Equation	$r^2$	Equation	$r^2$	Equation	$r^2$
1	2.60	$A_t = 0.155C - 0.039$	0.999	$A_t = 0.155C - 0.012$	0.997	$A_t = 0.152C - 0.072$	0.997	$A_t = 0.143C + 0.360$	0.993
2	2.36	$A_t = 0.272C - 0.142$	0.998	$A_t = 0.253C - 0.130$	0.991	$A_t = 0.211C + 1.015$	0.968		
3	0.99	$A_t = 0.383C - 0.301$	0.998	$A_t = 0.312C - 0.543$	0.976				

$C$  is the nitrate concentration ( $\mu\text{M}$ ).

reaction and on the efficiency of the column reactor. To verify this assumption, tests were conducted at several pressure steps. The manifold was then placed in a pressure vessel in which the pressure was fixed successively at 2, 10 and 30 bar. Some previous experiments had been conducted during 8 h to observe the pump and tubes behaviour under pressure variations. These showed that the flow-rate in the manifold is not more perturbed at 30 bar than at atmospheric pressure. Calibration runs were processed at 2, 10 and 30 bar with five nitrate and nitrite standards (0.5, 1, 10, 20 and 30  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ -N). No change in the behaviour of the blank signal is observed with varying pressure. The reduction rate of the column reactor remains equal to 100% whatever the pressure. No influence of pressure on the chemical reaction was observed. The standard deviations calculated at each concentration for all pressure values investigated are in fact very similar to those obtained at atmospheric pressure (Table 2). So, linear graphs were obtained for nitrite and nitrate at each pressure. The correlation factors ( $r^2$ ) obtained with the green–red treatment are then slightly better than those obtained with the green treatments (for nitrate 0.995 and 0.990, for nitrite 0.998 and 0.992, respectively with  $n = 90$ ).

### 3.6. Salinity influence

Filtered aged coastal water (its nitrite and nitrate content was found to be 0  $\mu\text{M}$ ) with a salinity of 34 PSU was used to make a range of salinities (0, 17

and 34 PSU) by dilution with distilled deionized water. From the water of each salinity, five standards ranging from 0 to 30  $\mu\text{M}$  were made. The difference in salinity between reagents and samples induce refractive index variations in normal FIA manifolds [6,16] (Fig. 3c'). However, due to the flow scheme used in the proposed manifold, this kind of variation is eliminated (Fig. 3c). The influence of salinity on the reaction kinetics was evaluated. If signals of fresh water and sea water solutions are superimposable at 630 nm whatever the nitrite concentration, some differences were found at 540 nm (Fig. 6): the signal of a solution containing nitrate is improved if the solution matrix is sea water. So, according to Pai et al. [13], the reaction development is considerably faster in sea water than in fresh water (35% faster at 30°C for a 0.25  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_2^-$ -N solution). Comparing the results obtained at each salinity with both signal treatments (Fig. 7), a difference in  $A_t$  values is observed between 0 and 34 PSU solutions at all concentrations. The slopes of the 17 and 34 PSU solutions are the same between 0 and 20  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ -N. The effect of the different kinetics between the two solutions is only observed in 30  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ -N solutions. These results showed that the slope of the calibration line is independent of the salinity between 17 and 34 PSU which is the salinity range currently required for coastal water measurements.

### 3.7. Temperature influence

To observe temperature influence on the Griess reaction in FIA, the manifold was placed in a steam room where the temperature was successively fixed at 4, 10, 20 and 30°C. The main observation of this test is that the temperature influence is characterized by two principal phenomena: first the effect on the flow-rate and second the effect on the reaction kinetics.

The effect on the flow-rate is clearly demonstrated by the change in the refractive index behaviour of a 0  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ -N solution with varying temperature (Fig. 3b). The shape of the refractive index is modified in amplitude and in time-course, which is defined as the difference in the starting point of the signal with time (i.e. the peak observed at 30°C appeared 20 s before the one observed at 4°C). This is caused by changes in viscosity and

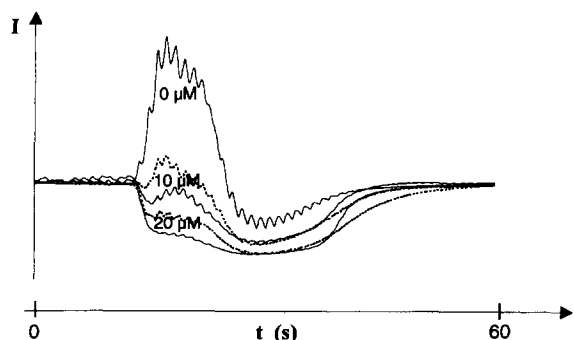


Fig. 6. Behaviour of signals received at 540 nm during 60 s for two series of nitrate standards (0, 10 and 20  $\mu\text{M}$ ), one with a salinity of 0 PSU (broken line) and the other one with a salinity of 34 PSU (solid line).

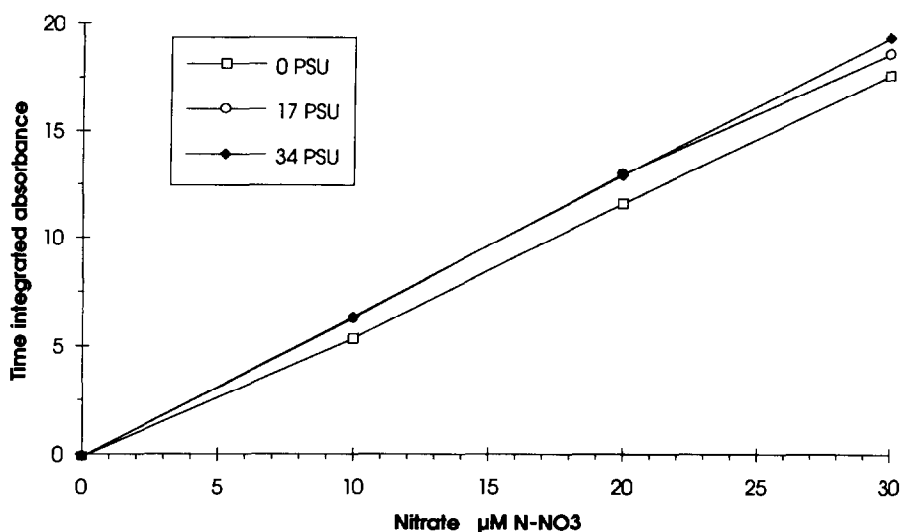


Fig. 7. Calibration graph obtained for both signal treatments when varying the salinity between 0 and 34 PSU (equation lines obtained with the green signal treatment  $A_{t, 0 \text{ PSU}} = 0.61C - 0.59$ ,  $A_{t, 17 \text{ PSU}} = 0.68C - 0.60$  and  $A_{t, 34 \text{ PSU}} = 0.69C - 0.68$ , with the green-red signal treatment  $A_{t, 0 \text{ PSU}} = 0.60C - 0.50$ ,  $A_{t, 17 \text{ PSU}} = 0.68C - 0.56$  and  $A_{t, 34 \text{ PSU}} = 0.68C - 0.49$ ,  $n = 15$ ).

mixing at different temperatures. The necessity to measure the reference and the sample under the same conditions when using the green-red signal treatment is then an obligation to obtain good sensitivity, especially at low nitrate concentrations. The influence of temperature on the development rate of the Griess reaction was previously described for the manual nitrate determination. According to Grasshoff [19], the chemical reaction is independent of the temperature between 10 and 20°C and according to Pai et al. [13], the rate of colour development can be efficiently enhanced by an increase in temperature above 30°C (i.e. 25% faster at 35°C than at 30°C to obtain 90% colour formation with a 0.25 µM NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N solution). So as to verify this phenomenon, some stopped-flow experiments were conducted for a 10 µM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N solution at 4, 10, 20 and 30°C. The pump was stopped 20 s after the injection. We observed that the reaction developed faster when the temperature increased because at 30°C the reaction is almost complete just after the stop while at 4°C the time required to obtain the same colour intensity is 30 s more (Fig. 8). The reaction kinetics is comparable at 10 and 20°C. The only way to eliminate the kinetic difference is to increase the length of the post-injector line  $L_2$  from 1 to 2.5 m. However, in this case the time analysis, one of the principal

advantages of using FIA for in situ measurements, increases (1 min with 1 m length, 2 min 50 s with 2.5 m length) and becomes comparable to other methods like unsegmented flow analysis (about 2 min 30 s, Daniel, personal communication).

In order to test the efficiency of the signal treatments described above, six nitrate standards covering the range 0–40 µM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N were processed at 4, 10,

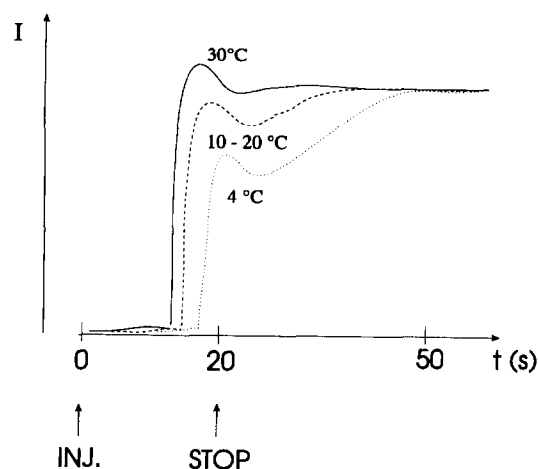


Fig. 8. Temperature influence on the colour development of a 10 µM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N solution during a stopped-flow experiment.

Table 4

Standard deviation obtained with both signal treatments at several nitrate concentrations when varying the temperature

Signal treatment	Concentration ( $\mu\text{M}$ )				
	0.5	1	10	20	40
Green	0.68	0.79	0.76	1.22	1.33
Green–red	0.26	0.29	0.69	0.73	1.13

The temperature steps are 4, 10, 20 and 30°C ( $n = 3$  at each temperature).

20 and 30°C. The reference signal used when applying the green signal treatment is the signal observed at 10°C for a 0  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ -N at 540 nm. When comparing the standard deviation (S.D.) obtained with both signal treatments (Table 4) at each concentration for all temperatures ( $n = 12$ ), the great advantage of using the dual-wavelength treatment when varying the temperature is proved. It should be noticed that, because of the increase in reaction development with temperature, the standard deviation values increases with concentration for both signal treatments. To observe the slope of the lines obtained at each temperature over the range 0–40  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ -N, no important influence of temperature is detected between 10 and 20°C with the green–red signal treatment ( $A_{t,10^\circ\text{C}} = 0.416C_{\text{NO}_3^-} - 0.479$ ;  $A_{t,20^\circ\text{C}} = 0.412C_{\text{NO}_3^-} - 0.370$ ,  $n = 18$ ). This observation is not valid with the green signal treatment ( $A_{t,10^\circ\text{C}} = 0.423C_{\text{NO}_3^-} - 0.163$ ;  $A_{t,20^\circ\text{C}} = 0.411C_{\text{NO}_3^-} + 1.119$ ,  $n = 18$ ).

When using the green signal treatment, two kinds of error sources are observed on the  $A_t$  value: the error due to a non-appropriate reference and the error due to the kinetics of the Griess reaction. Using the green–red signal treatment allows us to eliminate only the error due to the reference. Thus, there is no need for special care for in situ measurements when the water temperature varies from 10 to 20°C, but more frequent standardization is recommended when the water temperature changes sharply out of this range, especially for high nitrate concentrations.

#### 4. Conclusion

This work constitutes a preliminary study on the development of a submersible analyser based on FIA to measure nitrate in sea water. It proved that considering a reference measured simultaneously with the

sample by using dual-wavelength spectrophotometry allows us to obtain better precision and sensitivity for in situ measurements specially for low nitrate concentrations. Despite the error caused by change in reaction kinetics with varying temperature and salinity, the signal treatment proposed in this work has clearly demonstrated that this method is a very useful approach for the development of automatic techniques for sea water analysis.

#### Acknowledgements

This work was supported by the Conseil Régional de Bretagne and the Mors-environment company. The authors are very grateful to Eric Menut, Bernard Leïldé, Henri Floch and Marc Prévosto for their great assistance with the experimental work. This study is contribution 94007 of the URA CNRS 1513.

#### References

- [1] K.S. Johnson, C.L. Beehler and C.M. Sakamoto-Arnold, *Anal. Chim. Acta*, 179 (1986) 245.
- [2] K.S. Johnson, R.L. Petty and J. Thomsen, in A. Zirino (Ed.), *Mapping Strategies in Chemical Oceanography: Proc. 185th Annual Meeting of the American Chemical Society*, 1983, Seattle, WA, 1985.
- [3] J.R. Clinch, P.J. Worsfold and H. Casey, *Anal. Chim. Acta*, 200 (1987) 523.
- [4] L.K. Shpigun, I. Kolotyrykina and Y.A. Zolotov, *Anal. Chim. Acta*, 261 (1992) 307.
- [5] K.S. Johnson and R.L. Petty, *Limnol. Oceanogr.*, 28 (1983) 1260.
- [6] J. Thomsen, K.S. Johnson and R.L. Petty, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 2378.
- [7] L.R. Snyder and J.J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, Wiley, New York, 2nd edn., 1979.
- [8] E.A.G. Zagatto, M.A.Z. Arruda, A.O. Jacintho and I.L. Mattos, *Anal. Chim. Acta*, 234 (1990) 153.
- [9] S. Chung, X. Wen, K. Vilholm, M. De Bang, G. Christian and J. Ruzicka, *Anal. Chim. Acta*, 249 (1991) 77.

- [10] Y. Collos, K. Yin and P.J. Harrison, *Mar. Chem.*, 38 (1992) 325.
- [11] P. Treguer and P. Le Corre, *LOC Université de Bretagne Occidentale, Brest*, 2nd edn., 1975, p. 110.
- [12] E.D. Wood, F.A.J. Armstrong and F.A. Richards, *J. Mar. Biol. Ass.*, 47 (1967) 23.
- [13] S.C. Pai, C.C. Yang and J.P. Riley, *Anal. Chim. Acta*, 232 (1990) 345.
- [14] P.G. Brewer and J.P. Riley, *Deep-Sea Res.*, 12 (1965) 765.
- [15] F. Nydahl, *Talanta*, 23 (1976) 349.
- [16] D. Betteridge, E.L. Dagless, B. Fields and N.F. Graves, *Analyst*, 103 (1978) 897.
- [17] G.L. Long and J.D. Winefordner, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 712A.
- [18] K.S. Johnson, C.M. Sakamoto-Arnold and C.L. Beehler, *Deep-Sea Res.*, 36 (1989) 1407.
- [19] K. Grasshoff, in K. Grasshoff, M. Ehrhardt and K. Kremling (Eds.), *Methods of Seawater Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, 2nd edn., 1983, p. 1.



## **Chapitre 3**

### **Mise au point d'une maquette de faisabilité pour la mesure in situ des nitrates en milieu côtier**

#### **3.1. La marinisation**

Le transfert de l'appareillage mis au point au laboratoire à une maquette de faisabilité permettant d'effectuer des tests dans le milieu marin constitue une démarche technique appelée "marinisation". Pour ce faire, il faut tenir compte de nombreux problèmes qui se posent lors d'une utilisation en eau de mer.

La maîtrise des matériaux est fondamentale. Les caractéristiques mécaniques peuvent en effet évoluer au cours du temps lorsque le matériau est soumis à l'agression de l'eau de mer (corrosion des métaux et reprise d'eau des polymères). Il faut donc choisir des matériaux compatibles parmi un nombre restreint de candidats (certains aciers inoxydables, certains alliages d'aluminium protégés, alliages de titane, alliages de nickel). Une protection des surfaces ou une protection cathodique par anodes sacrificielles peut être nécessaire. De plus, les conditions hyperbares impliquent la sélection de matériaux selon leurs propriétés de compression et leur comportement au fluage et à la fatigue. Les différents éléments du capteur peuvent ainsi être placés dans des caissons étanches ou mis en équipression (sous huile).

L'étanchéité est critique surtout aux faibles pressions. Le savoir faire dans ce domaine est plutôt empirique et implique d'étudier avec soin toutes les contraintes de compressibilité et de dilatation thermique surtout si le système est en équipression.

Les mesures à long terme à proximité de la surface sont limitées par les bio-salissures et la biocorrosion. Les surfaces immergées se couvrent en effet rapidement d'un voile biologique puis sont colonisées par différentes espèces. Cette vitesse de colonisation dépend des conditions locales (activité biologique, température, concentration de la matière en suspension,...). Les morsures de poissons sont également à prendre en compte pour les câbles immergés, même s'il s'agit d'une explication parfois facile pour expliquer les ruptures.

Les contraintes opérationnelles (chocs, mise à l'eau, récupération en mer) ne doivent pas être minimisées. L'instrument marin est obligatoirement robuste ; un jour ou l'autre il sera mis en oeuvre dans des conditions de mer difficiles par un personnel non spécialisé ou sujet au mal de mer...

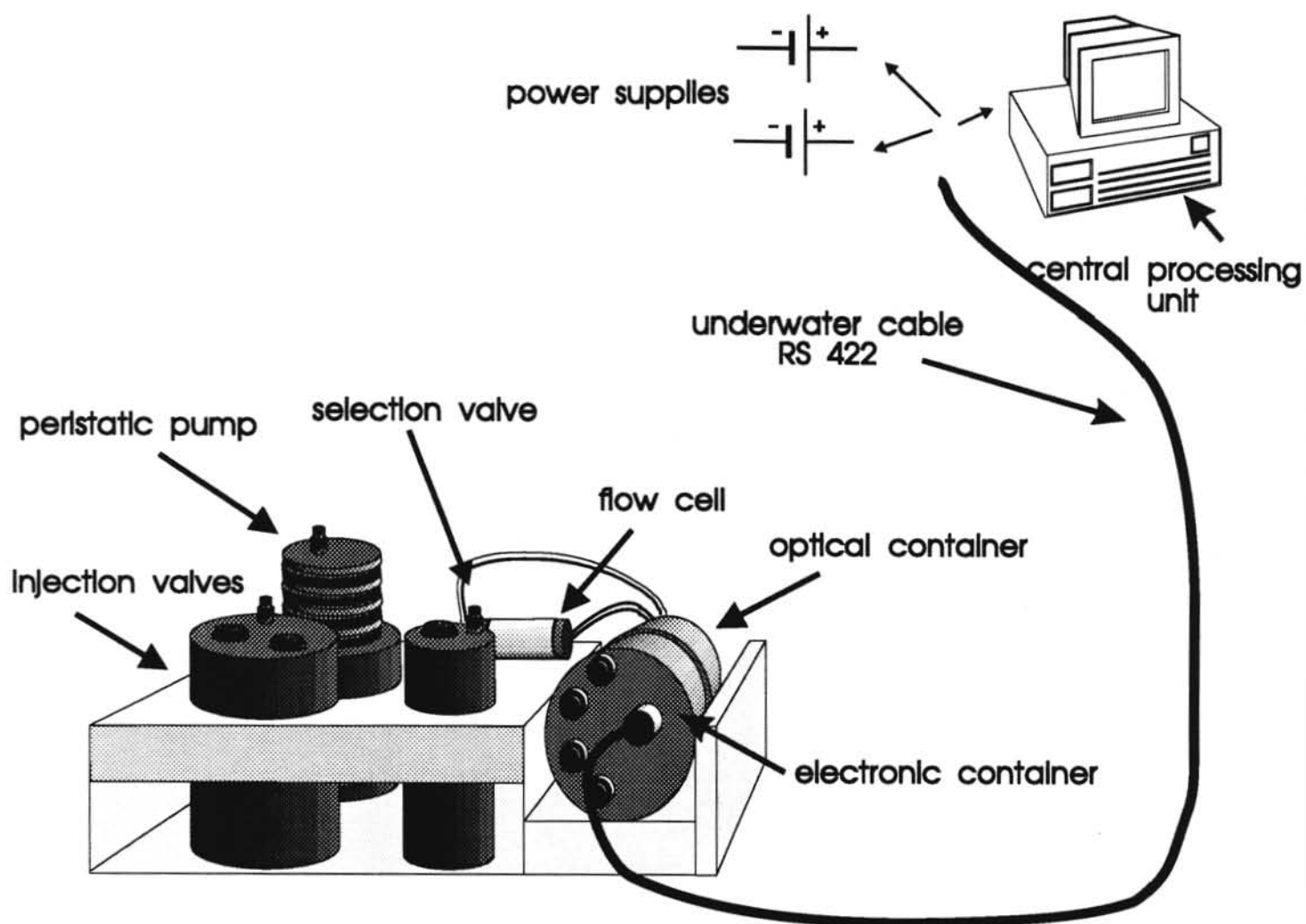
La qualification, la validation et l'intercalibration sont des étapes fondamentales du développement du capteur marin. La première partie du travail a donc porté sur le choix de composants adaptés aux besoins fonctionnels (débits, inertie chimique, volumes morts, temps de commutation des vannes...), sur leur adaptation aux contraintes opérationnelles (résistance en pression, étanchéité, limitation de la consommation électrique...), ainsi que sur les essais de caractérisation fonctionnelle des différents éléments. La caractérisation en pression des différents éléments a un double objectif. D'une part, de vérifier l'adaptation correcte des différents éléments à une utilisation en immersion et en pression, et d'autre part d'évaluer, s'il y a lieu, l'influence de la pression sur les caractéristiques fonctionnelles des composants (modification de débit, temps de commutation des vannes...). L'analyseur a été évalué dans les conditions réelles lors de campagnes en rade de Brest et en mer d'Iroise.

## 3.2. Caractéristiques de la maquette de faisabilité

### 3.2.1. Présentation générale de la maquette de faisabilité

L'appareil marinisé doit permettre le dosage des nitrates et nitrites dans un mode profileur dans le milieu littoral (0 - 300 m) dans une gamme 0-50  $\mu\text{M}$ . L'ensemble analyseur chimique est constitué des 5 entités fonctionnelles suivantes (Fig. 9) :

- une structure mécanique,
- un ensemble analytique comprenant des vannes, une pompe et un manifold dans lequel circule un fluide,
- un ensemble optique d'émission et de détection,
- une électronique de commande, d'acquisition et de traitements des données,
- un PC de surface qui permet de dialoguer avec l'appareil immergé.



**Fig. 9 : Structure de la maquette de faisabilité de l'analyseur chimique.**

### 3.2.2. Structure mécanique

La partie immergée du colorimètre est composée d'un châssis qui supporte l'enceinte électronique, l'enceinte optique et le module analytique (pompe, manifold, vannes). Le châssis de la maquette de faisabilité a été conçu de façon à permettre un accès aisé à l'ensemble des composants. Sa forme et sa taille seront modifiées lors de la réalisation d'un prototype pour permettre son transport par une seule personne (poids maximal 30 kg et taille maximale 210 x 70 cm) et faciliter sa mise à l'eau.

### 3.2.3. Module analytique

#### 3.2.3.1. Circuit analytique

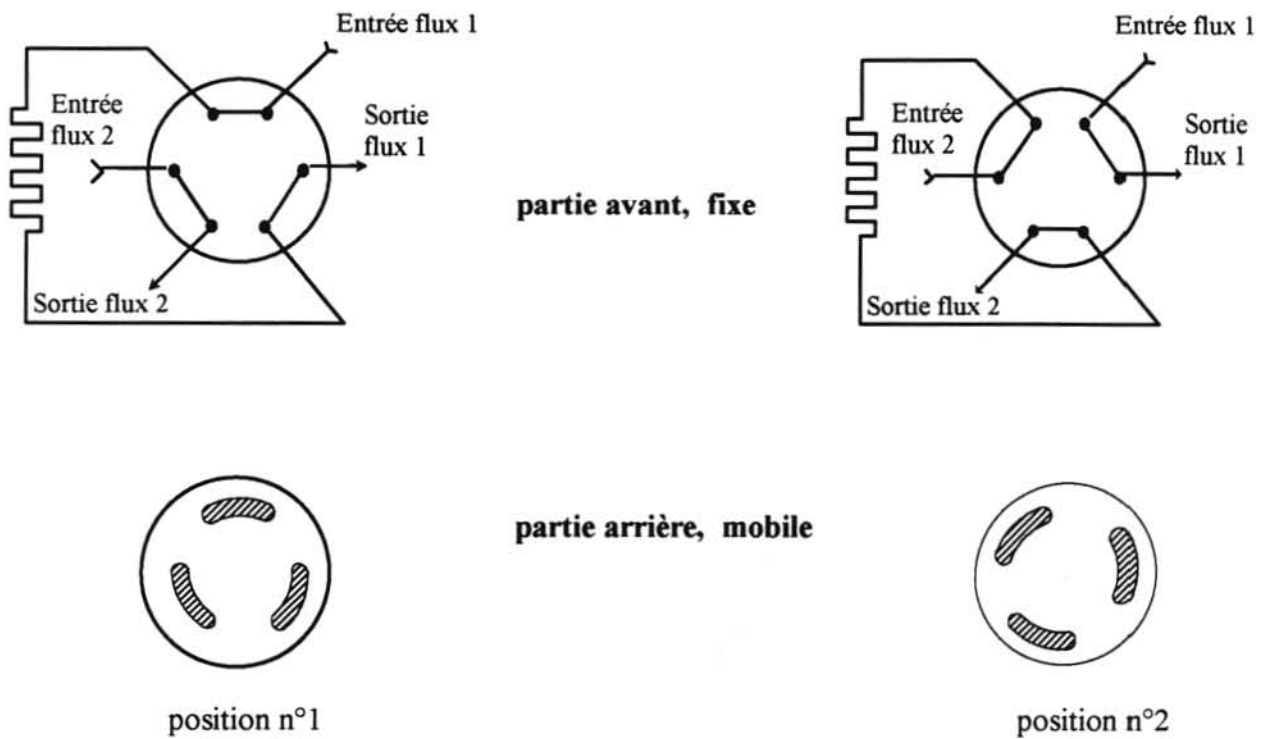
Les différents standards et réactifs sont disposés à l'intérieur de poches stériles (de type "poches de transfert"). Une filtration de l'échantillon avant son entrée dans le circuit analytique s'est avérée nécessaire. Les particules minérales peuvent en effet provoquer un colmatage dans le circuit (par exemple au niveau de la laine de verre placée dans la colonne de réduction) tout comme une altération des plateaux au niveau des vannes qui pourrait conduire à une dégradation de l'étanchéité. Des essais ont été menés à l'aide d'une crépine de 10  $\mu\text{m}$ . Aucune différence de débit notable n'a été observée pendant 7 heures entre un circuit pompant un échantillon d'eau de mer contenant une forte charge particulaire et un circuit pompant de l'eau distillée. A la suite de problèmes (contraction et durcissement) lors de manipulations à basse température ( $< 10^{\circ}\text{C}$ ), des tuyaux en PEEK (0.8 mm de diamètre interne) ont été préférés aux tuyaux en Téflon<sup>®</sup>. Les tés utilisés à différents endroits du manifold sont également en PEEK.

#### 3.2.3.2. Système de pompage

Le type de pompe permettant d'obtenir un débit très régulier et le moins pulsé possible est la pompe péristaltique. Le débit engendré par la pompe est fonction : du diamètre des tuyaux de pompe, de la vitesse de rotation des galets, du nombre de galets, de la viscosité du fluide à aspirer et du coefficient de frottement fluide-tuyau. Une pompe comportant 10 galets est préférable à l'obtention d'une bonne maîtrise du flux. La pompe doit également posséder au minimum 8 canaux pour permettre la fixation des différents tuyaux de pompe imposés par le circuit analytique. Ces tuyaux de pompe en Tygon<sup>®</sup> sont calibrés en diamètre interne. Notre choix s'est porté sur une pompe Gilson (minipuls III MP8).

La tête de pompe est entraînée en rotation à l'aide d'un moteur. Le mécanisme d'entraînement d'origine, constitué d'un moteur pas à pas et d'un réducteur, a été conservé, mais placé dans une enceinte pour fonctionner en équipression dans de l'huile diélectrique (huile Tellus C5 Shell,  $\rho = 0.8 \text{ kg/l}$ ). Ce montage s'adapte à la pression environnante grâce à une membrane plastique placée sur la tôle arrière de l'enceinte. L'intérêt de ce type de montage est de minimiser les contraintes mécaniques sur les enceintes contenant les éléments à isoler du

## (a) Vanne d'injection



## (b) Vanne de sélection

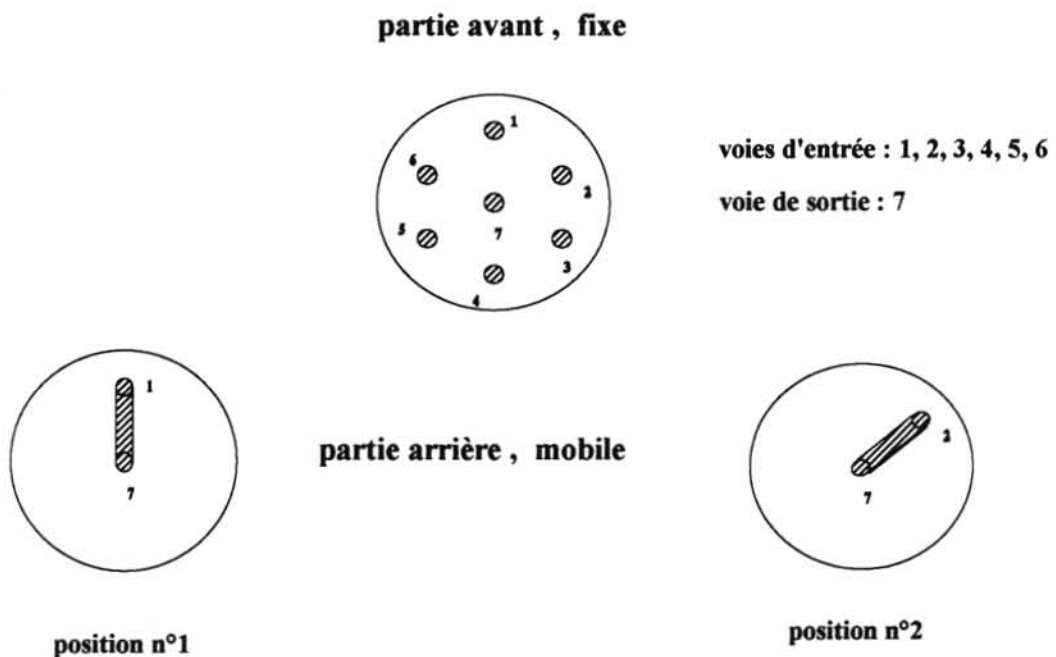


fig. 10 : Principe de fonctionnement (a) de la vanne d'injection et (b) de la vanne de sélection.

milieu marin et donc de diminuer considérablement les épaisseurs pour limiter le poids et l'encombrement. La liaison entre la tête de pompe, immergée dans l'eau de mer, et la motorisation se fait par l'intermédiaire d'un axe passant au travers d'une des cloisons de l'enceinte. L'étanchéité entre les zones "eau" et "huile" est assurée par un joint torique placé sur l'axe au niveau de la traversée de cloison.

La commande du moteur (cartes électroniques) est située dans un compartiment étanche. La transmission des alimentations et commandes se fait à l'aide d'un connecteur étanche disposé sur la tôle avant de l'enceinte.

### *3.2.3.3. Système de sélection*

Les vannes utilisées dans un analyseur submersible doivent répondre aux caractéristiques suivantes :

- fonctionner en équipression,
- avoir un diamètre de passage de l'échantillon identique à celui du circuit analytique (0.8 mm),
- posséder des matériaux inertes chimiquement afin de ne pas polluer les échantillons,
- un comportement bi-stable afin de consommer le moins d'énergie possible (lorsque la vanne est au repos, elle ne doit pas consommer d'énergie).

La vanne doit permettre la sélection soit de l'échantillon, soit du ou des standards permettant d'effectuer une calibration. La base du système est constituée par une vanne Rhéodyne haute pression de type 7060L. Le choix de cette vanne, qui peut fonctionner jusqu'à des pressions internes de 250 bars, a été dicté par la possibilité de la placer sous pression atmosphérique dans un caisson étanche au cas où la mise en équipression de ce matériel s'avérerait impossible. Le principe de fonctionnement de cette vanne est exposé sur la figure 10 a. Le passage de l'une à l'autre des six entrées possibles s'effectue par rotations successives de 60 degrés. Un codeur optique (Fig. 11a) permet de repérer les différentes positions de la vanne et d'avoir une excellente précision sur le positionnement. Lors de la fixation de la vanne sur son moteur, un programme informatique permettant une rotation pas à pas du moteur de la vanne a été mis au point pour positionner la vanne correctement vis à vis du codeur optique. Comme le passage du liquide s'effectue dans un intervalle de 210 pas, la position du codeur a été fixée au centre de cet intervalle.

Les travaux d'adaptation effectués sur cette vanne ont consisté en premier lieu à pouvoir l'actionner à l'aide d'un moteur pas à pas. Celui-ci a été choisi en fonction des importants efforts mécaniques à surmonter du fait des frottements imposés aux différentes pièces pour l'obtention d'une bonne étanchéité en pression. L'électronique de commande du moteur a été spécialement conçue et développée pour être intégrée au module électronique et informatique destiné à gérer en immersion l'ensemble des opérations élémentaires. Le montage mécanique

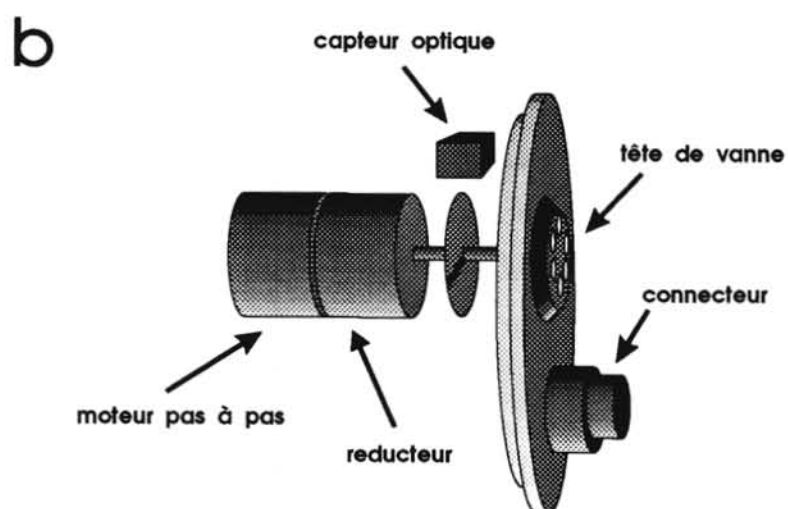
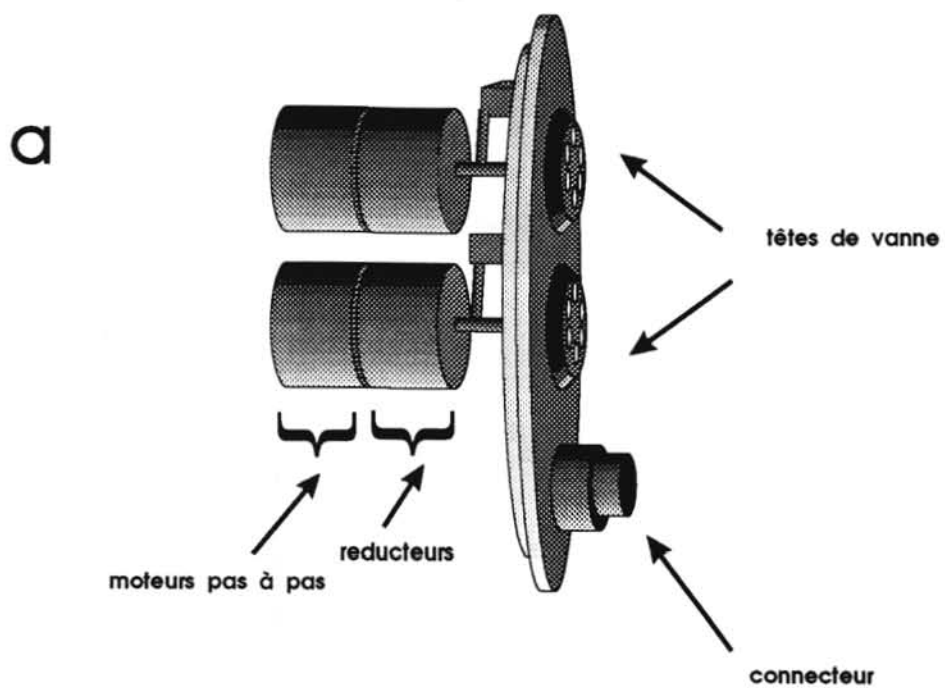


Fig. 11 : Principe de rotation (a) des vannes d'injection et (b) de la vanne de sélection



final est constitué par une enceinte cylindrique d'où émergent la tête de vanne, directement en contact avec l'eau de mer, et le connecteur électrique étanche assurant la liaison avec le sous-ensemble électronique. Le moteur de la vanne se trouve en équipression dans l'huile à l'intérieur de l'enceinte. Tout comme la pompe, il a été nécessaire de réaliser une étanchéité entre les zones "eau" - "huile". Le problème s'est révélé plus délicat dans ce cas en raison de la complexité de l'enveloppe mécanique de la vanne et a exigé l'utilisation de joints d'étanchéité à trois endroits différents.

#### 3.2.3.4. *Système d'injection*

La vanne d'injection est un des éléments principaux d'un circuit FIA. Le principe (Fig. 10b) est de remplir une boucle d'injection d'une solution qui sera injecté dans un autre flux par rotation de 1/6<sup>ème</sup> de tour de la vanne. Ce système repose sur l'utilisation d'une vanne Rhéodyne haute pression 6 voies, 2 positions (modèle 9010), acceptant jusqu'à 483 bars de surpression, dont le fonctionnement est illustré sur la figure 11b. Du fait de l'utilisation d'acide concentré, une tête de vanne en PEEK est préférée à une tête de vanne en acier. Les tests effectués avec ce dernier type de vanne ont en effet révélés une attaque chimique du métal caractérisée par un dégagement gazeux et par la formation d'un dépôt en surface. La vanne d'injection a fait l'objet de travaux d'adaptation identiques (motorisation et codage) à ceux décrits précédemment pour le système de sélection (Fig. 11b). La seule différence réside dans la commande de la vanne car seules deux positions peuvent être choisies au lieu de six.

#### 3.2.4. *Module optique*

Seule la cellule de mesure est soumise à la pression. La lampe, les photodiodes, les filtres interférentiels, les lentilles et les fibres optiques sont placés dans un compartiment étanche à la pression externe (Fig. 12). Des cellules de différentes longueurs de chemin optique (1, 2 et 3 cm) peuvent être utilisées pour obtenir une gamme de mesure proche de la concentration de l'échantillon.

La source est une lampe halogène issue du commerce (Maclite). L'intensité lumineuse de la lampe est modifiée en faisant varier la tension générée par le convertisseur A/D placé dans le caisson électronique. Une lentille focalisante est placée au foyer lumineux de la lampe. La lumière est ensuite transmise jusqu'à la cellule de mesure à l'aide d'une fibre optique (200-280  $\mu\text{m}$ ) multimode à gradients d'indices. Des fibres 50-125 et 100-140 ont été testées mais elles ne permettent pas la transmission d'une intensité lumineuse suffisante.

La fibre optique atteint la cellule de mesure, située à l'extérieur du caisson optique, à l'intérieur d'un tube en polyamide. La jonction à l'intérieur de la cellule entre la partie étanche, contenant la fibre optique, et la partie en pression, qui permet le passage du flux analytique, est

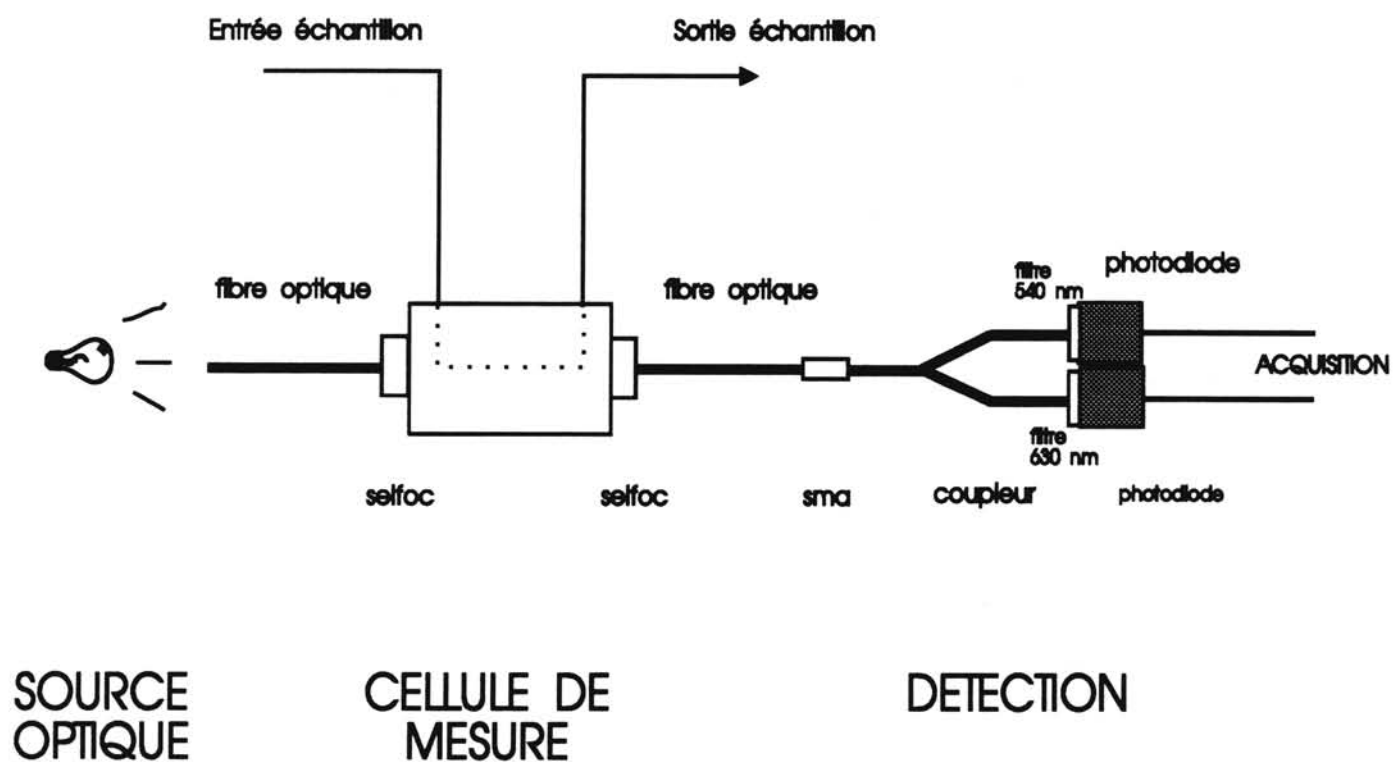


Fig. 12 : Schéma du circuit optique

effectuée à l'aide d'un hublot en verre et d'un joint torique. Cette cellule permet d'effectuer des mesures avec une pression interne d'au moins 30 bars.

Pour permettre la mesure du signal à deux longueurs d'onde, l'intensité lumineuse reçue à la sortie de la cellule par une fibre optique est séparée en deux à l'aide d'un coupleur multimode. La liaison entre la fibre optique et le coupleur est effectuée à l'aide d'un connecteur optique de type sma. A chaque extrémité du coupleur est placé un filtre interférentiel de bande passante égale à 10 nm. Le fait de placer une lentille collimatante entre la fibre et le filtre présente un intérêt seulement si la distance entre le filtre et le photorécepteur est supérieure à 1 cm. La détection de l'intensité lumineuse se fait ensuite sur des photodiodes (Photops, UDT 555UV). Le signal est pré amplifié avant d'être transmis au caisson électronique.

### 3.2.5. Module électronique immergé

A partir d'une commande reçue par le biais d'une liaison série (RS 422), ce module est capable de réaliser la séquence des opérations nécessaires à l'obtention de la mesure qu'il renverra au système central. Il rassemble les éléments suivants :

- une intelligence centrale (carte  $\mu$ PC AQ62) capable d'effectuer seulement des opérations élémentaires sur ordre du PC embarqué. Elle coordonne l'ensemble des fonctions élémentaires selon une séquence informatique prédéfinie pour obtenir une mesure puis transforme les données brutes obtenues en une valeur directement exploitable par le système central,
- une électronique de commande de la pompe (mise en marche/arrêt, variation de vitesse),
- une électronique de commande et de contrôle du positionnement des vannes,
- une électronique adaptée au système de détection,
- un dispositif de conversion analogique/numérique et de stockage temporaire des données.

### 3.2.6. Système de contrôle à bord

Le système de commande accessible à l'utilisateur à bord du navire doit permettre la programmation des séquences de mesure tout comme la modification des paramètres de fonctionnement en cours de réalisation d'une mesure et l'interrogation en temps réel des résultats (Fig. 13). Cette unité de surface est constituée d'un microprocesseur (Kontron 486 DX 33) et de deux alimentations (l'une stabilisée à 24 V pour permettre le fonctionnement des vannes et de la pompe et l'autre stabilisée à 5 V pour la carte  $\mu$ PC immergée). L'unité de surface dialogue à l'aide d'une liaison RS 422 avec l'unité électronique esclave immergée.

## 3.3. Essais des différents composants dans un caisson hyperbare

L'influence de la pression sur la méthode analytique, la validité de la tenue mécanique des organes fonctionnant en équipression, le fonctionnement des vannes, de la pompe et de leur

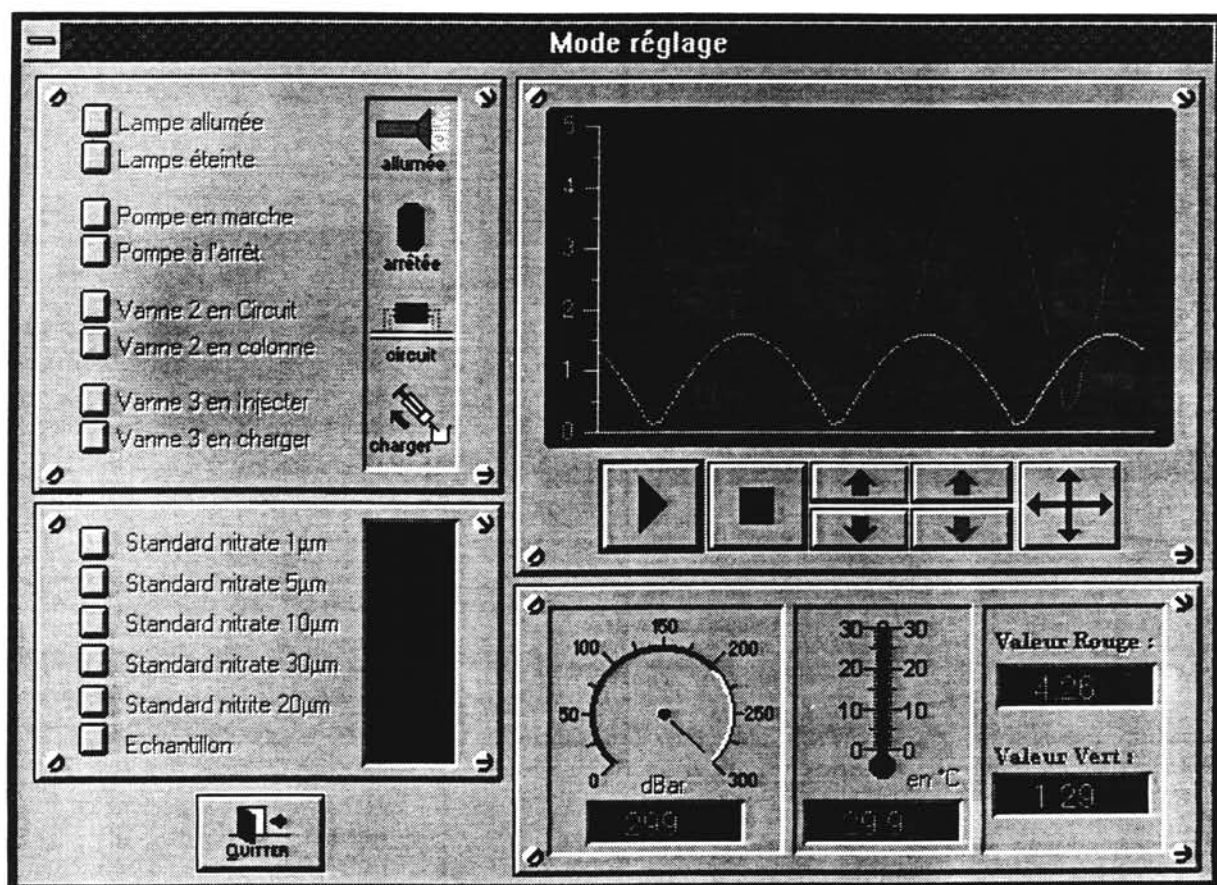
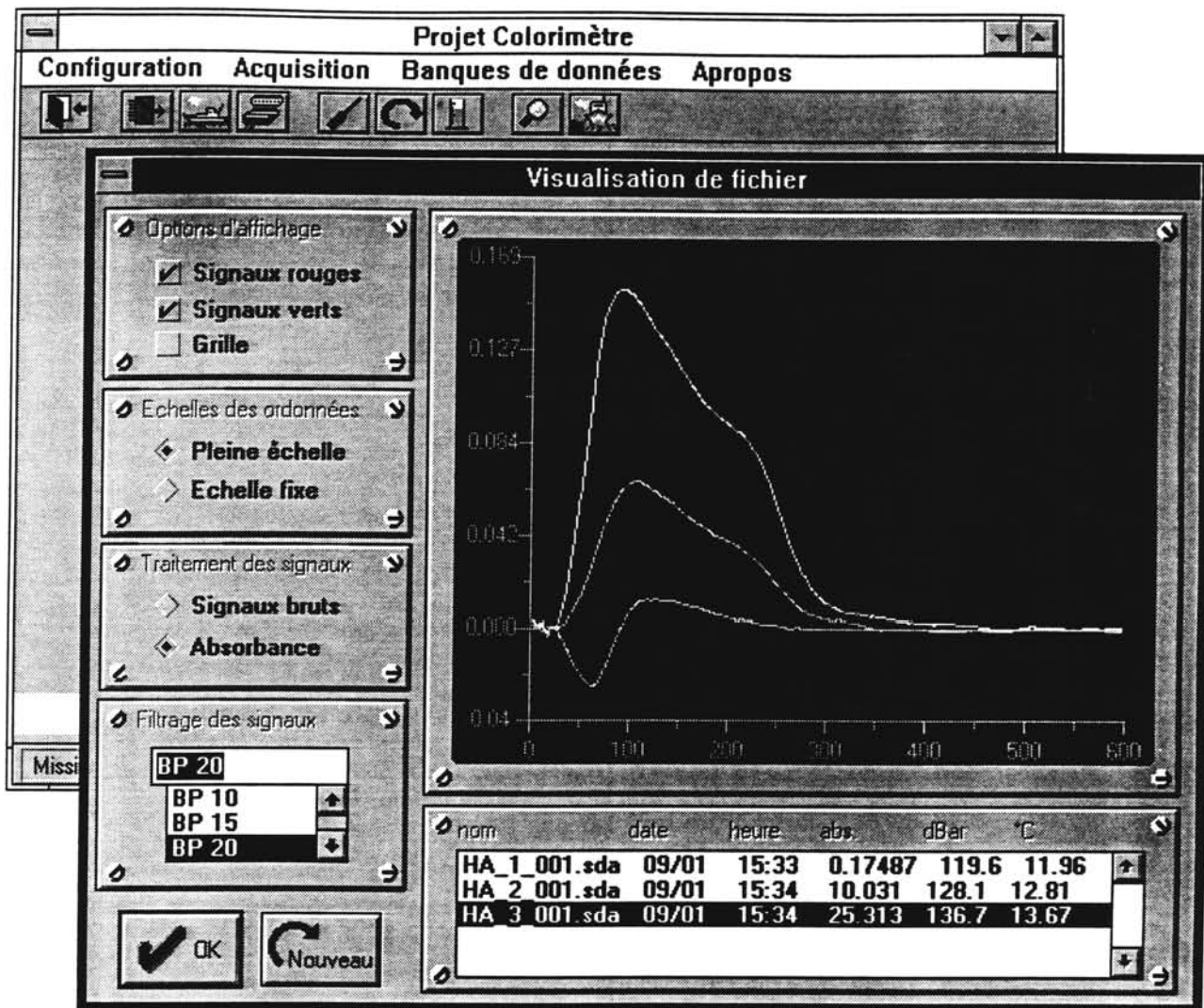


Fig. 13 : Système de commandes directement accessibles à l'utilisateur à bord du navire grâce au logiciel de commande.

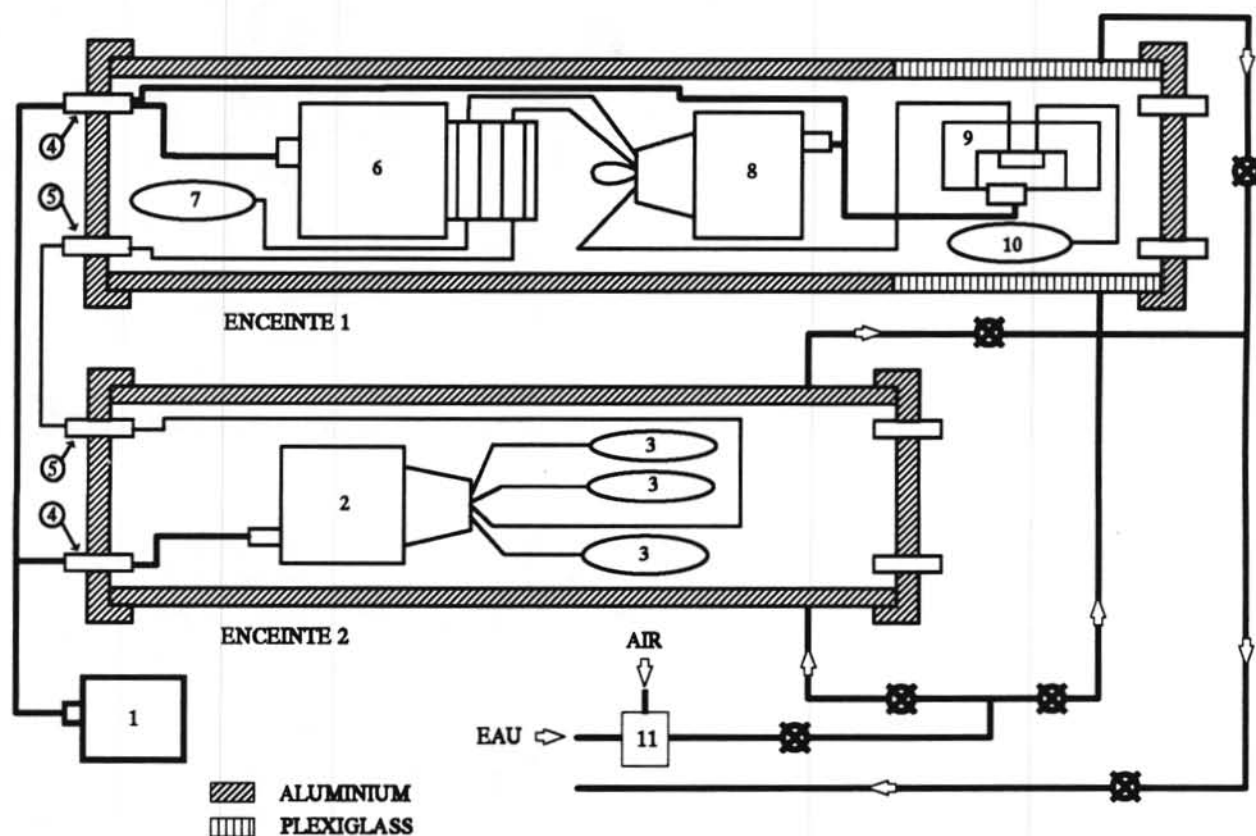


Fig. 14 : Vue du caisson hyperbare (0-30 bar) : 1) enceinte du caisson, 2) vanne de sélection, 3) poches des standards, 4) pompe péristaltique, 5) vanne de la colonne de réduction, 6) vanne d'injection, 7) poches des réactifs, 8) poubelle, 9) passages hydrauliques, 10) passages électriques, 11) système de mise en pression.



motorisation ont été testés dans un caisson hyperbare spécialement conçu à cet effet. La simulation d'immersion dans l'enceinte est réalisée en générant une pression hydrostatique.

### 3.3.1. Description du caisson hyperbare

Le caisson hyperbare (Fig. 14) comporte deux enceintes cylindriques juxtaposées, dimensionnées pour pouvoir supporter des pressions internes de 30 bars. Un ensemble de vannes permet de les utiliser individuellement ou de les faire communiquer. La montée en pression est obtenue au moyen d'une pompe pneumatique qui comprime l'eau contenue dans les enceintes. Une des enceintes est constituée d'une partie en Plexiglas pour permettre le contrôle visuel de l'intérieur du caisson. Les cylindres sont obturés à leur extrémité par des tapes amovibles, munies de passages hydrauliques et électriques.

### 3.3.2. Essai de la pompe en pression

Les essais de la pompe en pression ont été menés de la façon suivante. Une poche dite de départ (de poids  $x$ ) est reliée à une poche dite d'arrivée (de poids  $x'$ ) par un tuyau de pompe. Les tests sont effectués sur 4 circuits : 2 avec des tuyaux jaune-jaune (diamètre intérieur = 1.37 mm), 2 avec des tuyaux violet-violet (diamètre intérieur = 1.98 mm). Les poches sont pesées au début et à la fin du test, qui dure 40 minutes avec une vitesse de rotation de pompe fixée à 10. Le débit, et donc les éventuelles fuites, sont déduits de la différence de poids entre les poches de départ et d'arrivée. Les tests ont été effectués à 0, 10, 20, 30 bars. Aucune variation significative de débits n'est observée entre les tests effectués à différentes pressions (Tab. 1).

### 3.3.3. Essai des vannes en pression

Les essais avec la vanne de sélection ont été menés de la façon suivante. Une poche dite de départ (de poids  $x$ ) est reliée à la pompe par un tuyau violet-violet. Ce tuyau est ensuite relié à l'arrivée centrale de la vanne de sélection. A chacune des 6 positions de cette vanne correspond une poche de poids  $x$ . La vanne reste sur chacune des 6 positions pendant 10 minutes. Ce test est effectué à 0, 10, 20 et 30 bars. Toutes les poches d'arrivée ont un poids comparable quelque soit la pression (Tab. 1).

Pour tester la vanne d'injection en pression, une poche de départ est connectée à la pompe, elle-même reliée à la voie 1 de la vanne d'injection. La voie 2 (load) est reliée à une poche d'arrivée 1, la position 6 (inject) est reliée à une poche d'arrivée 2. Les voies 3, 4, 5 sont bouchées. Le test est effectué pour chaque position à pression ambiante et à 30 bars pendant 20 minutes. Parallèlement à la vanne de sélection, aucune évolution de débit n'est observée entre les tests aux différentes pressions (Tab. 1).

## Tests de la pompe en pression

Pression	Tuyau de pompe	Poche	Poids en g		$\Delta p$
			t=0 min	t=41 min	
0 bar	violet-violet	Départ	473.58	363.30	110.28
		Arrivée	31.85	143.06	111.21
	jaune-jaune	Départ	425.42	360.22	65.20
		Arrivée	34.70	101.53	66.83
	jaune-jaune	Départ	472.59	406.06	66.53
		Arrivée	31.66	99.34	67.68
	violet-violet	Départ	467.61	364.95	102.66
		Arrivée	32.34	133.48	101.14
10 bar	violet-violet	Départ	362.30	252.82	109.48
		Arrivée	146.06	256.61	110.55
	jaune-jaune	Départ	355.22	289.74	65.48
		Arrivée	103.53	170.40	66.87
	jaune-jaune	Départ	405.06	339.48	65.58
		Arrivée	99.34	165.76	66.42
	violet-violet	Départ	364.95	264.79	100.16
		Arrivée	133.48	234.85	101.37
20 bar	violet-violet	Départ	254.82	144.80	110.02
		Arrivée	251.61	362.80	111.19
	jaune-jaune	Départ	289.74	224.30	65.44
		Arrivée	170.40	235.39	64.99
	jaune-jaune	Départ	340.48	275.46	65.02
		Arrivée	165.76	230.26	64.50
	violet-violet	Départ	264.79	163.57	101.22
		Arrivée	234.85	335.44	100.59
30 bar	violet-violet	Départ	363.10	251.37	111.73
		Arrivée	201.85	312.48	110.63
	jaune-jaune	Départ	410.46	346.29	64.17
		Arrivée	195.33	261.88	66.55
	jaune-jaune	Départ	456.04	392.59	63.45
		Arrivée	194.85	260.06	65.21
	violet-violet	Départ	349.73	249.25	100.48
		Arrivée	233.68	335.17	101.49

## Tests de la vanne de sélection

Pression	Poche	Poids en g		$\Delta p$
		t = 0	t =10 min	
0 bar	Départ	479.69	192.75	286.94
	Arrivée 1	151.32	199.2	47.88
	Arrivée 2	130.58	179.33	48.75
	Arrivée 3	158.14	206.32	48.18
	Arrivée 4	152.56	200.51	47.95
	Arrivée 5	144.39	193.32	48.93
	Arrivée 6	135.18	182.65	47.47
10 bar	Départ	500.78	210.46	290.32
	Arrivée 1	205.02	253.49	48.47
	Arrivée 2	185.07	232.98	47.91
	Arrivée 3	211.15	258.41	47.26
	Arrivée 4	205.31	252.61	47.3
	Arrivée 5	198.15	245.67	47.52
	Arrivée 6	185.49	232.51	47.02
20 bar	Départ	457.41	170.87	286.54
	Arrivée 1	247.06	294.52	47.46
	Arrivée 2	166.03	212.45	46.42
	Arrivée 3	270.15	317.03	46.88
	Arrivée 4	252.4	298.96	46.56
	Arrivée 5	213.78	260.46	46.68
	Arrivée 6	165.88	212.36	46.48
30 bar	Départ	471.19	186.82	284.37
	Arrivée 1	291.52	338.95	47.43
	Arrivée 2	212.45	260.37	47.92
	Arrivée 3	317.03	364.06	47.03
	Arrivée 4	259.46	307.93	48.47
	Arrivée 5	228.32	276.41	48.09
	Arrivée 6	212.36	259.57	47.21

Tab. 1 : Evaluation du débit de la pompe et d'étanchéité des vannes à différentes pressions.



### 3.4. Validation du système en rade de Brest

Le système a été testé au cours de deux campagnes en rade de Brest et en mer d'Iroise en décembre 1993 et en avril 1994. Les mesures ainsi réalisées ont permis de valider d'une part, le choix des différents composants et d'autre part, la méthode analytique par le biais de tests d'intercalibration. Les résultats obtenus sont rassemblés dans un article sous presse dans *Marine Chemistry*.

## A submersible flow-injection analyser for the in-situ determination of nitrite and nitrate in coastal waters

Anne Daniel <sup>a,b</sup>, Dominique Birot <sup>b,\*</sup>, Stéphane Blain <sup>a</sup>, Paul Tréguer <sup>a</sup>,  
Bernard Leïldé <sup>b</sup>, Eric Menut <sup>b</sup>

<sup>a</sup> URA CNRS 1513, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, B.P. 809, 29285 Brest Cedex, France

<sup>b</sup> IFREMER, Centre de Brest, Laboratoire d'Instrumentation Océanographique, B.P. 70, 29280 Plouzané, France

Received 18 November 1994; accepted 1 May 1995

---

### Abstract

An flow-injection system is described for the in-situ determination of nutrient concentrations in rivers and ocean waters. In estuarine and coastal waters, significant interferences may be caused by temperature and salinity variations. Therefore, we used a dual wavelength detector to measure simultaneously the reference and sample signals. The device has been used to measure spatial and temporal variations of nitrite and nitrate concentrations in coastal waters exhibiting strong salinity variations (Bay of Brest and Iroise Sea, France). Our original detection system coupled with flow-injection analysis (FIA) allows high-frequency measurements (40 samples per hour), very good precision (1%) and a low detection limit (0.45  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ ). The device can work up to a depth of 300 m, within a temperature range of 2 to 35°C, and with salinities varying from 0 to 35. The dynamic range (0–150  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ ) can be adapted to the expected concentrations of the study area by using flow cells with various path lengths. Intercalibration with samples collected by conventional means and analysed with a spectrophotometric reference method at the laboratory showed a good agreement between both methods (1.3%).

---

### 1. Introduction

Instrumentation is needed for short-and long-term measurements to give, in real time, a complete picture of the dynamics of the most sensitive elements of the ocean system. Therefore, in-situ sensors for the pH, temperature, oxygen and irradiance measurements have been developed. Instruments for in-situ dissolved nutrient analyses are also needed by oceanographers. In-situ measurement techniques have

many advantages, including not having to use storage bottles nor ship samples to land-based laboratories. They also reduce the risk of sample contamination and allow the collection of data in real time. Thus, in-situ analysis allows an on-site programming of additional and collateral sampling when special phenomena are identified. Potential applications for such a submersible analyser include pollution control, effluent monitoring and nutrient budget studies.

Various kinds of in-situ automated chemical analysers have been proposed in the past. A device developed by Bernhard and Macchi (1966) brought seawater on board ship via a pump, and then the sample was analysed with a Technicon AutoAnal-

---

\* Corresponding author. Tel.: (33) 98 01 70 02; fax: (33) 98 22 41 65.

yser II. The sample stream was segmented with air bubbles in a container placed at the immersed end of the sampling hose. This device was modified in 1967 (Bernhard et al., 1967) to operate with an immersed AutoAnalyser and to transmit the data aboard via a cable. However, because of problems associated with the generation of air bubbles underwater at high pressure, no further work appeared. A new analytical method, without air segmentation, was developed in the 1970s (Ruzicka and Hansen, 1975). Flow-injection analysis (FIA) is based on injection of the sample directly into the carrier stream. Johnson and Petty (1983) developed an analyser which brought seawater on board ship via a submersible pump and analysed it with the FIA method. This method is well adapted to on-line measurements because it is more rapid, robust and easier to use than segmented flow analysis. The same technique was used by Clinch et al. (1987) to analyse river waters. However, the fact that the sample is pumped to and analysed on board ship induces a time delay between the sampling and the measurement and limits the sampling depth. Thus, problems of sample mixing and physical perturbations (temperature, pressure) can occur. The only way to eliminate such problems is to build a submersible chemical analyser, as described by Johnson et al. (1986). This submersible chemical analyser is able to measure dissolved silicate and sulfide (Johnson et al., 1986), nitrite and nitrate (Johnson et al., 1989), and manganese and iron (Coale et al., 1991; Chin et al., 1992). The system is based on a continuous flow of sample mixed with reagent and on-line spectrophotometric determination. This principle was recently combined with osmotic pumps by Jannasch et al. (1994) who developed an analyser able to continuously monitor the nitrate concentration in seawater for an extended time period. In both of these in-situ analysers, no rotary valves were used because “mechanical complexities of sample injection due to the use of rotary valves in a submersible system outweigh any advantages that are gained” (Johnson et al., 1986).

The aim of the present study has been to develop a system based on the sample injection into a reagent stream. Three rotary valves (two injection and one stream selection) were developed to work under pressure. As a result, only a single valve is used to select six standards when four are needed in a sys-

tem using pinch valves. The manifold was configured for nitrite and nitrate determination, but it may be adapted to other analyses (i.e. ammonium, silicate, phosphate, trace metals) without adding valves.

The submersible analyser described in this paper can be used for river as well as ocean waters without any modification and it is usable aboard large as well as small ships. Our previous work (Daniel et al., 1995) showed how to reduce the interferences found in FIA measurements when varying temperatures and salinities are encountered. The analyser is built to work up to a depth of 300 m under two different experimental configurations for monitoring spatial and temporal variability. The potential of this system to work in various conditions is shown by our first results obtained during a cruise in the Bay of Brest and the Iroise Sea (France).

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and standards

The nitrate concentration is determined through reduction with copperized cadmium to nitrite and derivatization by sulfanilamide (SAN) and N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (NED) reagents to form the colored complex. The reagent solutions were prepared in distilled-deionized water (Millipore milli-Q system) and the stock standard solutions (5000  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3$  and 5000  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_2$ ) in aged filtered coastal seawater (nitrate and nitrite content 0  $\mu\text{M}$ ). All solutions were of analytical-reagent grade. Working nitrate and nitrite standards were prepared by serial dilutions of the stock solutions. The SAN reagent, NED reagent and  $\text{NH}_4\text{Cl}$  buffer concentrations were, respectively, 10  $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  in HCl (10% *v/v*), 1  $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  in deionized water, and 30  $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  in deionized water with a pH adjusted to 8.5 with ammonia. The cadmium reactor columns were prepared according to Tréguer and Le Corre (1975). The cadmium granules (0.025–0.031 cm) were copperized following the method described by Wood et al. (1967) and packed into glass tubes (10 cm long and 0.2 cm id) plugged with glass wool (reduction rate = 100%).

Experiments were conducted to estimate the lifetime of autoclaved reagents and standard solutions

under in-situ conditions (various temperatures). The standards and the reagents were placed in HDPE flasks. A 200 l chamber Lequeux KL autoclave was used. Autoclaving was performed under pressure in an atmosphere saturated with water vapour for 20 min. The flasks covered with black adhesive tape were stored at 4, 15 and 30°C for four months. Care was taken in order to eliminate the cap contact with the solution. A check of standards and reagents was made every two weeks during the four months. The concentration of the nitrate standard solutions was determined with a Technicon AutoAnalyser II (Tréguer and Le Corre, 1975). The stability of reagent solutions is determined by using the manual method suggested by Benscheinder and Robinson (1952) to determine nitrite concentration.

## 2.2. Apparatus

The laboratory instrument described previously (Daniel et al., 1995) was modified to operate in situ. The analyser is composed of various elements (Fig. 1): the electronic container, the optical container, the peristaltic pump, the selection and injection valves, and the chemical manifold. A Meerestechnik-Elektronik CTD was attached to the analyser frame to determine salinity (PSS), temperature and pressure, parallel with nitrate. The quoted manufacturers precisions are  $\pm 0.03$ ,  $\pm 0.05^\circ\text{C}$  and  $\pm 0.25$  dbar.

### Chemical manifold

The manifold (Fig. 2) is based on the flow-injection concept proposed by Thomsen et al. (1983). Standards and reagents bags are placed in a container on top of the analyser. The seawater sample is pumped at the inlet of the manifold through a strainer ( $10\ \mu\text{m}$ ) to prevent scoring of the valves and eventual blockage of the glass wool of the reductor column. The strainer is placed as close as possible to the selection valve used to switch between sample and standards. The characteristics of the flow manifold (flow rate, mixing coils length) are the same as those described previously (Daniel et al., 1995). All dead volumes are reduced as much as possible.

### Valves

The manifold (Fig. 1) consists of three valves (one valve 6 ways -1 position and two valves 6 ways

-2 positions). The stream selection valve (Rheodyne model 7060L) is used to select between the seawater inlet and 5 different standards. One injection valve is required to switch the reduction column in and out of line and thus to allow the measurement of nitrite alone or of total nitrite and nitrate. The second injection valve is used to inject the mixture of sample and NED reagent. The Rheodyne (model 5020) injection valve used for laboratory experiments was replaced by a valve more adapted to utilization under pressure (model 9010). We managed to eliminate the mechanical complexities of sample injection observed by Johnson et al. (1986). Each valve is driven by a stepper motor linked to a reduction gear. These motors are controlled by a special integrated circuit (GDS D200S). The position of the selection valve is indicated by a coded disc. The valves motors are placed in pressure-compensated, oil filled containers.

### Pump

The peristaltic pump (Fig. 1) chosen for the in-situ analyser was a Gilson (minipuls III MP8). Corrosion problems in the original pump head were observed after utilization in seawater. In order to eliminate this trouble, two solutions are conceivable: firstly, according to Johnson et al. (1986), to place the pump head in a oil-filled container and secondly, to modify the pump head. Putting the pump head in an oil-filled container has two disadvantages which decreased pump tubing life: it is not possible to release the pressure on the pump tubes while the motor is off, and contact of different kind of tubings (PVC, Santoprene, Viton, Solvaflex) with a range of oils (Tellus Shell C5, C10, linseed oil, mayoline) resulted in tubing extension and distorsion. Fortunately, a special stainless steel (Z100CD17), generally used for naval construction, was found to have a better behaviour in seawater than the original pump head steel. The utilization of the pump is then extremely simplified. Like the valve motors, the pump motor is a stepper motor placed in a pressure-compensated container. The speed of the motor is proportional to the frequency of the impulses generated by the micro-processor and can easily be increased or decreased.

### Detector

The light source was constructed in-house using commercially available components. The lamp is a

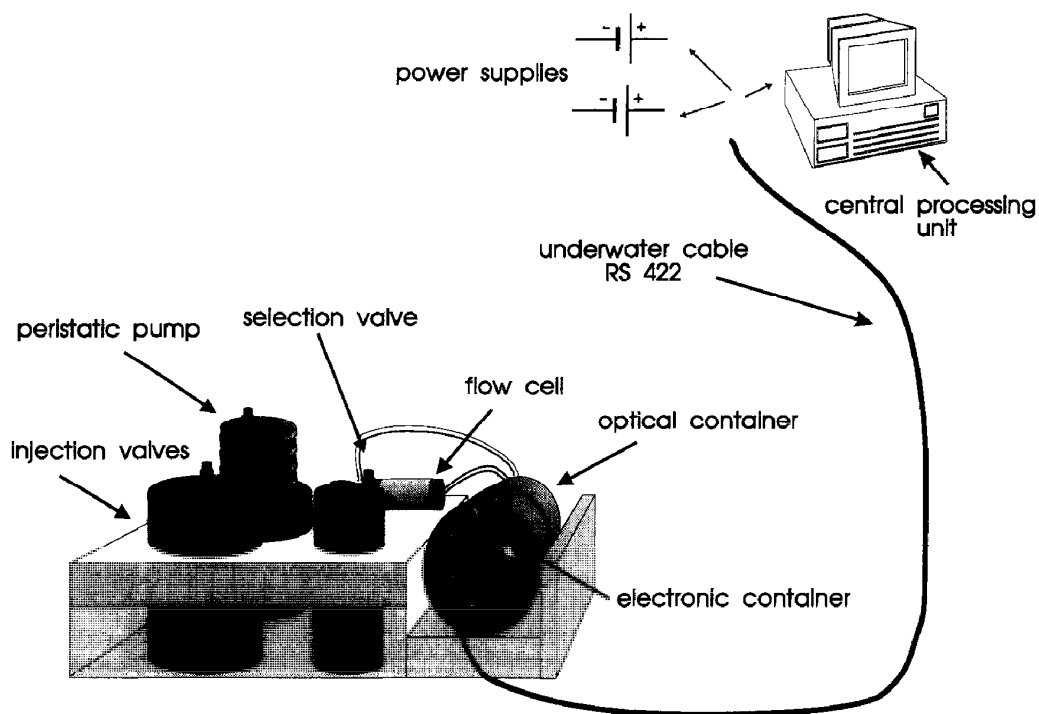


Fig. 1. The different elements of the submersible flow-injection analyser: the selection and injection valves, the peristaltic pump, the flow cell and the optical container, the electronic container and the underwater connectors, and the 300 m long underwater cable.

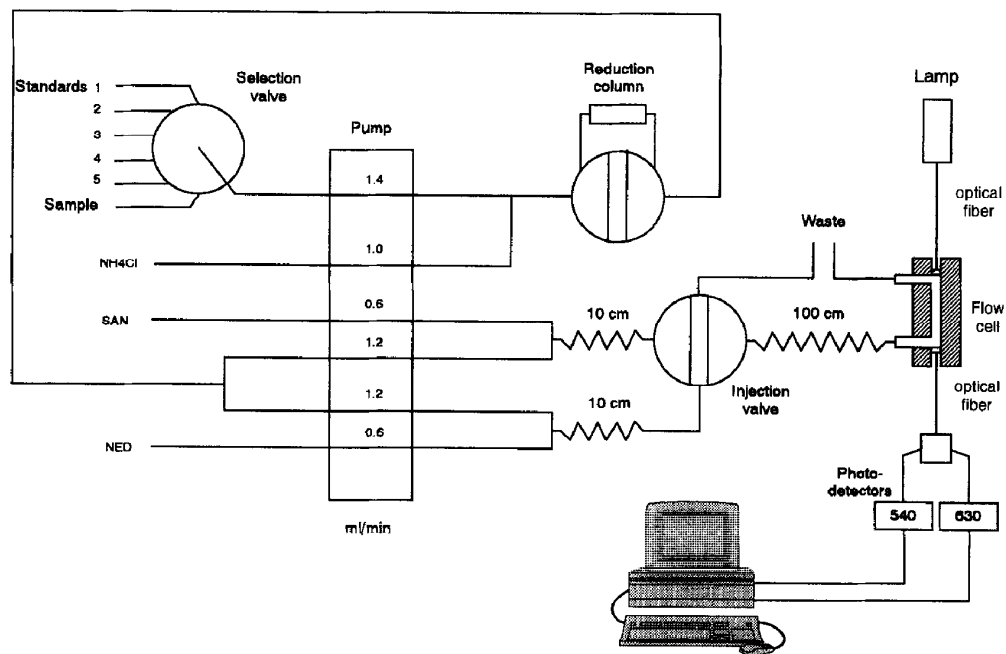


Fig. 2. Flow manifold used in the submersible flow-injection analyser for the determination of  $\text{NO}_3$  and  $\text{NO}_2$ .

Mac-Lite source. The intensity of the lamp is modified by varying the voltage generated by a digital-to-analog convertor placed on the microprocessor. The light is coupled to the flow cell by a optical fiber. The flow cell is constructed in-house (Fig. 1). It consists of a 0.8 mm diameter hole drilled through a block of plexiglass. Two portholes provide a watertight junction between the inside of the cell and the optical fibers. This cell can work with at least an internal pressure of 30 bar. Via a multimode coupler, the light intensity is simultaneously measured at two wavelengths (540 and 630 nm) using Oriel filters (10 nm bandwidth) as described previously (Daniel et al., 1995). The signal obtained at the outlet of the photodiodes (Photops, UDT 555UV) is preamplified before being sent to the electronics container. The signal is then amplified, filtered and digitized (12 bits) by a A/D convertor (LM 12458) which works at 10 Hz. The data are temporarily saved in the memory before being sent by means of a RS 422 connection to the central monitoring unit. The lamp, the multimode coupler and the photodetectors are placed in a watertight aluminium container. The optical fibers join the optical container and the flow cell through watertight polyamide tubing.

### *Electronics*

The electronics used for this system were located in two places (Fig. 1): the power and central processing unit on board ship and a slave unit on the immersed electronics container.

On board ship, two stabilized power supplies are needed to drive the analyser: one 24 V supply for the pump and valve motors, and a 5 V supply for the microprocessor board (digital logic and analog signals). A Kontron (486 DX33) microcomputer is the central processing unit. Software was developed in order to allow control of pump, valves, lamp and data acquisition. The user can readily define an automated cycle for each experiment to establish operational parameters such as the position of the selection valve, the speed of the pump, the lamp intensity, the time at which the injection valve turns on, the beginning of data acquisition, the amplification of the signal, logging and saving data.

The connection between the ship and the electronics container of the analyser is realized by a 300 m long underwater cable (Fig. 1) which has three func-

tions: to supply the power to the analyser, to transmit the instructions and the data, and to mechanically support the analyser. The electrical signals between the electronics container and the optical container, the valves and pump motors are transmitted by short underwater cables and connectors.

## **3. Results and discussion**

### *3.1. Instrumental optimization*

During the perfection of the instrumentation in the laboratory, we determined some crucial facts for the in-situ monitoring. With regard to the detector, light-emitting diodes (LED) tend to be used now as light sources in FIA because of their low cost, small size, longevity, and low power consumption. Nevertheless, we decided to base our photometer on a system constituted by a bulb, fiber optics and filters. Although this last tradeoff is more complicated and expensive, it provides a better spectral resolution (bandwidth of 10 nm with filters but 30–40 nm with LED) and it is not limited by a wavelength range like LED (spectral range covered by devices using LEDs 560–950 nm). Furthermore, the LED photometer proposed by Betteridge et al. (1978) and Worsfold et al. (1987) consists of LED and a phototransistor glued into a block of plexiglas to form the flow cell. So, when changing the nutrient to be analysed, no new flow cell needs to be constructed. With our system, one only needs to change a filter.

The behaviour in time of the various components was tested. In order to avoid microbial growth, the reagents and standards solutions are placed in sterilized, flexible bags of the type used for blood transfusion. PTFE manifold tubing tend to contract and harden when exposed to low temperatures ( $< 10^{\circ}\text{C}$ ) during some time and are replaced by PEEK ones. The lifetime of the pump tubing is about 300 h. Some tests were conducted in order to establish the life-time of the strainer: no modification of the flow rate is observed after 7 h pumping in water containing a high concentration of particulate matter. Corrosion problems were observed with the injection valve (model HP 7000L) when in contact with acid reagents. So, we decided to use the model with a stator in PEEK (model 9010) to overcome this inter-

ference. The efficiency of the column reactor was tested and the results show a good stability equal to 98% after 40 h.

### 3.2. Calibration

Five standard bags can be connected to the stream selection valve. The concentrations of these standard solutions cover the concentration range expected in the study area. A previous study (Daniel et al., 1995) has shown that it is necessary to take into account the external parameters which are difficult to control, such as temperature, salinity and pressure. Variations of these parameters can induce some changes in the behaviour of the blank signal and thus modify the concentration–absorbance relationship (Betteridge et al., 1978; Johnson et al., 1985). In order to eliminate such interferences, the sample and the reference signals are measured simultaneously via a dual-wavelength monitoring approach (Fig. 3): one wavelength reflects the absorbance of the solution (540 nm) and the other one, a wavelength where the dye does not absorb, is considered to be a reference (630 nm). The signal observed at 630 nm remains quite stable whatever the nitrate concentration. The signals received at 540 and 630 nm for a 0  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3$  solution are superposable. The resulting absorbance

of the sample is then obtained by a simple modification of the conventional Beer-Lambert law. The reference signal is the integrated area of the signal obtained at 630 nm during 60 s and the sample signal the one obtained at 540 nm (Daniel et al., 1995). A time-integrated absorbance is then calculated.

A batch of cells with various path lengths is available. In order to obtain a linear calibration graph, the cell with the path length most suitable to the sample concentration is chosen for connection to the manifold. In the present study, a cell of 3 cm path length was used to cover the 0–40  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3$  concentration range (Integrated Absorbance =  $0.383 C_{\text{NO}_3} - 0.301$ ,  $r^2 = 0.998$ ) and a cell of 1 cm path length for concentrations above 40  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3$ , (Integrated Absorbance =  $0.152 C_{\text{NO}_3} - 0.072$ ,  $r^2 = 0.997$ ).

### 3.3. Lifetime of standards and reagents

This analyser is built with the idea to obtain an apparatus which requires as little human intervention as possible. Therefore, the stability of nitrate standard solutions and reagents is of crucial importance in determining the life-time of the system for a long-term monitoring experiment. In previous publi-

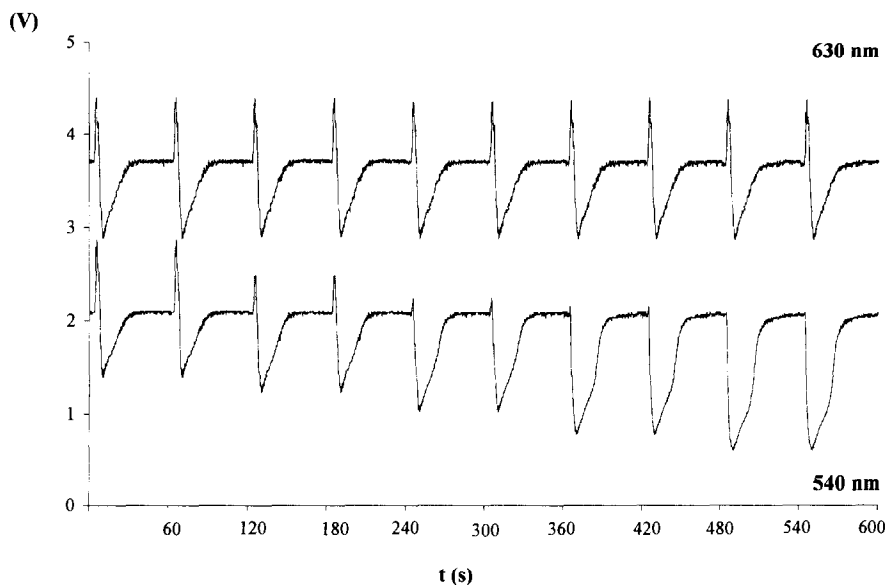


Fig. 3. Behaviour of the signals received at 540 and 630 nm, respectively, for 0, 5, 20, 30 and 40  $\mu\text{M}$  nitrate standards (in duplicate).

cations, some indications have been given on the stability of the three reagents: the NED solution is stable for at least one month if stored in a refrigerator in brown glass (Brewer and Riley, 1965; Grasshoff, 1983), and with no special care; the SAN solution is stable for months (Aminot, 1983; Grasshoff, 1983); and the ammonium chloride buffer solution for one month (Clinch et al., 1987). If the SAN and NED solutions are mixed to form a single color reagent, a pink tinge of the solution is observed after a time because of absorption of nitrogen oxides from the atmosphere (Clinch et al., 1987).

Preservation of the nitrate standards does not seem to present any problems if it is prepared in distilled–deionized water. But if samples are prepared in seawater, the preservation is more difficult because of the presence of microorganisms, e.g. phytoplankton and bacteria. Filtration of seawater through a  $0.5\ \mu\text{m}$  membrane does not remove all the living particles, so a supplementary treatment is needed. Usually poisoning the samples with chloroform or mercury (II) chloride is used but some conflicting results have been published (Aminot, 1983; Grasshoff, 1983). An alternative approach, using autoclaving, was proposed by Aminot and K  rouel (1991). Based on the results of the tests (Table 1) conducted to estimate the life-time of autoclaved reagents and standard solutions under various temperatures, it appears that autoclaving is an efficient and reliable stabilization method for

Table 1

Results of the reagent and standard stability measurements. Values are the RSD of 8 determinations of nitrate in the solutions made over a 4 month period

	RSD % ( $n = 8$ )		
	4°C	15°C	30°C
<b>Reagents</b>			
SAN	1.1	0.9	1.0
NED	1.1	0.9	0.8
<b>Standards</b>			
<i>Filtered solutions</i>			
10 $\mu\text{M}$	2.2	3.5	3.4
50 $\mu\text{M}$	4.9	2.9	5.2
<i>Filtered and autoclaved solutions</i>			
5 $\mu\text{M}$	2.1	3.1	3.3
10 $\mu\text{M}$	2.1	3.3	3.0
50 $\mu\text{M}$	4.1	1.8	2.0

storage up to four months. According to Grasshoff (1983), the SAN solution is stable for four months whatever the storage temperature (RSD = 1%). No fluctuation in the NED solution was observed: storage of this solution in the dark and autoclaving is sufficient to increase the lifetime to at least four months. Because there is no means to evaluate the buffer solution with time, autoclaving seems to be sufficient to eliminate the microbial growth observed by Clinch after one month. The standard autoclaved solutions are stable over four months according to

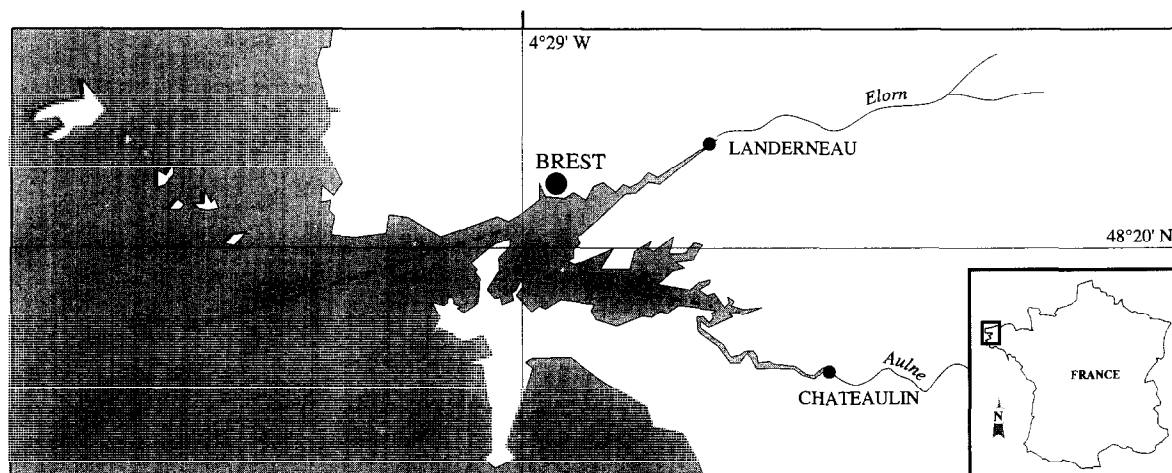


Fig. 4. Location of the reference station R3 and the transect from the Aulne river to the Iroise Sea.



Aminot and K  rouel (1991) because the error is insignificant with regard to the typical stated precision of the method. Autoclaved solutions have a better RSD than filtered solutions and RSD are slightly better when solutions are stored at 4  C.

### 3.4. Sea trials

#### Study area

Tests were conducted in the Bay of Brest (France). The Bay of Brest (Fig. 4) is a large semi-enclosed

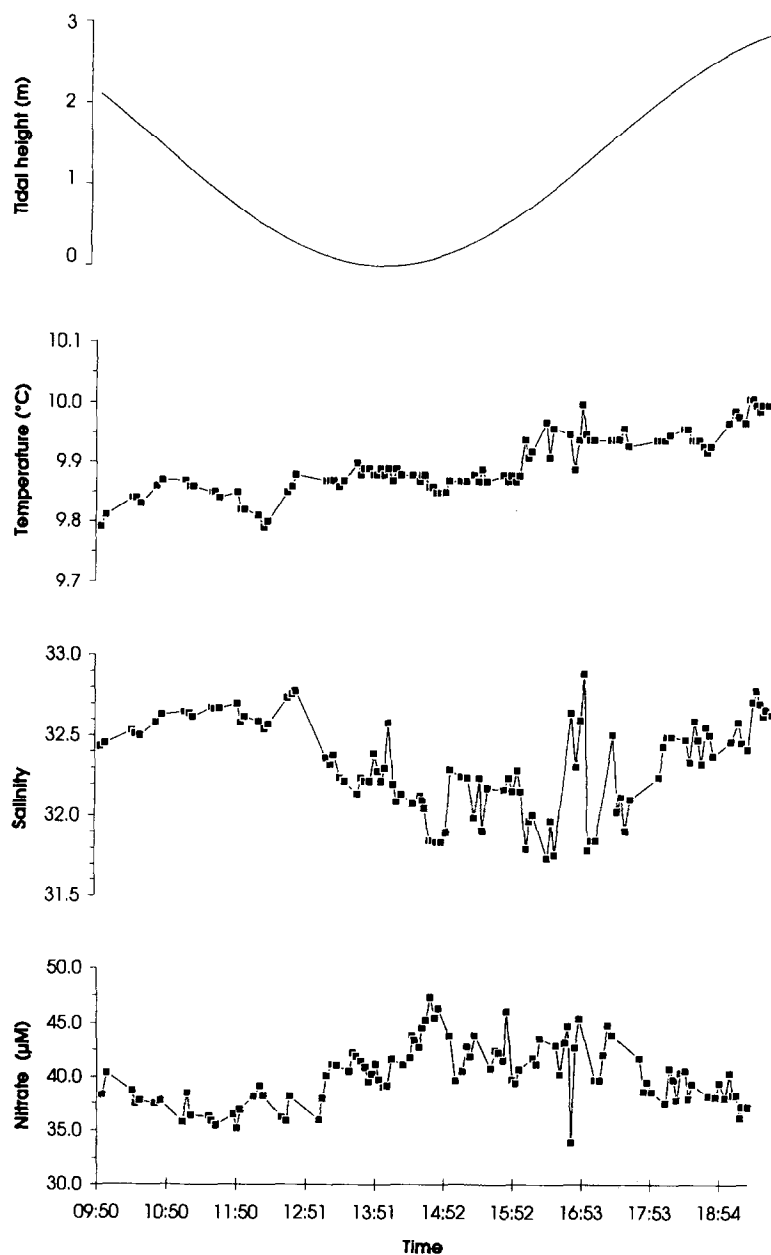


Fig. 5. (a) Tide height, (b) temperature, (c) salinity, and (d) nitrate concentration at station R3 on 14 April 1994.

coastal zone (180 km<sup>2</sup>) which exchanges its waters with the continental shelf waters of the Iroise Sea (Atlantic Ocean). This bay is a typical western European coastal ecosystem receiving nitrate-rich freshwater inputs (Delmas and Tréguer, 1983). An 10-fold increase in nitrate concentration in its tributaries since the beginning of the century has been estimated (Tréguer and Quéguiner, 1989). The nitrogen inputs are mainly from agricultural origin (NOD and NH<sub>4</sub>) and fertilizers (NO<sub>3</sub>). Although the Bay of Brest has not yet exhibited any symptom of eutrophication (Hily, 1991), regular monitoring of its water quality is recommended.

#### *Nitrate and nitrite temporal variations*

Station R3 (Fig. 4) is typical of the study area because of its location at the confluence of the 3 water masses originating from the Elorn river, the Aulne river and the adjacent Iroise Sea. The nitrate concentration fluctuations were observed at this station on 14 April 1994. To dissolve air bubbles adhering to the manifold tubing and the reagents containers, the instrument was immersed at a depth of 10 m and then returned to the near-surface (–2 m) to begin the cast. No special mechanical problems were encountered. A measurement with the analyser was made every 5 min and samples were collected every half hour using a conventional hydrographic cast (Niskin bottle) to make intercalibration measurements. Samples were frozen before being analysed at the laboratory with a conventional reference method (Tréguer and Le Corre, 1975).

The nitrite concentrations measured at station R3 do not change during the reverse tide and are very low (below the detection limit, 0.1 µM). Due to a large freshwater runoff, a nitrate concentration of approximately 40 µM was found at station R3 (approximately 20 µM was recorded in previous years). This phenomenon shows the importance of the fertilization by freshwaters in this ecosystem although salinities are only slightly below that of open ocean seawater (≈ 32). In relation with the continual mixing of the Bay waters induced by the tide, the surface water presents significant variability of physical and chemical parameters within a few hours (Fig. 5): the surface-water temperature increases continuously during the day because of diurnal warming, and the

increase of nitrate concentration is correlated to the salinity decrease.

The variability of the nitrate concentration is confirmed by the intercalibration measurements (Table 2). The NO<sub>3</sub> concentration determined in situ shows the same trend as the values determined on samples collected using a conventional hydrographic cast. The difference between the two methods is about ± 1.3% (*n* = 18).

#### *Nitrate and nitrite spatial variations*

Nitrate and nitrite concentrations in the water column were determined at several stations on a transect from the Aulne River to the Iroise Sea (Fig. 4). We were unable to go farther upstream in the river with the ship because of low water depth. Calibration with standards was performed each time that the range of nitrate concentration changed drastically.

According to the measurements conducted at station R3, nitrite concentration was quite stable and low (0.1 µM) at all stations of the transect. A mixing diagram comparing the nitrate concentration in

Table 2  
Results of the intercalibration measurements at the R3 station between the in-situ analyser and the reference method (AutoAnalyser II)

AutoAnalyser Technicon II (µM NO <sub>3</sub> )	In-situ analyser (µM NO <sub>3</sub> )	Error (%)
37.4	37.0	1.2
35.8	36.4	1.1
35.2	35.9	–1.9
37.9	38.4	–1.2
41.1	41.4	–0.7
40.5	40.2	0.9
39.8	40.2	–1.0
41.8	41.5	0.6
46.4	46.1	0.6
42.8	42.5	0.7
40.8	39.8	2.3
46.1	45.6	1.1
45.5	46.3	–1.8
44.8	45.3	–1.0
41.8	40.2	3.8
37.5	37.9	–1.1
37.9	37.6	0.8
39.5	39.4	0.2
37.2	36.3	2.2
Mean error		1.3

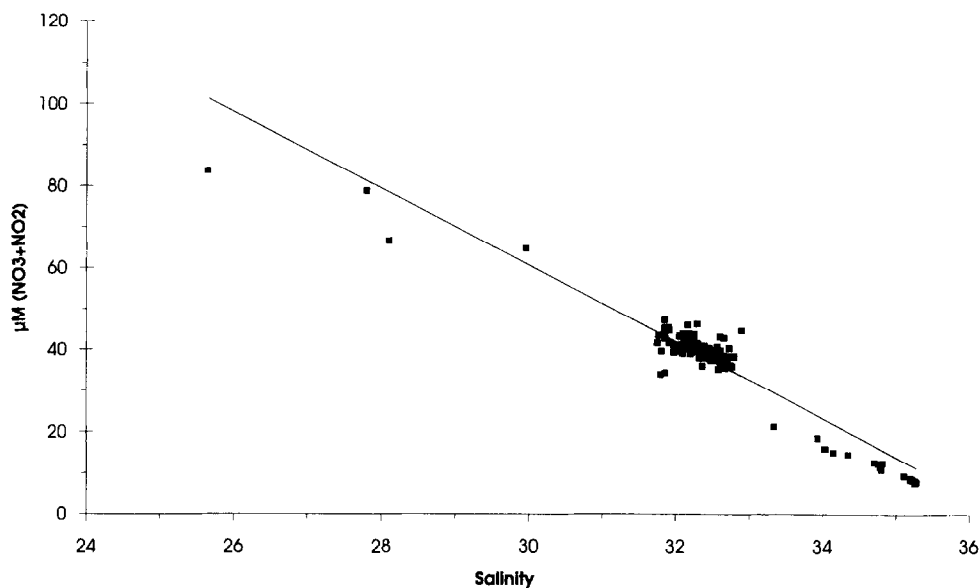


Fig. 6. Mixing diagram representing the nitrate concentration vs. salinity from the Aulne river to the Iroise Sea [ $C_{\text{NO}_3} = (-9.36 \pm 0.26)S + (341.45 \pm 8.59)$ ,  $r^2 = 0.91$ ,  $n = 123$ , where  $C_{\text{NO}_3}$  = nitrate + nitrite concentration in  $\mu\text{M}$  and  $S$  = salinity].

the estuary with a conservative tracer, salinity, is shown in Fig. 6. It shows that the concentration of nitrate is directly correlated to the hydrological structure. A regular dilution of the nitrate concentration is observed from the Aulne river to the Iroise Sea, inversely correlated to the salinity. The nitrate can be considered a conservative nutrient in the Bay of Brest in this period of pre-bloom. In the Aulne river, where a high concentration of particulate matter is observed, no blockage of valves or manifold tubing was found showing the filtration at the inlet of the manifold is effective. The behaviour of the column reactor was very good even up to  $90 \mu\text{M NO}_3$ .

#### 4. Conclusion

The sea trials conducted in the Bay of Brest with this submersible flow-injection analyser clearly demonstrate the great flexibility of the device: the system can measure the nitrate and nitrite concentrations with a very good precision (1.3%) in the water column or at a fixed place, with any salinity. Furthermore, because of the mechanical and electronical monitor conception, the analyser can readily be mod-

ified to determine a wide range of nutrients (e.g. silicates, phosphates, ammonium) and trace metals.

#### Acknowledgements

The authors are very grateful to Prof. Kenneth S. Johnson who provided helpful comments on a previous version of this manuscript. Thanks are also due to the crew of the R.V. *Thallia* and *Gwen Drez* (GENAVIR). This work was supported by the Conseil Régional de Bretagne and the Mors-environment company. This study is contribution 95007 of the URA CNRS 1513.

#### References

- Aminot, A., 1983. In: A. Aminot and M. Chaussepied (Editors), *Manuel des analyses chimiques en milieu marin*. CNEXO, Brest, pp. 95–106.
- Aminot, A. and K  rouel, R., 1991. Autoclaved sea water as a reference material for the determination of nitrate and phosphate in sea water. *Anal. Chim. Acta.*, 248: 277–283.
- Benscheider, K. and Robinson, R.J., 1952. A new spectrophotometric determination of nitrite in sea water. *J. Mar. Res.*, 11: 87–96.

- Bernhard, M. and Macchi, G., 1966. Application and possibilities of automatic chemical analysis in oceanography. In: Technicon Symp., 1965. Mediad, New York, NY, pp. 255–259.
- Bernhard, M., Torti, E., Ghibauda, M., Rossi, G. and Bruschi, A., 1967. An underwater apparatus for in situ determinations with the AutoAnalyser. In: Automation in Analytical Chemistry, European Technicon Symp., Brighton, pp. 391–395.
- Betteridge, D., Dagless, E.L., Fields, B. and Graves, N.F., 1978. A high sensitive flow-through phototransducer for unsegmented continuous-flow analysis demonstrating high-speed spectrophotometry at the parts per  $10^9$  level and a new method of refractometric determinations. *Analyst*, 103: 897–908.
- Brewer, P.G. and Riley, J.P., 1965. The automatic determination of nitrate in sea water. *Deep-Sea Res.*, 12: 765–772.
- Chin, C.S., Johnson, K.S. and Coale, K.H., 1992. Spectrophotometric determination of dissolved manganese in natural waters with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol: application to analysis in situ in hydrothermal plumes. *Mar. Chem.*, 37: 65–82.
- Clinch, J.R., Worsfold, P.J. and Casey, H., 1987. An automated spectrophotometric field monitor for water quality parameters: determination of nitrate. *Anal. Chim. Acta*, 200: 523–531.
- Coale, K.H., Chin, C.S., Massoth, G.J., Johnson, K.H. and Baker, E.T., 1991. In situ chemical mapping of dissolved iron and manganese in hydrothermal plumes. *Nature*, 352: 325–328.
- Daniel, A., Birot, D. and Lehaitre, M., 1995. Characterization and reduction of interferences in flow-injection analysis for the in situ determination of nitrate and nitrite in sea water. *Anal. Chim. Acta*, 308: in press.
- Delmas, R. and Tréguer, P., 1983. Evolution saisonnière des nutriments dans un écosystème eutrophe de l'Europe Occidentale (la rade de Brest). *Interactions marines et terrestres. Oceanol. Acta*, 6: 345–356.
- Grasshoff, K., 1983. Determination of nitrate. In: K. Grasshoff, M. Ehrhardt and K. Kremling (Editors), *Methods of Seawater Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, 2nd ed., pp. 137–145.
- Hily, C., 1991. Is the activity of benthic suspension feeders a factor controlling water quality in the Bay of Brest? *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 69: 179–188.
- Jannasch, H.W., Johnson, K.S. and Sakamoto, C.M., 1994. Submersible, osmotically pumped analyser for continuous determination of nitrate in situ. *Anal. Chem.*, 66: 3352–3361.
- Johnson, K.S. and Petty, R.L., 1983. Determination of nitrate and nitrite in seawater by flow-injection analysis. *Limnol. Oceanogr.*, 28(6): 1260–1266.
- Johnson, K.S., Petty, R.L. and Thomsen, J., 1985. Flow-injection analysis for seawater micronutrients. In: A. Zirino (Editor), *Mapping Strategies in Chemical Oceanography: 185th Annu. Meet. Am. Chem. Soc.* 1983, Seattle, WA, pp. 7–30.
- Johnson, K.S., Beehler, C.L. and Sakamoto-Arnold, C.M., 1986. A submersible flow analysis system. *Anal. Chim. Acta*, 179: 245–257.
- Johnson, K.S., Sakamoto-Arnold, C.M. and Beehler, C.L., 1989. Continuous determination of nitrate concentrations in situ. *Deep-Sea Res.*, 36: 1407–1413.
- Ruzicka, J. and Hansen, E.H., 1975. Flow-injection Analysis. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Anal. Chim. Acta*, 78: 145.
- Thomsen, J., Johnson, K.S. and Petty, R.L., 1983. Determination of reactive silicate in seawater by flow-injection analysis. *Anal. Chem.*, 55: 2378–2382.
- Tréguer, P. and Le Corre, P., 1975. Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer. Utilisation de l'auto-Analyseur II: Technicon, 2ème édition. Lab. Océanogr. Chim., Univ. Bretagne Occidentale, Brest, 110 pp.
- Tréguer, P. and Quéguiner, B., 1989. Seasonal variations in conservative and nonconservative mixing of nitrogen compounds in a west European macrotidal estuary. *Oceanol. Acta*, 12: 371–380.
- Wood, E.D., Armstrong, F.A. and Richards, F.A., 1967. Determination of nitrate in sea water by cadmium–copper reduction to nitrite. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 47: 23–31.
- Worsfold, P.J., Clinch, J.R. and Casey, H., 1987. Spectrophotometric field monitor for water quality parameters: the determination of phosphate. *Anal. Chim. Acta*, 197: 43–50.

## **Deuxième partie**

### **La production azotée phytoplanctonique en rade de Brest**

## Introduction

Les estuaires sont des lieux privilégiés de l'implantation humaine. Ils sont le siège d'une vie marine intense : ces abris naturels ont servis à l'édification des plus grands ports mondiaux et leurs eaux continuellement enrichies par les apports nutritifs des fleuves a permis le développement de diverses activités maritimes (pêche, mariculture,...). Mais, ces deux vocations apparaissent de nos jours souvent comme contradictoires. L'accroissement de l'activité économique sur les bassins versants de l'estuaire et du fleuve entraîne une augmentation de la quantité de polluant amené à l'estuaire, qui au delà d'une certaine limite peut perturber fortement l'écosystème.

Pour évaluer l'importance de l'augmentation des flux azotés en rade de Brest, un des objectifs de cette étude a pour but de quantifier les flux d'azote inorganique dissous au niveau des apports fluviaux, des échanges avec la mer d'Iroise, des échanges à l'interface eau-sédiment, des rejets urbains et des apports directs atmosphériques. Une comparaison avec les résultats des études antérieures effectuées en rade (RNO 1974, SAUM 1980, Delmas 1981, Le Jehan 1982, Quéguiner 1982, Hafsaoui 1984, Souchu 1986) sera ainsi rendue possible.

De plus, la productivité phytoplanctonique affecte la distribution de l'azote dissous dans les zones côtières selon un degré variable d'un système à l'autre (McCarthy 1981, McIsaac et al. 1985). La productivité est en effet régulée par de nombreux facteurs tels que les conditions du milieu (température, ensoleillement, mélange de la colonne d'eau, concentration des sels nutritifs) et les caractéristiques physiologiques du phytoplancton (Fisher et al., 1982). L'importance et la nature du couplage entre la productivité et la disponibilité a été soulignée par différents auteurs. Ainsi, d'après Furnas et al. (1976), McCarthy et al. (1977), Kuenzler et al. (1979), lorsque les processus d'absorption dominant les phénomènes de mélange, une corrélation inverse est observée entre la production phytoplanctonique et la concentration en azote inorganique dissous (NID). Par contre, lorsque les apports anthropogéniques sont très

élevés et lorsque la dynamique des eaux limite la formation de blooms, il n'existe aucune relation entre la production phytoplanctonique et les concentrations en azote inorganique dissous (Malone, 1977).

En rade de Brest, la teneur en nitrates n'est corrélée ni à l'absorption carbonée, ni à la biomasse chlorophyllienne en période printanière. En accord avec Malone (1977), ce résultat peut être attribué à des apports anthropogéniques élevés. Il a donc paru intéressant de déterminer le rôle des différentes formes azotées dans la régulation de la production primaire. Pour ce faire, des mesures d'absorptions basées sur la méthode  $^{15}\text{N}$  ont été entreprises entre 1991 et 1993 pour étudier :

- la distribution temporelle de l'absorption des nitrates, de l'ammonium et de l'urée,
- l'importance de l'absorption azotée au sein des différentes classes de phytoplancton,
- le comportement de l'absorption azotée dans la colonne d'eau,
- la forme azotée préférentiellement assimilée par le phytoplancton,
- la relation entre la production carbonée et l'absorption azotée.

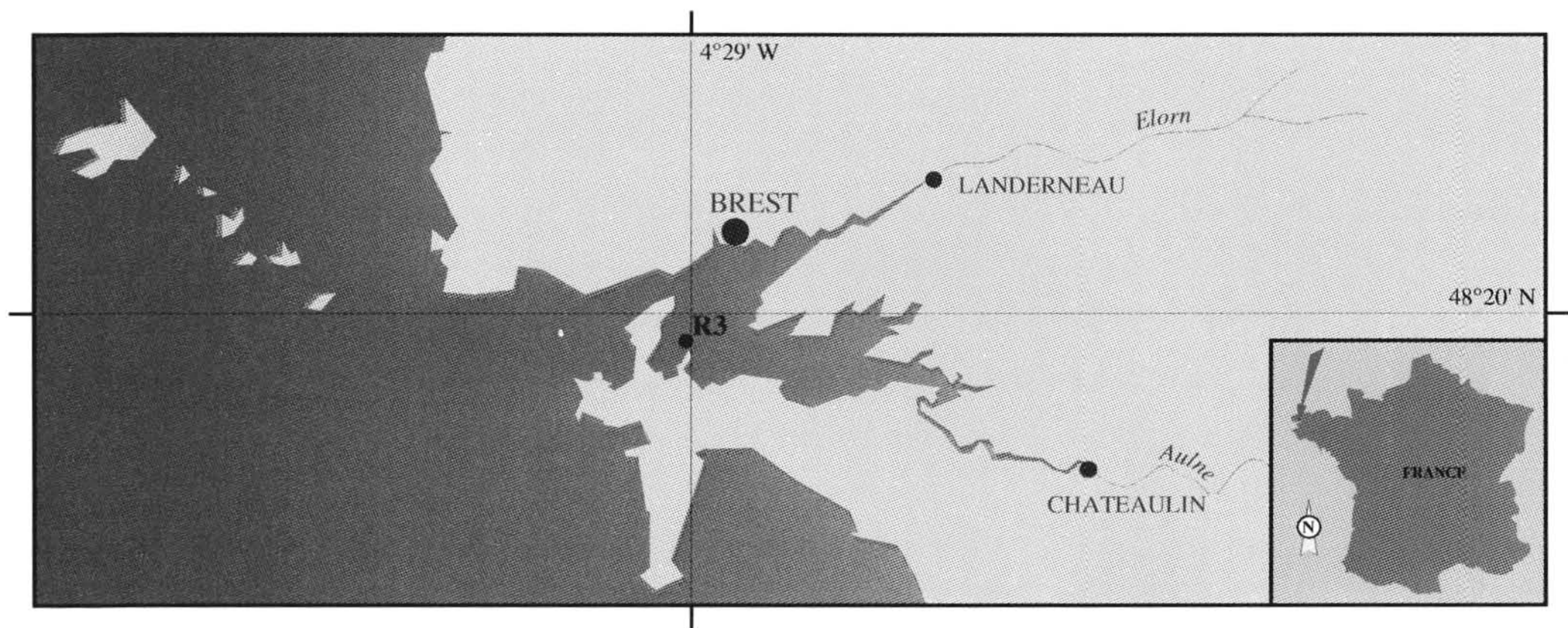


Fig. 15 : Situation géographique de la rade de Brest et de la station de référence R3.



# Chapitre 1

## Méthodologie

### 1.1. Stratégie de prélèvement

Les prélèvements ont été effectués en rade de Brest à la station R3 (Fig. 15). Cette station (48°20'N; 4°30'W) est considérée comme caractéristique de la rade de Brest car elle est située dans la zone de mélange des masses d'eau provenant du bassin Nord, du bassin Sud et de l'Iroise. La profondeur moyenne relevée à cette station est de 32 m.

La période de mesure s'étend de mars 1991 à août 1993. Les prélèvements ont été réalisés en surface (100 % de la lumière incidente) durant toute cette période et dans la colonne d'eau à 25, 10, 1, 0 % de la lumière incidente en 1993. Le coefficient de marée (voisin de 70) a déterminé la date des prélèvements bimensuels, sauf en période de bloom, où le pas d'échantillonnage a été fixé à trois jours. L'heure du prélèvement correspond toujours à la basse mer.

Les échantillons d'eau ont été prélevés à l'aide de bouteilles hydrologiques de type Niskin (5 litres) pour les mesures de sels nutritifs et de biomasse, et de type Go-Flo (8 litres) pour les mesures de production. Les échantillons d'eau ont été placés dans des flacons (spécifiques à l'analyse désirée) préalablement lavés à l'acide chlorhydrique (2N), rincés 3 fois à l'eau distillée et 3 fois par l'échantillon. Ils sont conservés dans une glacière jusqu'à l'arrivée au laboratoire. Les échantillons en vue du dénombrement des populations phytoplanctoniques, de la mesure de l'oxygène dissous et de l'ammonium ont été fixés immédiatement à bord. Les filtrations pour les

mesures de chlorophylle et phéophytine, de carbone et d'azote organique particulaire ont été exécutées dès le retour au laboratoire.

Des prélèvements ont été effectués de novembre 1991 à octobre 1992 sur l'Aulne à l'écluse de Guily-Glas (Port-Launay) et sur l'Elorn au Pont de Rohan (Landerneau), en parallèle aux prélèvements menés en R3. Les échantillons sont recueillis à l'aide d'une bouteille de verre et disposés dans les flacons appropriés à l'analyse.

## 1.2. Paramètres physiques

### 1.2.1 Les débits

Les débits de l'Aulne (station de Guily-Glas) et l'Elorn (station de Kerfaven) sont fournis par le Service hydrologique centralisateur Loire-Bretagne.

### 1.2.2. L'ensoleillement et les précipitations

Les données de rayonnement global et des précipitations à la station de Lanvéoc sont fournies par la Météorologie Nationale (Station de Brest-Guipavas).

### 1.2.3. La température de l'eau

En 1991 et 1992, la température de l'eau est mesurée à l'aide de thermomètres à mercure Richter et Wiese, de précision  $\pm 0.01^{\circ}\text{C}$ , placés sur les bouteilles de prélèvement. En 1993, la température est obtenue à l'aide d'une sonde CTD Seabird SBE 19, de précision  $\pm 0.01^{\circ}\text{C}$ .

### 1.2.4. La salinité

Les échantillons de 1991 et 1992 ont été conservés dans des canettes en verre jusqu'à leur analyse. La salinité (mesurée en Practical Salinity Scale, PSS) est mesurée à partir de la chlorosité d'après la méthode manuelle mise au point par Knudsen et décrite par Tréguer et Le Corre (1975). La précision sur la mesure est de  $\pm 0.03$  PSS (Ragueneau, 1994).

En 1993, la salinité est obtenue à l'aide d'une sonde CTD Seabird SBE 19, de précision  $\pm 0.01$  PSS. Les valeurs obtenues à l'aide de cette sonde ont été recalibrées à l'aide d'échantillons recueillis dans les eaux de surface et analysés par un salinomètre Guidline Autosol 8400.

### 1.2.5. L'irradiance

Elle a été mesurée en 1993 à l'aide d'un quantamètre créé sur une sonde CTD Seabird SBE 19, de précision  $\pm 5\%$ .

### 1.2.6. L'oxygène dissous

Les échantillons ont été placés dans des flacons en verre de 250 ml, en prenant soin d'éviter l'introduction de bulles d'air, et fixés immédiatement. Ils sont ensuite conservés dans de l'eau à l'abri de la lumière. L'oxygène dissous est mesuré par la méthode manuelle, dite de Winkler, décrite par Tréguer et Le Corre (1975). La précision est de  $\pm 0.02 \text{ ml O}_2 \cdot \text{l}^{-1}$ .

## 1.3. Les sels nutritifs

### 1.3.1. Les nitrates et nitrites

Les échantillons sont conservés dans des flacons en polypropylène au congélateur. L'analyse des nitrates est effectuée par la méthode colorimétrique classique de Benschneider et Robinson (1952). Les nitrates sont réduits en nitrites à l'aide d'une colonne de cadmium cuivré, puis diazotés avec du sulfanilamide et copulés avec du chlorhydrate de N-(1 naphthyl)-éthylènediamine. La densité optique du composé azoïque est mesurée à 540 nm. Les nitrates et nitrites ont été mesurés en 1991 et 1992 sur AutoAnalyser Technicon II selon la méthode décrite par Tréguer et Le Corre (1975). On a veillé à ce que toutes les colonnes de réduction utilisées aient un rendement supérieur à 95 %. La précision est de 1 % au niveau de  $10 \mu\text{M}$ . Les échantillons de 1993 ont été analysés sur Alpkem selon la méthode décrite par Gordon et al. (1993). Seuls les échantillons provenant de l'Aulne et l'Elorn ont été dilués.

### 1.3.2. L'ammonium

Lors du prélèvement, les échantillons sont placés dans des flacons en verre et immédiatement fixés. Ils sont ensuite conservés à l'abri de la lumière jusqu'à leur dosage au laboratoire 6 heures plus tard (au minimum). Les mesures ont été effectuées selon la réaction de Berthelot (1859). L'ammonium et l'hypochlorite de sodium sont mis en présence de phénol et de l'ion nitroprussiate pour former du bleu d'indophénol. Pour permettre le dosage de l'ammonium en eau de mer, il est nécessaire d'ajouter du tricitrate de sodium pour complexer le calcium et le magnésium (Koroleff, 1970). La densité optique du bleu d'indophénol est mesurée à 630 nm. La précision est de  $\pm 0.05 \mu\text{M}$ .

### 1.3.3. L'urée

Les échantillons ont été conservés dans des flacons en verre au congélateur jusqu'à leur analyse par la méthode de Beale et Croft (1961), adaptée au dosage automatique sur AutoAnalyser Technicon II par Aminot et Kérouel (1982). Des composés de coloration jaune sont obtenus par condensation, en milieu fortement acide, et oxydation de la diacétylmonoxime avec l'urée. La présence de molécules organiques telles que la thiosemicarbazide aboutit à la formation d'un composé rouge. La stabilité de la coloration est améliorée à l'aide d'un

catalyseur tel que l'ion ferreux. La coloration de la solution est mesurée à 520 nm. La précision de la mesure est de  $\pm 0.01 \mu\text{M}$ .

#### 1.3.4. Les silicates

Les échantillons sont conservés dans des flacons en polypropylène au réfrigérateur. L'analyse est effectuée selon la méthode de Mullin et Riley (1965), adaptée à l'Alpkem RFA-300 par Gordon et al. (1993). Les silicates et les ions molybdates forment en milieu acide un complexe silicomolybdique qui est ensuite réduit en bleu de molybdène par une solution de "métol" (sulfate de méthyl-amino-4-phénol) et de chlorure stanneux. La coloration du complexe est mesurée à 810 nm. Seuls les échantillons de l'Aulne et l'Elorn ont été dilués. La précision de la mesure est de  $\pm 0.1 \mu\text{M}$  au niveau de  $5 \mu\text{M}$ .

#### 1.3.5. Les phosphates

Les échantillons sont placés dans des flacons de verre et conservés au congélateur jusqu'à leur analyse par la méthode manuelle de Murphy et Riley (1962) décrite par Tréguer et Le Corre (1975). Les ions orthophosphates réagissent avec le molybdate d'ammonium en milieu acide pour former un complexe jaune, le phosphomolybdate d'ammonium. Ce complexe est ensuite réduit par de l'acide ascorbique et sa coloration passe du jaune au bleu. La densité optique de ce composé est mesurée à 885 nm. La précision de la méthode est de  $\pm 0.02 \mu\text{M}$ , au niveau de  $0.6 \mu\text{M}$ . Les échantillons de l'Aulne et l'Elorn sont filtrés avant analyse afin d'éviter toute interférence provoquée par la matière en suspension. Une correction de turbidité est effectuée pour les échantillons de la rade.

### 1.4. Composition de la matière particulaire

#### 1.4.1. Chlorophylle a et phéopigments

Dès le retour au laboratoire en 1991 et 1992, de 0.5 à 1 l d'échantillon (suivant la période) a été filtré sur Whatman GF/F ( $\varnothing=4.7$  cm, porosité  $\approx 0.7 \mu\text{m}$ , pré calciné à  $450^\circ\text{C}$  pendant 4 heures). En 1993, 0.5 à 1 l d'eau a été filtré sur un dispositif de filtration Sartorius à trois étages, équipé de filtres Nucleopore ( $\varnothing=4.7$  cm) de porosité égale à 0.6, 2 et  $10 \mu\text{m}$ . Un échantillon est également filtré sur filtre Nucleopore ( $\varnothing=4.7$  cm, porosité  $=0.6 \mu\text{m}$ ) pour mesurer la concentration totale en pigments. Les filtres sont conservés au congélateur dans des tubes à centrifuger en verre. La méthode analytique utilisée est le dosage fluorimétrique basé sur la technique de Yentsch et Mentzel (1963), modifiée par Hafsaoui (1984). La mesure est faite à l'aide d'un fluorimètre TURNER modèle 111. La calibration initiale de l'appareil a été effectuée avec une solution de chlorophylle a pure et un spectrophotomètre. La précision de la méthode est de l'ordre de 15 %.

#### 1.4.2. Carbone et azote organique particulaire

En 1991 et en 1992, un volume d'échantillon (0.5 à 1 l suivant la saison) est filtré sur fibre de verre Whatman GF/F ( $\varnothing=2.5$  cm, porosité $\approx 0.7$   $\mu\text{m}$ , pré calciné à 450°C pendant 4 heures). En 1993, le fractionnement de taille est effectué en deux étapes pour recueillir l'échantillon sur un filtre en fibre de verre. Une pré filtration est effectuée sur système Nalgene équipé d'un filtre Nucleopore ( $\varnothing=4.7$  cm) de porosité de 2 ou 10  $\mu\text{m}$ . Elle est suivie d'une filtration sur filtre Whatman GF/F ( $\varnothing=2.5$  cm). La teneur en COP et NOP de chaque classe de taille est obtenue par la différence entre la concentration totale et celle de l'échantillon pré filtré.

Les filtres sont conservés au congélateur dans des piluliers en verre. Après avoir été séchés à 30°C pendant 12 heures, les filtres sont "décarbonatés" (élimination du carbone inorganique par exposition à des vapeurs de HCl concentré). Suivant la méthode de combustion de Strickland et Parsons (1972), les échantillons sont transformés en dioxyde de carbone et diazote gazeux lors de leur passage dans un réacteur en quartz, saturé en oxygène, rempli d'oxyde de chrome (III) et chauffé à 1100°C. Les oxydes d'azote ( $\text{N}_x\text{O}_y$ ) sont réduits à l'aide de cuivre. Le dioxyde de carbone et le diazote sont séparés sur une colonne de chromatographie gazeuse. L'appareil utilisé est un analyseur CHN (Carlo Erba modèle N 1500). La précision sur la mesure est estimée à 1 %.

#### 1.4.3. Détermination des espèces phytoplanctoniques

Les échantillons sont fixés à bord par une solution de lugol acide (Lovegrove, 1960) et conservés dans l'obscurité jusqu'au comptage. La détermination et le comptage des populations phytoplanctoniques sont effectués selon la méthode Utermöhl (1931) à l'aide d'un microscope inversé Nikon, après sédimentation dans des cuves Hydrobios. Si l'emploi de lugol acide a pour inconvénient de détruire les algues à paroi calcaire (en particulier les Coccolithophoridées), il permet une bonne conservation des Diatomées.

#### 1.4.4. Validation de la technique de fractionnement

Les différentes techniques de fractionnement utilisées sont susceptibles d'entraîner des erreurs à la suite du passage successif des cellules sur les filtres de porosités différentes (risque d'éclatement des cellules ou de désagrégation des chaînes, etc...) (Arthur et Rigler 1967, Lignell 1992, Logan 1993). Afin d'évaluer notre technique de filtration, la relation entre le paramètre total et la somme des trois fractions a été établie pour les mesures de chlorophylle et de phéophytine.

$$\Sigma_{\text{fractions}} \text{chloro} = 0.909 \text{ chloro}_{\text{total}} + 0.003 \quad n=17 \quad r^2=0.986$$

$$\Sigma_{\text{fractions}} \text{phéo} = 0.882 \text{ phéo}_{\text{total}} + 0.084 \quad n=17 \quad r^2=0.943$$

Les coefficients de corrélation obtenus sont significatifs par rapport au seuil critique de  $\alpha = 0.01$  (test de Fisher). Les pentes des droites de régression (proches de 1) et les faibles valeurs à l'origine indiquent que la méthode de fractionnement est globalement conservative.

## 1.5. La production primaire

### 1.5.1. Incubation in situ simulée

Les échantillons d'eau sont placés dans des flacons de polycarbonate (500 ou 2000 ml) entourés de filtres neutres (grilles perforées en nickel, VECO Perforated Products, Pays Bas) calibrés pour laisser pénétrer le pourcentage de lumière (0, 1, 10, 25 et 100 %) correspondant à celui du milieu dans lequel l'échantillon a été prélevé. Les solutions isotopiques sont ajoutées juste avant de placer les flacons dans l'incubateur, deux heures au maximum après le prélèvement (Fig. 16). L'incubation in situ simulée est effectuée pendant 24 heures à l'aide d'un incubateur en Plexiglas placé sur le môle de Ste Anne du Portzic. Les échantillons sont maintenus à la température réelle du milieu grâce à une circulation continue d'eau de mer prélevée en rade.

### 1.5.2. La production carbonée

Le marquage isotopique est effectué en injectant 1 ml d'une solution de bicarbonate de sodium marquée au  $^{14}\text{C}$  (4  $\mu\text{Ci}$ ) aux 250 ml de l'échantillon. L'addition de ce traceur n'entraîne pas de perturbation dans le milieu car la concentration du carbone inorganique dissous dans l'eau de mer ( $\Sigma \text{CO}_2$ ) est si élevée qu'un enrichissement, même à forte dose, n'altère pas les taux d'absorptions réels. La filtration est menée après 24 heures d'incubation sur filtre Whatman GF/F ( $\varnothing=2.5$  cm). En 1993, les filtrations pour le fractionnement de taille sont réalisées de la même façon que pour les pigments. Les filtres sont conservés au congélateur.

Après 12 heures à l'étuve à  $30^\circ\text{C}$ , les filtres sont placés dans des piluliers contenant 10 ml de liquide scintillant Ultima Gold XR Packard. La radioactivité  $\beta^-$  est déterminée par comptage en scintillation liquide sur compteur Tri-Carb-300 C-Packard. La production primaire est déterminée selon Quéguiner et Tréguer (1984) avec une précision de l'ordre de 10 %.

### 1.5.3. La production azotée

Les isotopes stables  $^{14}\text{N}$  et  $^{15}\text{N}$  ont une abondance naturelle de respectivement 99.635 % et 0.365 %. Dugdale and Dugdale (1965) ont été les premiers à les utiliser pour mesurer l'assimilation de l'azote dissous par le phytoplancton. La méthode consiste à enrichir le milieu en  $^{15}\text{N}$  dissous puis, après un certain temps d'incubation, à mesurer le  $^{15}\text{N}$  contenu en excès dans la phase particulaire. L'azote particulaire, recueilli sur un filtre, est réduit en azote



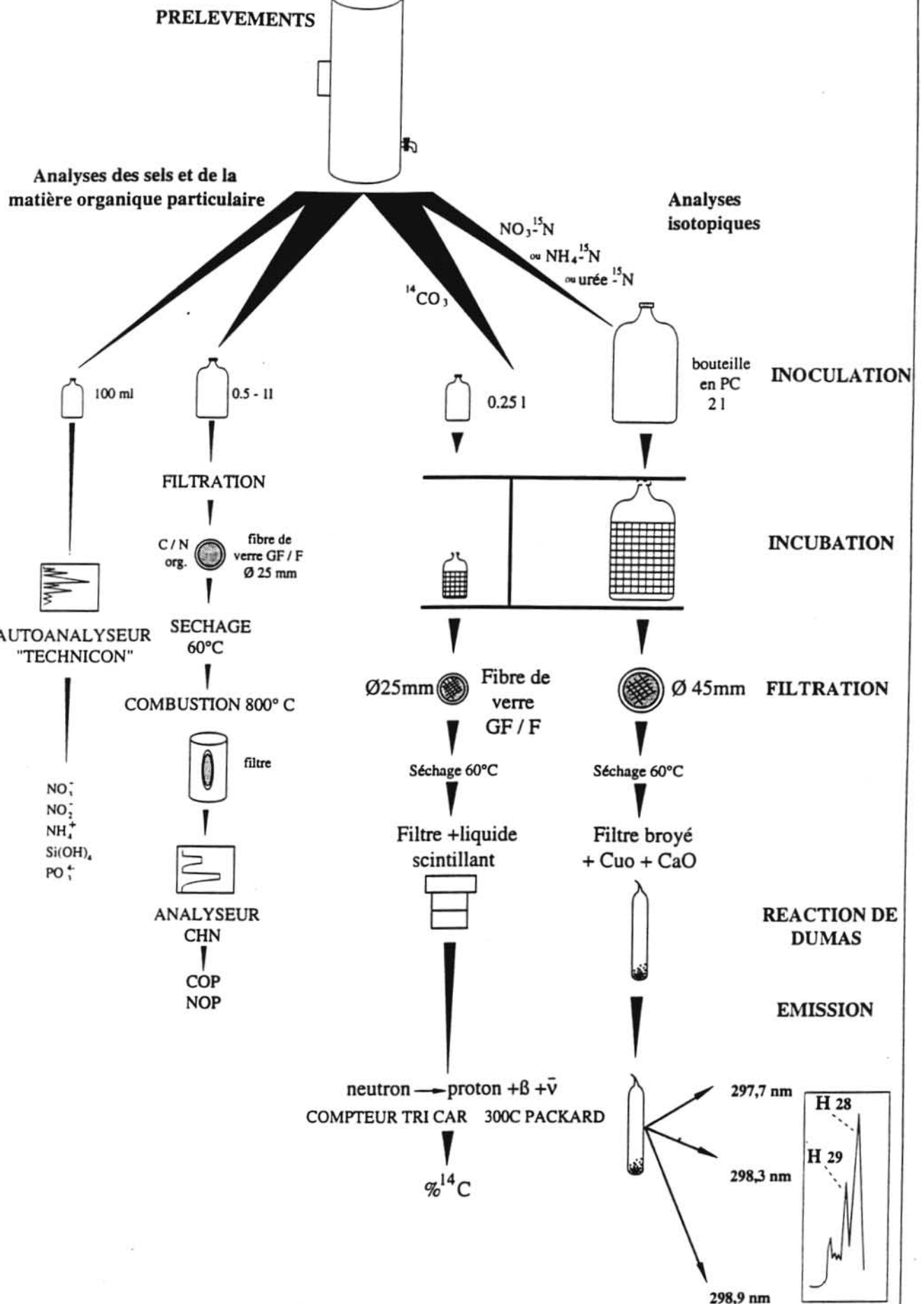


Fig. 16 : Schéma du protocole expérimental permettant la mesure des productions azotée et carbonée

gazeux de masse 28, 29, 30, puis le rapport isotopique  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  est déterminé par spectroscopie d'émission (Fig. 16).

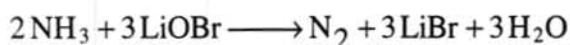
#### 1.5.3.1. Marquage isotopique

Les isotopes utilisés sont du nitrate de potassium, du sulfate d'ammonium et de l'urée marqués au  $^{15}\text{N}$ . Les traceurs utilisés parviennent du C.E.A. et contiennent 99 % d'atomes d'azote 15. La concentration d'isotope ajoutée est de l'ordre de 10 % de la concentration ambiante en nitrates et de 20 % de la concentration ambiante en ammonium. L'addition d'une quantité trop importante de traceur provoquerait une stimulation du processus d'absorption et aboutirait à une surestimation de la production azotée. Selon la période d'analyse, le volume de l'échantillon prélevé varie de 0.5 l à 2 l de façon à recueillir sur le filtre une quantité d'azote particulaire suffisante pour permettre l'analyse. Après 24 heures d'incubation, le matériel particulaire est retenu sur filtre en fibre de verre (Whatman GF/F,  $\varnothing=4.5$  cm, pré calcinés pendant 4 heures à  $450^\circ\text{C}$ ) et conservé dans des piluliers de verre au congélateur jusqu'à l'analyse. En 1993, les filtrations pour le fractionnement de taille ont été effectuées de la même façon que celles de la matière organique particulaire.

#### 1.5.3.2. Minéralisation

Deux techniques peuvent être utilisées pour le dosage isotopique de l'azote par spectroscopie optique (Fiedler and Proksch 1975, Harisson 1983).

(1) Les composés azotés peuvent être minéralisés en  $\text{NH}_4^+$  selon le procédé de la digestion de Kjeldahl puis, oxydés en azote moléculaire par action d'une solution d'hypobromite de sodium ou de lithium en milieu basique.

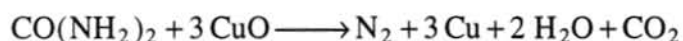


(2) La méthode modifiée de Dumas est basée sur la conversion des composés organiques azotés en azote moléculaire et en oxydes azotés, lorsqu'ils sont en présence d'oxyde de cuivre. Les oxydes azotés sont à leur tour réduit en  $\text{N}_2$  en présence de cuivre.

La méthode modifiée de Dumas est la plus utilisée car elle est plus facile à mettre en oeuvre la méthode de Kjeldahl. L'analyse est réalisée selon la procédure décrite par Lemasson et Pages (1983). Après 12 heures à l'étuve à  $60^\circ\text{C}$ , une fraction de filtre contenant  $\approx 5$   $\mu\text{g}$  de NOP (quantité requise pour obtenir une pression dans l'ampoule d'environ 1.5 torr) est broyée dans un mortier avec du  $\text{CuO}$  (cuprox). Du  $\text{CaO}$  (séché pendant 3 heures dans un four à moufle à environ  $900^\circ\text{C}$  pour décomposer le  $\text{CaCO}_3$ ) est ajouté pour piéger l'eau susceptible d'interférer la mesure lors de l'émission. Le mélange ainsi obtenu est placé dans un tube de Pyrex (8 mm  $\phi$  int., 9 mm  $\phi$  ext., 20 cm long.), préalablement lavé au sulfo-chromique et rincé 3 fois à l'eau distillée. Le Pyrex, malgré sa faible transmittance à 300 nm, est préféré au quartz



car il est moins cher et plus facile à travailler. Les tubes sont ensuite placés sur une rampe à vide et chauffés à 500°C sous vide actif pendant 20 minutes à l'aide de fours tubulaires pour désorber tout gaz des parois. La présence d'oxygène dans l'ampoule réduit l'intensité de l'émission, celle d'azote gazeux d'origine atmosphérique fausse la mesure, celle d'eau et de dioxyde de carbone affecte la sensibilité de la mesure car ces gaz émettent aux mêmes longueurs d'onde que l'azote. Le tube est scellé, puis placé dans un four à 550°C pendant environ 12 heures pour réduire l'azote organique en diazote selon une réaction du type :



L'ampoule est placée dans le spectromètre d'émission après refroidissement.

#### 1.5.3.3. Mesure de l'émission

Le principe de l'émission repose sur l'excitation des molécules de diazote par une source d'énergie externe (source haute fréquence). Lorsqu'une molécule est excitée, elle subit une transition électronique au cours de laquelle un électron monte, grâce au quantum énergétique absorbé, de l'orbitale qu'il occupe dans son état fondamental jusqu'à une orbitale de plus haute énergie. Mais de nombreux autres niveaux d'énergie (dus à des vibrations, des rotations et des translations moléculaires) se superposent aux niveaux d'énergie électroniques.

Le retour au plus bas niveau se produit par perte d'énergie ( $\Delta E$ ) sous forme de chaleur (ou parfois sous forme de ré-émission de radiation, fluorescence ou phosphorescence). Il est caractérisé par une émission lumineuse sur un large spectre où chaque bande correspond à une transition d'énergie. Chaque niveau d'énergie électronique, d'énergie de rotation, d'énergie de vibration, d'énergie de translation est quantifié et la somme de ces énergies correspond à la différence énergétique  $\Delta E = h\nu$  entre les deux orbitales concernées.

$$\Delta E = \Delta E_e + \Delta E_r + \Delta E_v + \Delta E_t \quad \Delta E = h\nu \quad \nu = c/\lambda$$

Lorsque la molécule est excitée par un champ électrique oscillant à haute fréquence, la présence d'atome de masse  $^{15}\text{N}$  dans la molécule d'azote provoque un déplacement de certaines bandes du spectre d'émission : la longueur d'onde de la bande principale des molécules de diazote 28 ( $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ ) émise dans le proche U.V. se situe à 297.7 nm, celle du diazote 29 ( $^{15}\text{N}^{14}\text{N}$ ) à 298.3 nm et celle du diazote 30 ( $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$ ) à 298.9 nm. En mesurant l'intensité de ces bandes à l'aide d'un photomultiplicateur et d'un enregistreur, on détermine le rapport isotopique  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ . Pour obtenir une émission stable, il est essentiel que la pression interne dans l'ampoule de verre soit environ de 1.5 torr (soit environ 4.5  $\mu\text{g}$  d'azote particulaire). En effet, si la pression dans l'ampoule est supérieure à 3 torr, il est difficile de provoquer l'excitation et si elle est inférieure à 0.5 torr, la décharge est instable.

Le spectromètre utilisé est le GS1 de la société SOPRA qui possède une source d'excitation H.F. de 20 Watts à 27 MHz. Le pic de  $^{30}\text{N}$  n'a été que très rarement observé. Le calcul du rapport isotopique  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  a été effectué à l'aide de la hauteur des pics de  $^{29}\text{N}$  et de  $^{28}\text{N}$ .

#### 1.5.3.4. Calcul du rapport isotopique $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$

Le pourcentage de  $^{15}\text{N}$  est égal au rapport de la somme des atomes de  $^{15}\text{N}$  sur la somme totale des atomes d'azote ( $^{15}\text{N} + ^{14}\text{N}$ ).

$$\% ^{15}\text{N} = \frac{\sum \text{atomes } ^{15}\text{N} \times 100}{\sum \text{atomes N}} \quad (1)$$

En spectroscopie d'émission, le fait d'utiliser une source haute fréquence établit un équilibre entre les différents isotopes. La réaction d'équilibre est alors représentée par l'équation (2) :



La constante d'équilibre étant définie par,

$$K = \frac{[^{15}\text{N}^{14}\text{N}]^2}{[^{14}\text{N}_2][^{15}\text{N}_2]} = 4 \quad (3)$$

le pourcentage en  $^{15}\text{N}$  peut être exprimé par :

$$\% ^{15}\text{N} = \frac{([^{15}\text{N}^{14}\text{N}] + 2[^{15}\text{N}^{15}\text{N}]) \times 100}{(2[^{15}\text{N}^{15}\text{N}] + 2[^{15}\text{N}^{14}\text{N}] + 2[^{14}\text{N}^{14}\text{N}])} = \frac{(0.5 \times [^{15}\text{N}^{14}\text{N}] + [^{15}\text{N}^{15}\text{N}]) \times 100}{([^{15}\text{N}^{15}\text{N}] + [^{15}\text{N}^{14}\text{N}] + [^{14}\text{N}^{14}\text{N}])} \quad (4)$$

Le paramètre R, étant défini comme le rapport des hauteurs de pics de  $^{28}\text{N}/^{29}\text{N}$ , et le paramètre R' comme celui des hauteurs de pics de  $^{29}\text{N}/^{30}\text{N}$ ,

$$R = \frac{[^{14}\text{N}_2]}{[^{14}\text{N}^{15}\text{N}]} = \frac{\text{hauteur du pic } ^{28}\text{N}_2}{\text{hauteur du pic } ^{29}\text{N}_2} \quad (5)$$

$$R' = \frac{1 [^{14}\text{N}^{15}\text{N}]}{2 [^{15}\text{N}^{15}\text{N}]} = \frac{\text{hauteur du pic } ^{29}\text{N}_2}{\text{hauteur du pic } ^{30}\text{N}_2} \quad (6)$$

on obtient en introduisant l'équation (3) dans l'équation (4),

$$\% ^{15}\text{N} = \frac{100}{2R + 1} \quad (7)$$

et

$$\% ^{15}\text{N} = \frac{100}{R' + 1} \quad (8)$$

L'équation (7) est utilisée lorsque le rapport  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  est inférieur à 10 % car l'émission d'un signal par le diazote  $^{30}^{15}\text{N}^{15}\text{N}$  est peu probable dans ce cas.

#### 1.5.3.5. Calcul de la vitesse spécifique et de la vitesse absolue

La variation du rapport isotopique  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  dans la matière particulaire entre le début de l'incubation et la fin de l'incubation permet de connaître la quantité d'azote incorporée par le phytoplancton au cours de l'incubation.

Les paramètres suivants ont été définis :

- $d_i$ , pourcentage de  $^{15}\text{N}$  dans la phase dissoute à  $t=0$ ,
- $P_i$ , pourcentage de  $^{15}\text{N}$  dans la phase particulaire à  $t=0$ . Ce pourcentage est égal à la concentration naturelle en  $^{15}\text{N}$ , soit 0.365 %. Mais, afin de corriger l'erreur sur le blanc commise par l'appareil, ce pourcentage a été mesuré à 0.4 %.
- $P_f$ , pourcentage de  $^{15}\text{N}$  dans la phase particulaire à  $t=24$  h. Ce pourcentage est mesuré par spectrométrie d'émission.
- $\text{PON}_i$  et  $\text{PON}_f$ , quantité d'azote organique particulaire à respectivement  $t=0$  et  $t=24$  h.
- $\Delta t$ , temps d'incubation.

La quantité de  $^{15}\text{N}$  contenue dans la phase particulaire à la fin de l'incubation ( $P_f * \text{PON}_f$ ) est égale à la somme de la quantité de  $^{15}\text{N}$  contenue dans la phase particulaire à  $t=0$  ( $P_i * \text{PON}_i$ ) et de la quantité de  $^{15}\text{N}$  incorporée au cours de l'incubation ( $\Delta N * d_i$ ,  $\Delta N$  étant la quantité d'azote assimilée par la matière vivante au cours de l'incubation) d'après Dugdale et Wilkerson (1986).

d'où,

$$P_f * \text{PON}_f = P_i * \text{PON}_i + d_i * \Delta N$$

en considérant

$$\Delta N = \text{PON}_f - \text{PON}_i$$

alors,

$$P_f * \text{PON}_f = P_i * (\text{PON}_f - \Delta N) + d_i * \Delta N \Rightarrow (P_f - P_i) * \text{PON}_f = (d_i - P_i) * \Delta N$$

d'où

$$(a) \quad v = \frac{\Delta N}{\text{PON}_f} * \frac{1}{\Delta t} = \frac{(P_f - P_i)}{(d_i - P_i)} * \frac{1}{\Delta t} \quad \text{et} \quad (b) \quad \rho = \frac{\Delta N}{\Delta t} = v * \text{PON}_f$$

ou encore,

$$P_f * (\text{PON}_i + \Delta N) = P_i * \text{PON}_i + d_i * \Delta N \quad (P_f - P_i) * \text{PON}_i = (d_i - P_f) * \Delta N$$

d'où

$$(c) \quad v = \frac{\Delta N}{PON_i} * \frac{1}{\Delta t} = \frac{(P_f - P_i)}{(d_i - P_f)} * \frac{1}{\Delta t} \quad \text{et} \quad (d) \quad \rho = \frac{\Delta N}{\Delta t} = v * PON_i$$

L'équation (a), qui utilise  $P_i$  au dénominateur, peut conduire à une sous-estimation de  $v$  si l'augmentation de la biomasse est supérieure à 10 % au cours de l'incubation. De même, l'équation (c) peut conduire à une surestimation de  $v$  lorsque  $P_f$  est utilisé. Mais, la prise en compte des deux facteurs  $P_i$  et  $P_f$  dans le calcul de  $\rho$  tend à diminuer l'erreur.

L'équation (b) est la méthode de calcul la mieux adaptée aux expériences conduites en rade de Brest. Malheureusement,  $PON_f$  n'a pas pu être mesuré. Compte tenu des taux de croissance des populations phytoplanctoniques pendant la période d'étude (variable de 0.35 à 0.88 div.j<sup>-1</sup>), l'introduction de  $PON_i$  dans l'équation (b) provoque une sous-estimation de  $\rho$  de 25 % en période hivernale et de 45 % en période de bloom phytoplanctonique. De plus, au cours des incubations, l'excrétion du zooplancton et la reminéralisation bactérienne ont pour conséquence de diluer  $^{15}NH_4^+$  avec  $^{14}NH_4^+$  (Glibert et al. 1982, Garside et Glibert 1984). Comme nos calculs d'absorption de l'ammonium ne prennent en compte que l'enrichissement initial, la valeur d'absorption basée sur l'ammonium est sous-estimée (Glibert et al. 1982, Garside et Glibert 1984) et ne peut être corrigée car l'évolution temporelle de la dilution isotopique n'est pas connue. Bien que les données doivent être interprétées avec précaution, elles permettent tout de même d'avoir une estimation de l'évolution de la production azotée.

## **Chapitre 2**

### **La rade de Brest : caractéristiques générales et flux d'azote inorganique dissous**

#### **2.1. Présentation de la rade de Brest**

##### **2.1.1. Le cadre géographique**

La rade de Brest (Fig. 15) est un bassin peu profond (8 m en moyenne) d'une superficie de 180 km<sup>2</sup> et d'un volume moyen de 2.3 milliards de m<sup>3</sup> d'eau. Elle communique à l'ouest avec la mer d'Iroise par un goulet large de 1.8 km et profond de 50 m. Elle reçoit à l'Est les eaux fluviales provenant de l'Elorn au Nord et de l'Aulne au sud. La frange littorale est de 230 km avec une partie Nord très urbanisée.

##### **2.1.2. Les apports fluviaux**

Ce bassin est alimenté en eau douce par de petits fleuves côtiers, principalement l'Aulne et l'Elorn dont la contribution annuelle à la quantité d'eau douce déversée en rade est respectivement de 69 % et de 15 % (Tab.2). L'Elorn récolte les eaux d'une région relativement urbanisée dont les rejets sont à dominante industrielle et domestique. Ces rejets, traités à 80% (Le Jehan, 1982), sont riches en sels minéraux. L'Aulne draine une région agricole. Les effluents provenant d'élevages, riches en matières organiques car peu ou pas traités, sont directement versés dans l'Aulne. Parmi les autres cours d'eaux aboutissant dans la rade, on peut

citer, par ordre d'importance, la rivière du Faou (7 % des apports fluviaux annuels), la Penfeld à Brest (3 %) et la rivière de l'Hôpital-Camfrout (3 %). Les apports fluviaux totaux sont modestes : il faut environ une année pour déverser dans la rade une quantité d'eau douce équivalente à celle d'eau de mer qui y pénètre pendant une marée.

BASSIN VERSANT	SUPERFICIE	
	km2	%
Nord rade	93	3.6
Elorn	402	15.4
Bassins intermédiaires	288	11.0
Aulne	1792	68.9
Sud rade	30	1.1
Total	2605	100.0

Tab. 2 : Importance des bassins versants des différents cours d'eaux aboutissant en rade de Brest.

### 2.1.3. L'influence des marées

Les mouvements d'eaux associés aux marées constituent l'élément principal déterminant les caractéristiques hydrologiques de la rade de Brest. La marée y est de type semi-diurne d'une période de 12h15 en moyenne. Les cycles vives eaux/mortes eaux alternent tous les 14.7 jours. Le marnage varie de 1.3 m (coeff. 20) à 7.7 m (coefficient 120), mais il est en moyenne de 4.5 m. Indépendamment des courants qui lui sont associés, la marée joue un rôle important car elle peut faire osciller d'un tiers le volume d'eau de la rade. Le volume d'eau transféré en une marée de la mer d'Iroise vers la rade, et réciproquement, représente en moyenne environ un milliard de m<sup>3</sup>.

### 2.1.4. Hydrologie de la rade

Les variations de température et salinité sont contrôlées par trois cycles : (1) le cycle semi-diurne, (2) le cycle vives eaux / mortes eaux, (3) le cycle annuel lié au régime des fleuves et des précipitations.

(1) Au cours de la variation semi-diurne, la salinité, associée à l'onde de marée, présente un maximum et minimum aux environs des étales de pleine mer et basse mer.

(2) L'alternance vives eaux / mortes eaux a une forte influence sur la stratification des eaux de la rade. En période de mortes eaux, il tend à s'établir une forte stratification haline, notamment lors des grandes crues hivernales (SAUM, 1978) car les eaux douces s'écoulent alors préférentiellement en surface. En vives eaux, le système tend à l'homogénéisation surtout en période d'étiage où la différence de salinité entre la surface et le fond est très faible.

(3) Le cycle annuel est très lié à la variation du débit des rivières car la rade est soumise à deux régimes hydrologiques. En période de crue, le volume d'eau apporté par les fleuves engendre une stratification plus ou moins marquée. La rade peut s'apparenter à un estuaire (Delmas, 1981) lors des périodes de forts débits en janvier et février (dessalure minimale de 31-32 PSS). La température moyenne des eaux de la rade en hiver est comprise entre 8.5 et 10°C (celle des eaux fluviales entre 7 et 8 °C et celle des eaux du large entre 10 et 12 °C). Puis au cours de la période de débits moyens et d'étiage, la salinité est quasiment homogène dans la colonne d'eau (salinité maximale de 35 PSS). En été, la température des eaux de la rade est de l'ordre de 16 à 19°C. La transition entre ces périodes, en mars et novembre, est relativement rapide, particulièrement au printemps où on passe sans transition du régime hivernal au régime estival (Aminot 1977, Delmas 1981).

La fertilisation de cet écosystème "macrotidal" est assurée par des apports telluriques diffus ou limités d'origine naturelle ou anthropogénique. La part croissante prise par ces derniers a conduit le SAUM (1980) à considérer 3 types d'eaux :

- au nord-est, l'eau de type "nord" manifeste l'influence des rejets urbains et industriels de l'agglomération brestoise (teneurs élevées en  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{NH}_4^+$  et en métaux),
- au sud-est, l'eau de type "sud" est caractérisée par la présence de rejets agricoles (grande abondance de matière organique et de pesticides, 70 % de l'apport total de matière azotée),
- à l'ouest, l'eau de type "intermédiaire" réunit les eaux de type "nord" et "sud" et assure l'échange avec la masse d'eau océanique provenant de l'Iroise.

## 2.2. La relation rade-fleuves

### 2.2.1. Description des deux principaux fleuves

L'Aulne prend sa source dans les Monts-d'Arée (Lohuec) et se jette dans la rade par un vaste estuaire (large de 3.6 km), après un parcours sinueux de 140 km dans des terres agricoles. Son bassin versant s'étend sur 1792 km<sup>2</sup> et assure un débit annuel moyen de 24 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>. L'Aulne possède un affluent principal, la Douffine, source d'un bassin versant de 130 km<sup>2</sup>, dont le débit annuel moyen est comparable à celui de l'Elorn.

L'Elorn est un fleuve côtier plus modeste. Il suit un cours rectiligne de 51 km de sa source dans la région de Sizun-Commana à la rade et draine un bassin versant de 402 km<sup>2</sup>. Par

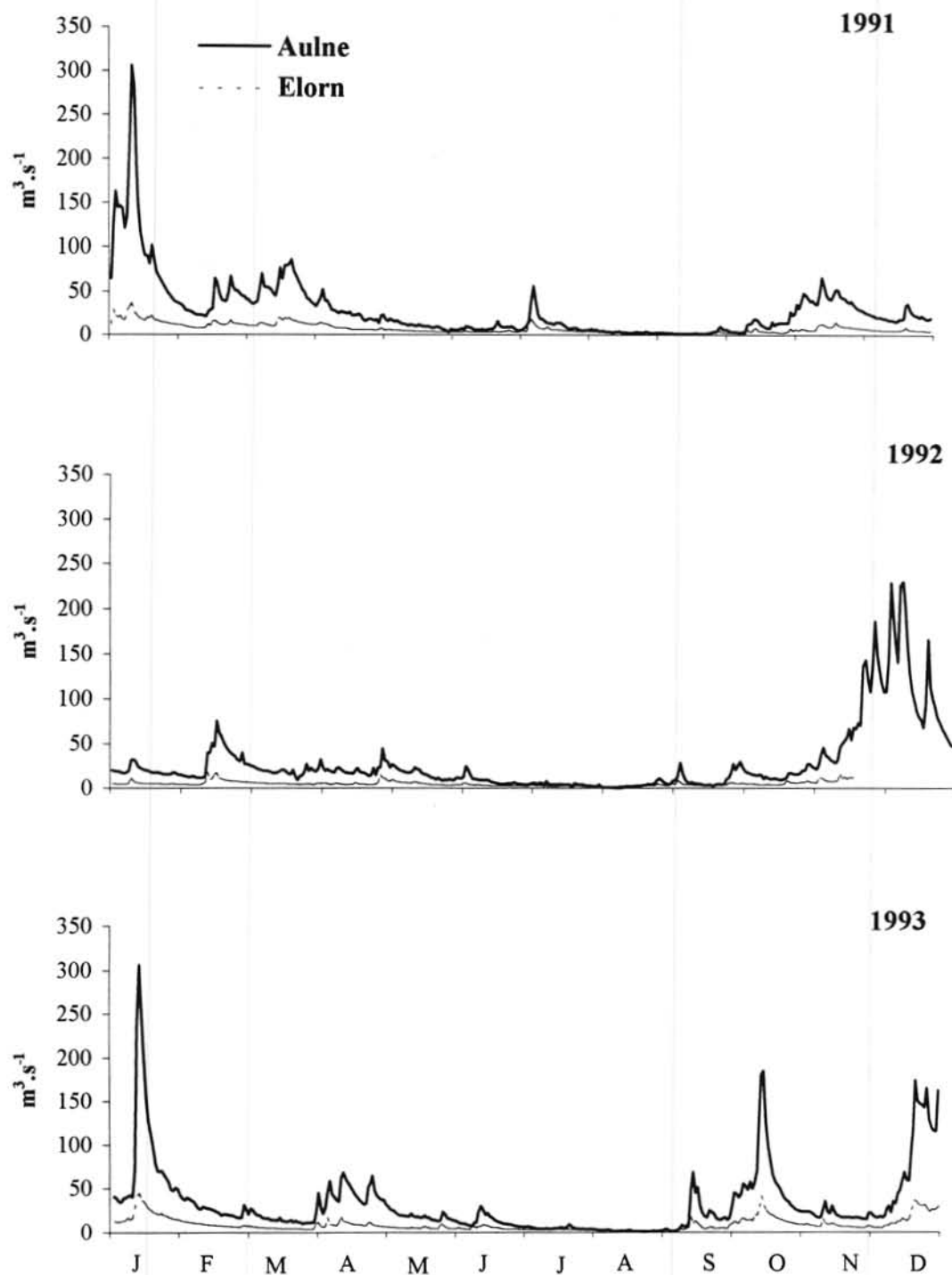


Fig. 17 : Débits de l'Aulne et de l'Elorn en 1991, 1992 et 1993.



suite, le débit moyen est plus faible que celui de l'Aulne ( $6 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ ). L'Elorn traverse des roches de schistes et de grès coblenciers.

Les débits de l'Aulne et de l'Elorn sont très irréguliers (Fig. 17) et subissent des variations saisonnières très marquées. Leur évolution montre l'alternance de crues hivernales et de périodes d'étiage estivales. En période de crues (d'octobre à mars-mai suivant les années), les débits atteignent des valeurs élevées tant dans l'Aulne ( $> 300 \text{ m}^3$ ) que dans l'Elorn ( $> 40 \text{ m}^3$ ). L'Aulne contribue alors pour 80 % de l'apport en eaux douces à la rade, alors qu'en été, les apports de l'Aulne et de l'Elorn sont comparables.

## 2.2.2. Variation interannuelle et saisonnière de la teneur du NID dans l'Aulne et l'Elorn

### 2.2.2.1. Evolution saisonnière

Les mesures effectuées en 1992 (Fig. 18) montrent que l'essentiel du NID (75%) est déversé dans la rade, surtout sous forme de  $\text{NO}_3$  (90 %), en 5 mois durant la période correspond au maximum pluviométrique et au maximum de débit.

Les concentrations de nitrates sont plus élevées dans l'Elorn que dans l'Aulne mais elles y ont des comportements identiques. Elles diminuent progressivement de moitié de l'hiver à l'été mettant en évidence la limitation du lessivage des sols en été. Les concentrations en ammonium sont également plus élevées dans l'Elorn que dans l'Aulne : en dehors de la période automnale où elles peuvent atteindre jusqu'à  $35 \mu\text{M}$ , elles sont comprises entre 10 et  $20 \mu\text{M}$ . En effet, du fait de l'importance des apports urbains, le développement du plancton en été n'est pas en mesure de faire baisser les concentrations. L'augmentation des teneurs en automne est due au phénomène de régénération qui était masqué en été par une assimilation immédiate par le phytoplancton.

### 2.2.2.2. Evolution interannuelle

D'après les analyses effectuées à la station de Pont Ar Bled (Fig. 19) depuis 1973, la teneur moyenne mensuelle en nitrates dans l'Elorn a augmenté progressivement et atteint des valeurs pratiquement deux fois plus élevées en 1993. D'après des valeurs ponctuelles, une hausse sensible des teneurs en azote est également observée dans l'Aulne. Il faut noter que le régime pluviométrique intervient sensiblement sur les flux de nitrates déversée (les années humides se caractérisent par des flux de nitrates plus élevés).

L'augmentation des teneurs en nitrates dans les fleuves depuis deux décennies peut être imputée à différents facteurs, dont le mode actuel de développement agricole qui impose un rendement élevé des cultures et des élevages, se traduisant par un épandage massif d'engrais et de déjections animales. Il en résulte des concentrations élevées en nitrates, non seulement dans

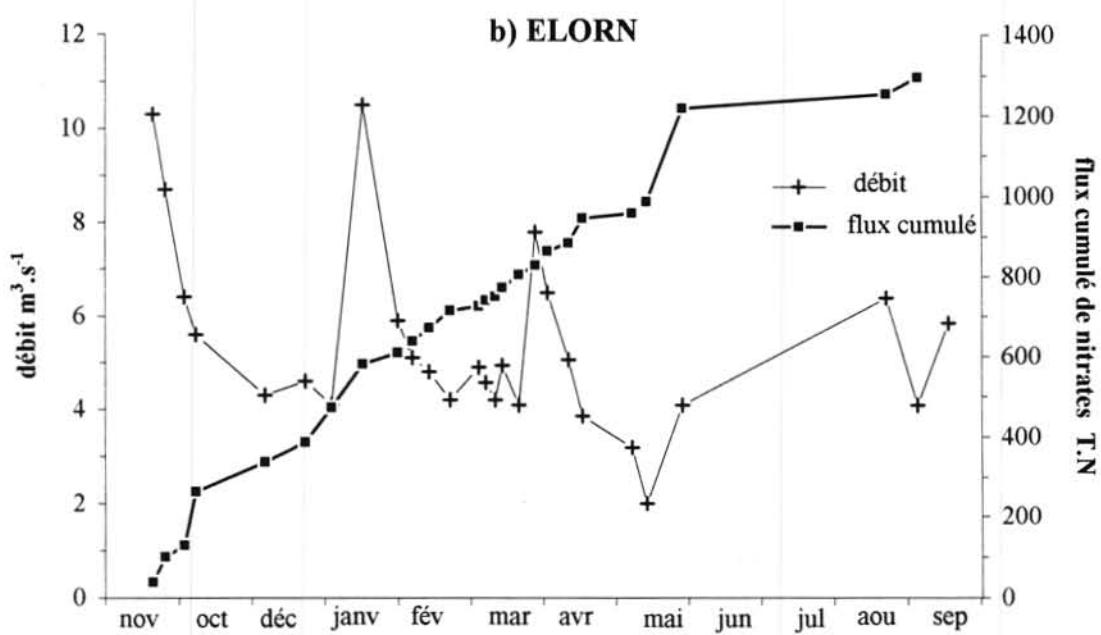
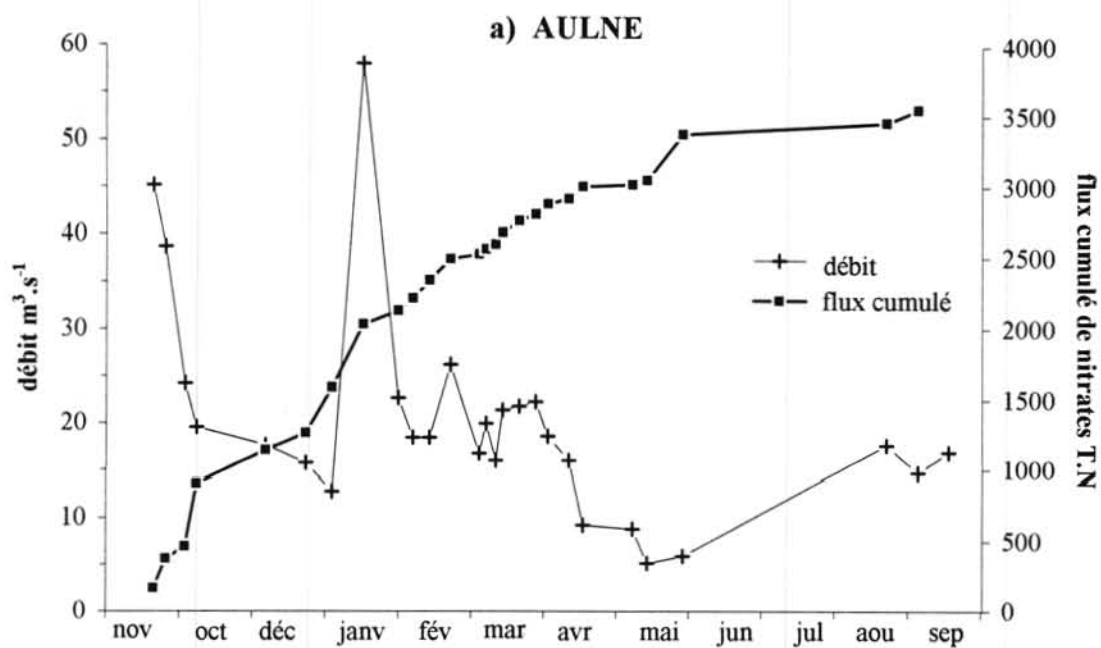


Fig. 18 : Evolution des flux cumulés de nitrates (a) dans l'Aulne et (b) dans l'Elorn en 1991-1992.

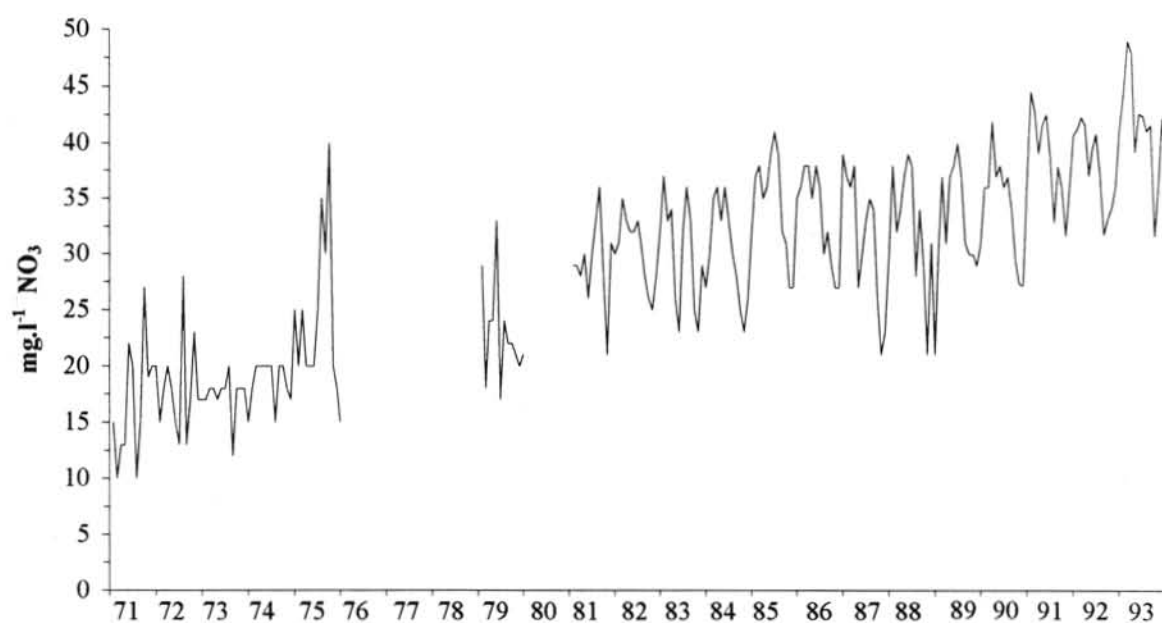


Fig. 19 : Evolution de la concentration moyenne en nitrates à la station de Pont Ar Bled (Elorn) depuis 1971.

les nappes phréatiques des zones à cultures légumières dominantes, mais aussi dans celles des zones à production d'élevage hors-sol intensif. L'augmentation du NID dans l'Elorn au cours des dernières années peut aussi s'expliquer par la présence de piscicultures intensives. Il en résulte une pollution physico-chimique non négligeable. A la suite d'une minéralisation plus ou moins rapide de l'azote organique, l'azote déversé se retrouve essentiellement sous forme d'ammonium. Cette source de pollution subit des fluctuations saisonnières importantes mais le total des rejets piscicoles dans l'Elorn peut être estimé à environ 21 T N.

### 2.2.3. Relation débit-teneur en azote inorganique dissous

#### 2.2.3.1. Les nitrates

Les teneurs des principaux éléments nutritifs dans l'eau des fleuves résultent de l'apport du drainage des sols et des apports urbains et industriels. Les nitrates sont peu retenus dans les sols. Les teneurs en nitrates varient donc en fonction du débit lorsque le bassin versant a une activité agricole, et en fonction inverse lorsque l'activité urbaine domine.

Dans l'Aulne, les concentrations en nitrates augmentent rapidement avec les débits, passent par un maximum, puis décroissent légèrement lors des très forts débits (Fig. 20). Cette relation entre la concentration en nitrates et les débits est de type logarithmique. D'après les modèles proposés par Hall (1970), Manczack et al. (1971), ce type de relation caractérise une source de pollution diffuse où le lessivage des sols est prépondérant. Le flux total résulte d'un mélange hydrologique et géochimique des flux provenant de différents réservoirs au niveau du bassin (ruissellement superficiel, ruissellement retardé dit "sub-superficiel", écoulement des nappes). Ainsi, lors de l'augmentation des débits, les ruissellements superficiel et sub-superficiel augmentent tout d'abord de manière semblable en provoquant une augmentation rapide des teneurs en nitrates. Une dispersion assez importante des valeurs est observée autour de la droite de régression dans l'intervalle  $10\text{-}20 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ . Elle est due d'une part, au fait que la montée de crue est un phénomène toujours différent et d'autre part, au rôle joué par la nitrification lors des faibles débits (mois d'été). Quand les débits sont de plus en plus forts, la capacité d'imprégnation des sols est dépassée. La contribution du ruissellement superficiel augmente alors plus vite que celle du ruissellement retardé. Ces eaux de ruissellement superficiel sont très pauvres en nitrates (teneurs proches de celles mesurées dans les eaux de pluies, Probst et al. 1985) et diluent la charge présente dans la rivière. Les mesures effectuées en 1992 confirment celles du SAUM (1980), de Delmas (1981) et celles de Souchu (1986). On observe cependant un changement de l'allure de la courbe. La concentration en nitrates a en effet pratiquement doublé entre 1980 et 1992 à débit constant. Par contre, la pente entre le flux de nitrates et le débit reste constante. Ceci montre que la capacité de désorption des sols reste la même et que c'est donc la quantité de nitrates lessivables qui a augmentée.

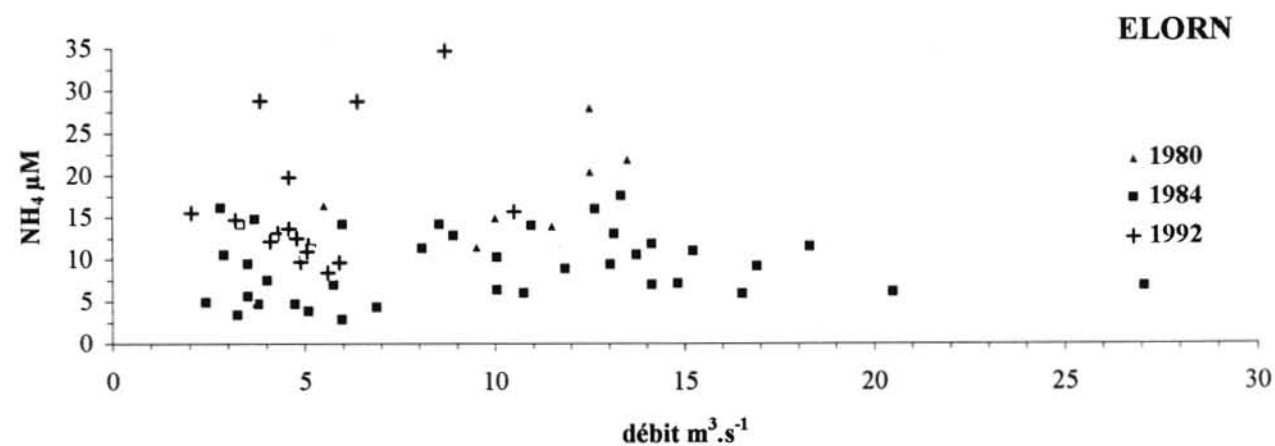
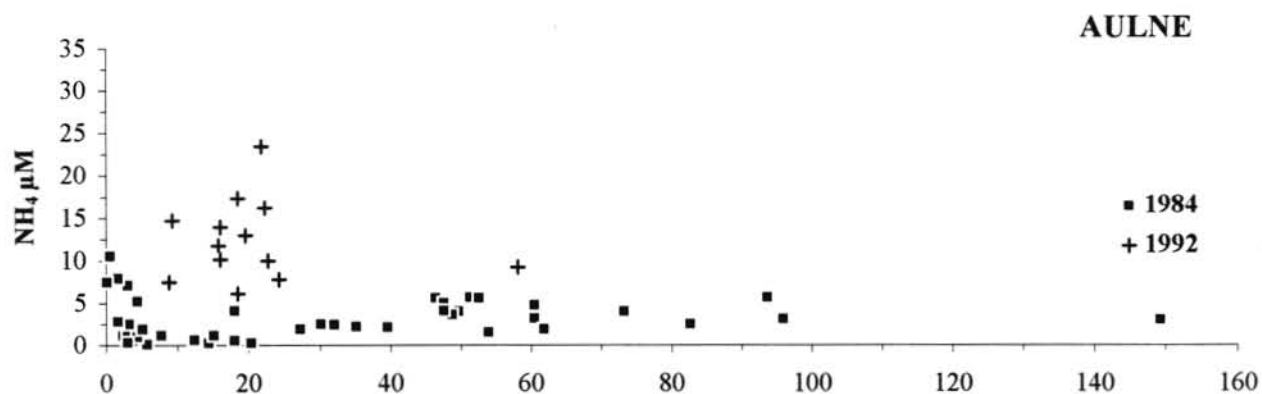
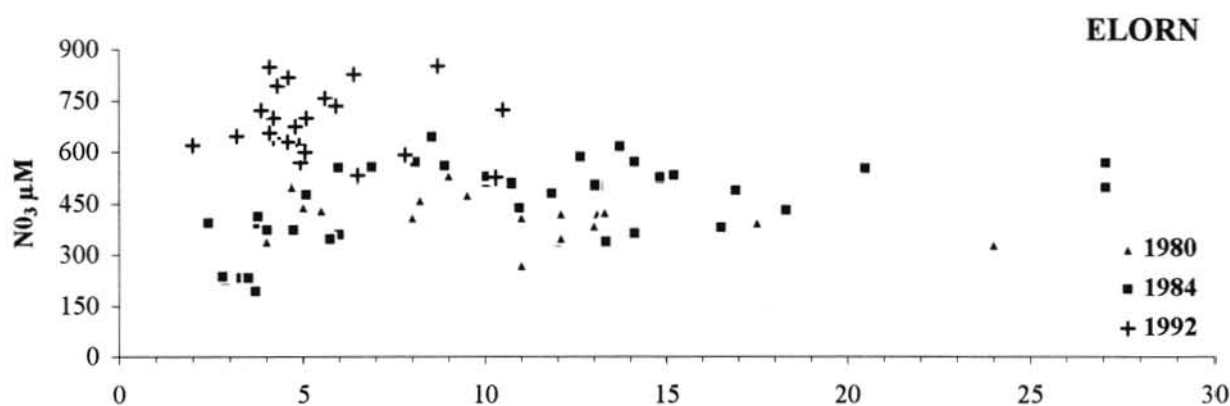
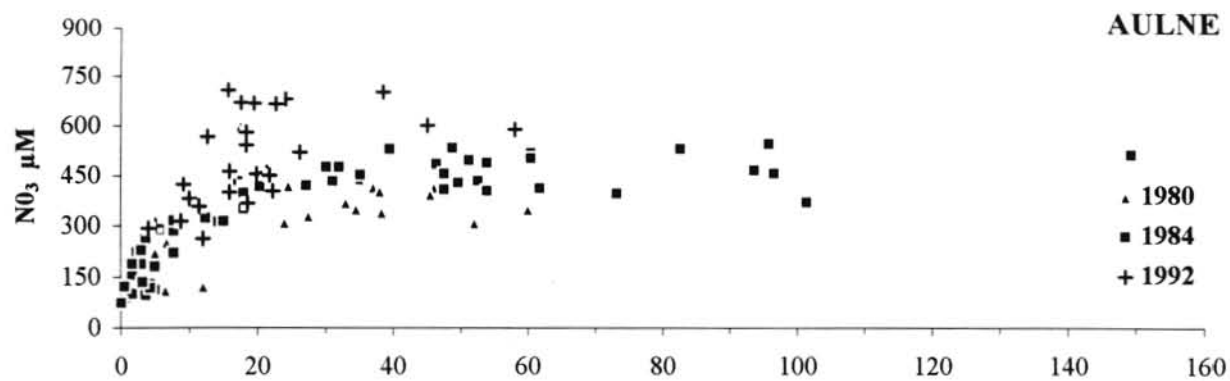


Fig. 20 : Relation entre le débit et la concentration en nitrates, entre le débit et la concentration en ammonium dans l'Aulne et dans l'Elorn en 1980, 1984 et 1992.

Dans l'Elorn, les teneurs en nitrates varient en fonction inverse du débit en 1980 (Fig. 20). Cette relation met en évidence l'influence de l'activité urbaine. En 1984, les concentrations restent comparables à celles mesurées en 1980 mais la relation entre le débit et les nitrates s'approche de la relation logarithmique. La source principale de nitrates dans l'Elorn semble alors provenir du lessivage des sols. En 1992, les teneurs à débit constant ont fortement augmenté. Mais, il est difficile d'en tirer une relation concentration-débit car les débits sont restés à un niveau exceptionnellement faible en 1992.

#### 2.2.3.2. *L'ammonium*

Dans l'Aulne, la majorité des valeurs sont comprises entre 0 et 7  $\mu\text{M}$  en 1984 lorsque le débit varie entre 0 et 150  $\text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}$ . Une spectaculaire augmentation des teneurs est notée au cours de l'année 1992 : les concentrations en ammonium passent brutalement de 6 à 26  $\mu\text{M}$  alors que le débit ne dépasse pas 30  $\text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}$ . Comme les apports urbains et industriels n'ont pas augmenté depuis 1984 et que les fortes concentrations ne sont pas observées à une période précise de l'année, ces fortes teneurs ne peuvent être reliées qu'à des apports directs et ponctuels (écoulement de fosses à lisiers pleines,...) (Fig. 20).

Les valeurs obtenues en 1992 dans l'Elorn sont comparables à celles de 1980 et 1984, malgré trois maxima supérieurs à 25  $\mu\text{M}$  (Fig. 20).

### 2.3. La relation rade-Iroise

La rade de Brest n'est pas un système fermé. La variabilité des caractéristiques physiques, chimiques et biologiques engendrée par la marée est l'une des caractéristiques originales des écosystèmes du littoral ouest européen. Le marnage est supérieur à 8 m à Brest aux forts coefficients et le volume oscillant est de 40 % en basse mer de vives eaux moyennes. Les échanges avec les eaux de l'Iroise confèrent à la rade un caractère marin marqué. L'influence estuarienne n'est nettement ressentie en rade qu'en période de fortes crues.

L'apport de matières nutritives varie beaucoup au cours de l'année en fonction des apports continentaux et des phénomènes biologiques ou physico-chimiques se déroulant dans en rade (Fig. 21) :

- \* en hiver, le flux global de matière nutritive à la sortie de l'estuaire est très important en raison de l'importance des débits et des teneurs élevées de l'eau fluviale. Les apports fluviaux se diluent le long d'un gradient halin qui s'étend jusqu'au large de la pointe de Bretagne. La mer d'Iroise est alors fertilisée par les apports fluviaux

- \* en été, l'apport de matières nutritives par les fleuves est très faible. La production primaire en rade dépend donc peu de l'apport estuarien : la majeure partie des éléments nutritifs nécessaires à la production primaire provient du recyclage des matières organiques dissoutes et particulaires. Les échanges nets rade-Iroise diminuent.

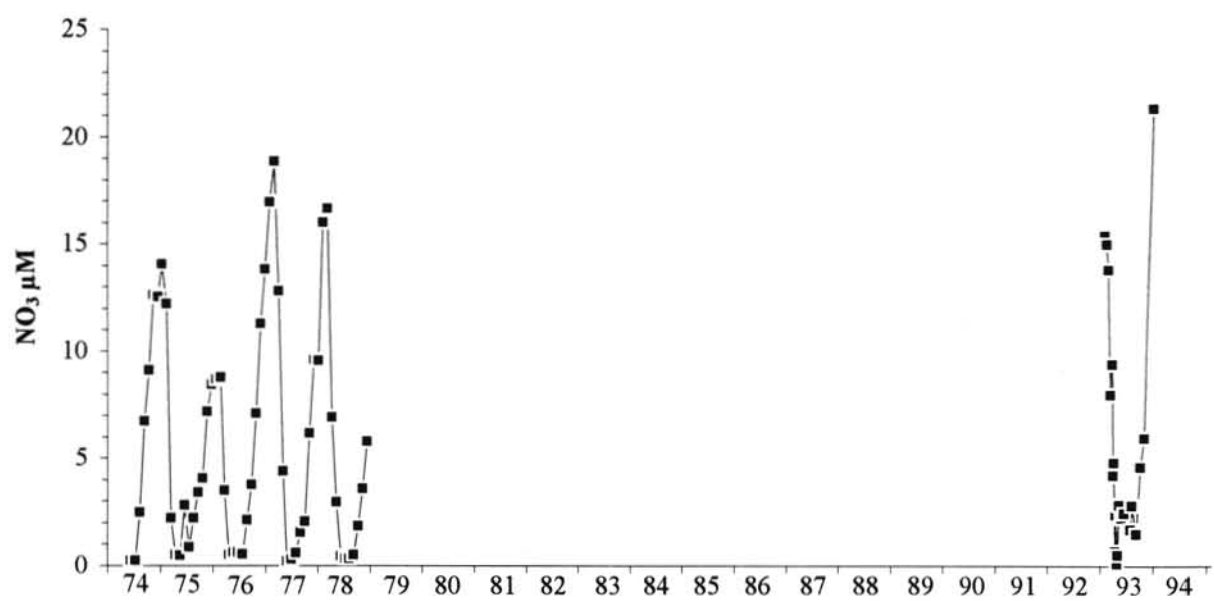


Fig. 21 : Evolution de la concentration en nitrates dans l'Iroise depuis 1974.

En comparant les teneurs en nitrates mesurées entre 1974 et 1978 par le RNO et celles mesurées en 1993, on observe une augmentation sensible des concentrations hivernales (21.4  $\mu\text{M}$  en janvier 1994, 16.9  $\mu\text{M}$  en février 1977). La durée pendant laquelle les concentrations en nitrates sont minimales ( $< 1 \mu\text{M}$ ) s'étend de mi-avril à mi-mai en 1993, alors qu'en 1975 et 1976, elle s'étendait de mi-avril à mi-août et en 1977 et 1978, de juin à fin août. L'augmentation des concentrations en période estivale met en évidence une augmentation des échanges entre la rade et l'Iroise.

## 2.4. Les rejets urbains

La CUB possède un système d'assainissement collectif, auxquels sont raccordés des établissements à caractère industriel en plus de la population domestique. Certaines industries possèdent leur propre système d'épuration ou de pré traitement. Les eaux usées de la CUB transitent par cinq stations d'épuration qui sont classées par ordre de capacité :

Station de la zone portuaire (ZIP),	85000 EH
Station de la maison Blanche,	60000 EH
Station de Brest II,	50000 EH
Station de Toul Ar Rannic,	6000 EH
Station du Portzic,	8000 EH
Station de L'Hospitalou,	2500 EH

Dans ces stations d'épuration, les eaux usées subissent une épuration physique et biologique ainsi qu'une légère désinfection au chlore avant le rejet. Les conditions de fonctionnement sont bonnes au niveau des ouvrages : les effluents rejetés répondent aux normes imposées par le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France. Mais, il faut tenir compte de nombreux rejets directs d'eaux usées qui transitent par le cinq cours d'eaux de la région brestoise, ainsi que ceux dus à des raccordements irréguliers, aux trop-pleins et aux déversoirs d'orage des réseaux.

Il est difficile de connaître les flux des rejets urbains dans une zone côtière car d'une part, les apports sont nombreux et diffus et d'autre part, il existe de très grandes variations journalières et saisonnières. La pluviométrie influe sur les volumes d'eau transitant par les stations et sur les flux de pollution rejetés. Les stations d'épuration de la ville de Brest présente, avec un débit compris entre 12000 et 50000  $\text{m}^3.\text{j}^{-1}$ , une source importante en ammonium (1950  $\mu\text{M}$  en moyenne) alors que l'apport en nitrates est très faible (de 80 à 160  $\mu\text{M}$ ). Les flux globaux en ammonium des stations d'épuration sont supérieurs à ceux de l'Elorn (respectivement 750  $\text{kg N.j}^{-1}$  et 180  $\text{kg N.j}^{-1}$ ). Le flux total moyen d'azote inorganique dissous déversé par les stations d'épuration dans la rade à 0.9 T  $\text{N.j}^{-1}$ .



## 2.5. Les apports atmosphériques

La Bretagne est une région peu industrialisée dont l'économie est essentiellement tournée vers les activités agricoles : on peut donc espérer qu'elle soit à l'abri des pluies acides riches en nitrates. Elle subit cependant en plus de l'influence des dépressions d'origine océanique, l'influence de pollutions plus ou moins lointaines à partir de masses d'air s'étant préalablement déplacées au dessus de l'Europe du nord-est (Morelli et al., 1984).

D'après l'étude effectuée par Souchu (1986), l'évolution des concentrations en ammonium dans l'eau de pluie est parallèle à celle des concentrations en nitrates et le rapport  $[NH_4]/[NO_3]$  est voisin de 1. Les teneurs les plus élevées ( $> 300 \mu M$ ) correspondent généralement aux précipitations les plus faibles. Une pluie fortement concentrée n'est donc pas synonyme de dépôt important (Souchu, 1986). Il constate également que la ville de Brest est à l'origine d'une pollution locale car les activités urbaines (notamment la combustion de fuel) participent à la charge en azote inorganique dissous de l'atmosphère. Mais, de façon générale, les concentrations mesurées restent faibles par rapport à celles mises en évidence en Europe septentrionale.

Les apports directs d'azote atmosphérique à la rade restent limités par rapport aux apports fluviaux. Cependant, en période estivale et dans des conditions maximales de stabilité des eaux (mortes eaux, basse mer), un flux de  $350 \mu mol.m^{-2}.j^{-1}$  d'azote inorganique dissous peut constituer une source d'azote importante pour le développement planctonique dans des eaux alors très appauvries en azote.

## 2.6. Les échanges à l'interface eau-sédiment

En milieu côtier, l'interface eau-sédiment contrôle une part importante du cycle biogéochimique des éléments. Les échanges de matière, et en particulier d'azote inorganique dissous, résultent de phénomènes intervenant à l'interface eau-sédiment : diffusion, recyclage d'origine bactérienne, excrétion de la faune endogée et épigée, activité du phytobenthos.

Les mesures de flux de nitrates et d'ammonium menées au printemps 1992 (Tab. 3) confirment les valeurs de Souchu (1986). Les flux de nitrates sont en moyenne plus faibles que ceux d'ammonium. L'azote ammoniacal est en effet l'un des principaux composés issu de la dégradation de la matière organique. Sa concentration dans l'eau interstitielle est toujours supérieure à celles mesurées dans la colonne d'eau. Par contre, les teneurs en nitrates dans l'eau interstitielle dépendent du taux d'oxygénation.

Les blooms phyto et zooplanctoniques constituent une source saisonnière importante de NOP pour le sédiment. La reminéralisation par le sédiment (flore bactérienne et faune benthique) du NOP dépend donc de l'activité biologique dans la colonne d'eau. Ainsi, les flux d'ammonium, dirigés vers le sédiment avant le bloom, sont inversés dès que le flux de NOP

vers le sédiment devient important. Cet ammonium régénéré constitue une source de NID rapidement disponible et semble contribuer au maintien de la production primaire en été (Quéguiner et Tréguer, 1984). Au cours du printemps 1992, le sédiment est un puits d'azote nitrique. L'absorption de nitrates par le sédiment début avril, non corrélée à des flux positifs d'ammonium, peut être considérée comme une dénitrification, stimulée par la surcharge de nitrates d'origine fluviale dans la colonne d'eau (Nedwell, 1982). Ensuite, au cours du bloom, lorsque les teneurs en azote nitrique dans la colonne d'eau diminuent, le sédiment importe le NID sous forme de nitrates et l'exporte sous forme d'ammonium. Le NID joue ainsi un rôle dans le transfert de l'oxygène de la colonne d'eau vers le sédiment.

	Flux de nitrates $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$	Flux d'ammonium $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$
06 avril 1992	-23.0	-364.8
30 avril 1992	0.0	18.1
14 mai 1992	0.0	-7.5
04 juin 1992	-5.9	82.8
16 juin 1992	-6.6	12.8

Tab. 3 : Les flux de NID à l'interface eau-sédiment dans l'anse du Fret au printemps 1992

## 2.7. L'azote inorganique dissous en rade de Brest

### 2.7.1. Evolution du NID en surface

#### 2.7.1.1. Les nitrates

En 1992, l'évolution saisonnière des concentrations en nitrates dans les eaux de surface de la rade de Brest (Fig. 22) sont très variables d'une année sur l'autre car elles sont directement corrélées à la salinité. Les teneurs les plus élevées ( $65 \mu\text{M}$ ) sont observées en hiver traduisant ainsi l'influence des apports agricoles. Au début du printemps, la diminution des apports fluviaux et le déclenchement du bloom sont responsables d'une diminution rapide de la concentration en nitrates. En 1981, 1982, 1983 et 1985 (Quéguiner 1982, Souchu 1986), les nitrates étaient rapidement et durablement épuisés (teneurs inférieures à  $2 \mu\text{M}$  de mi-mai à fin août) : un tel épuisement n'intervient que à la mi-juin en 1992 et à la mi-juillet en 1993. Les

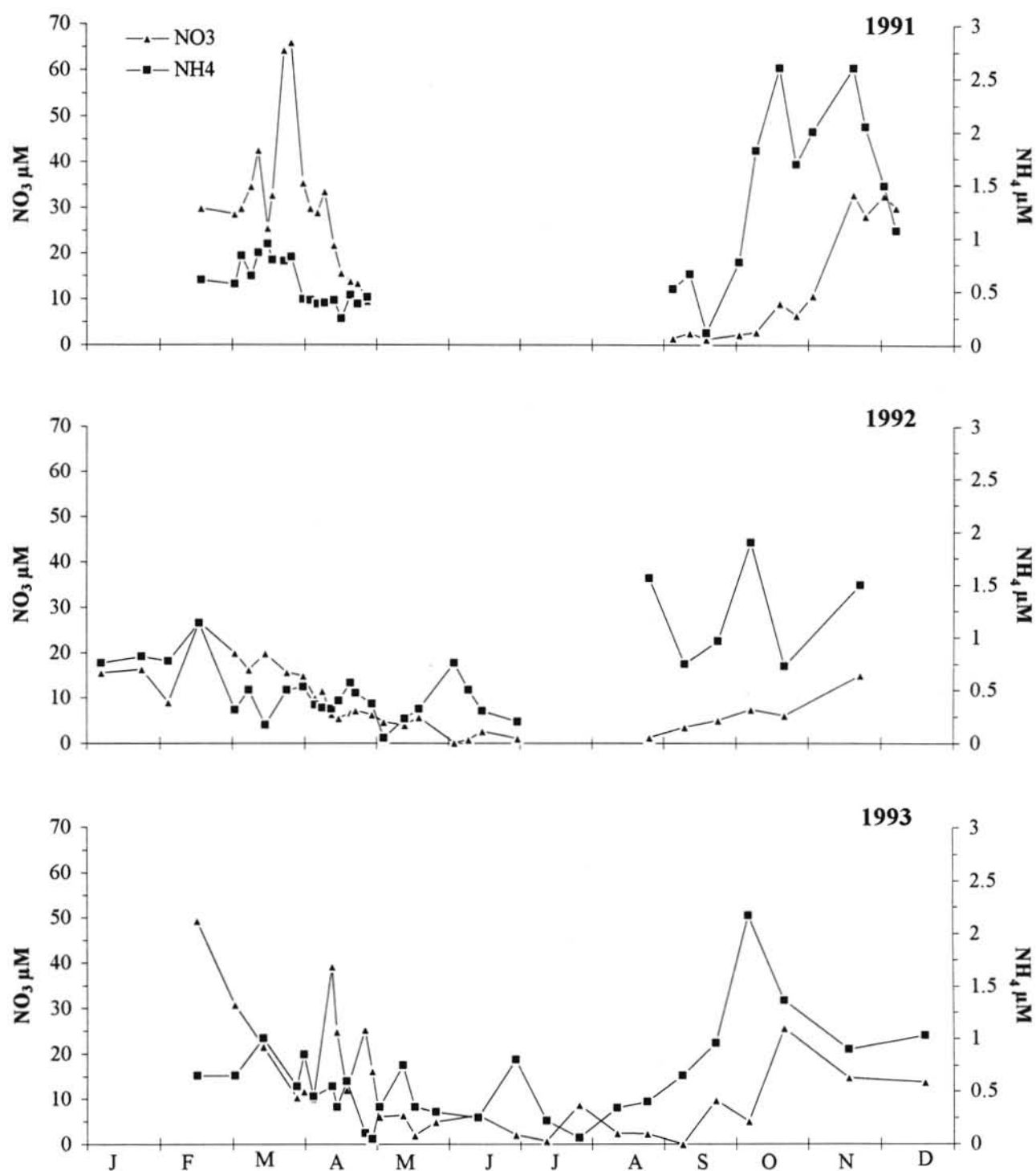


Fig. 22 : Evolution de la teneur en nitrates et ammonium dans les eaux de surface à la station R3 entre 1991 et 1993.

concentrations restent inférieures à 2  $\mu\text{M}$  jusqu'à fin août en 1992 alors qu'elles demeurent élevées tout l'été en 1993 (de 8  $\mu\text{M}$  à 3  $\mu\text{M}$ ) en raison de débits fluviaux sensiblement plus élevés en juin 1993. Dès l'automne, les fortes précipitations induisent une fertilisation par les apports fluviaux et les teneurs en nitrates augmentent rapidement vers les maxima hivernaux.

#### 2.7.1.2. *L'ammonium*

Les teneurs en ammonium (Fig. 22) présentent des valeurs maximales en automne (entre 1.5 et 2.5  $\mu\text{M}$ ) et minimales au printemps (< 0.3  $\mu\text{M}$ ). Cet épuisement printanier est bref car dès le début du mois de mai se produit une augmentation des teneurs probablement liée à l'action des hétérotrophes : excrétion du zooplancton, recyclage par biodégradation bactérienne de la matière organique. L'azote ammoniacal ne représente pas plus de 5 % de l'azote inorganique dissous en hiver. Mais, son influence devient prépondérante en juillet-août car ses teneurs sont alors comparables à celle de l'azote nitrique.

### 2.7.2. Evolution saisonnière du NID dans la colonne d'eau

#### 2.7.2.1. *Les nitrates*

En 1992, la relation nitrate-salinité est vérifiée dans la colonne d'eau pratiquement toute l'année. Ainsi, de septembre à mi novembre, la teneur en nitrates augmente régulièrement de façon homogène dans toute la colonne d'eau, parallèlement à la diminution de la salinité (Fig. 23a et 23c). Puis, les crues rencontrées au cours de l'hiver (novembre, janvier, février) induisent une stratification des nitrates et de la salinité. Au cours de la floraison printanière, la concentration en nitrates diminue régulièrement de façon homogène.

La situation en 1993 est comparable à celle de 1992 (Fig. 24a et 24c) : la teneur en nitrates est directement reliée à la salinité et les crues hivernales provoquent une stratification des eaux. La concentration en nitrates passe progressivement de 30 à 15  $\mu\text{M}$  entre février et mars d'une façon quasi-homogène dans toute la colonne d'eau. L'importance de la crue d'avril induit une stratification très prononcée et masque la diminution des teneurs engendrée par la floraison printanière. La concentration en nitrates est inférieure à 2  $\mu\text{M}$  dès mi-mai en dessous de 25 % de lumière incidente alors que les valeurs mesurées en surface atteignent ce seuil seulement fin juin. Elles sont ensuite supérieures à 2  $\mu\text{M}$  sur l'ensemble de la colonne d'eau tout l'été.

#### 2.7.2.2. *L'ammonium*

Le comportement de l'ammonium est totalement différent de celui des nitrates (Fig. 24b). Parallèlement aux observations effectuées en surface, la concentration en ammonium tend à diminuer dès le déclenchement de la floraison printanière. La production phytoplanctonique et l'action des hétérotrophes semble avoir une influence plus importante que les apports fluviaux

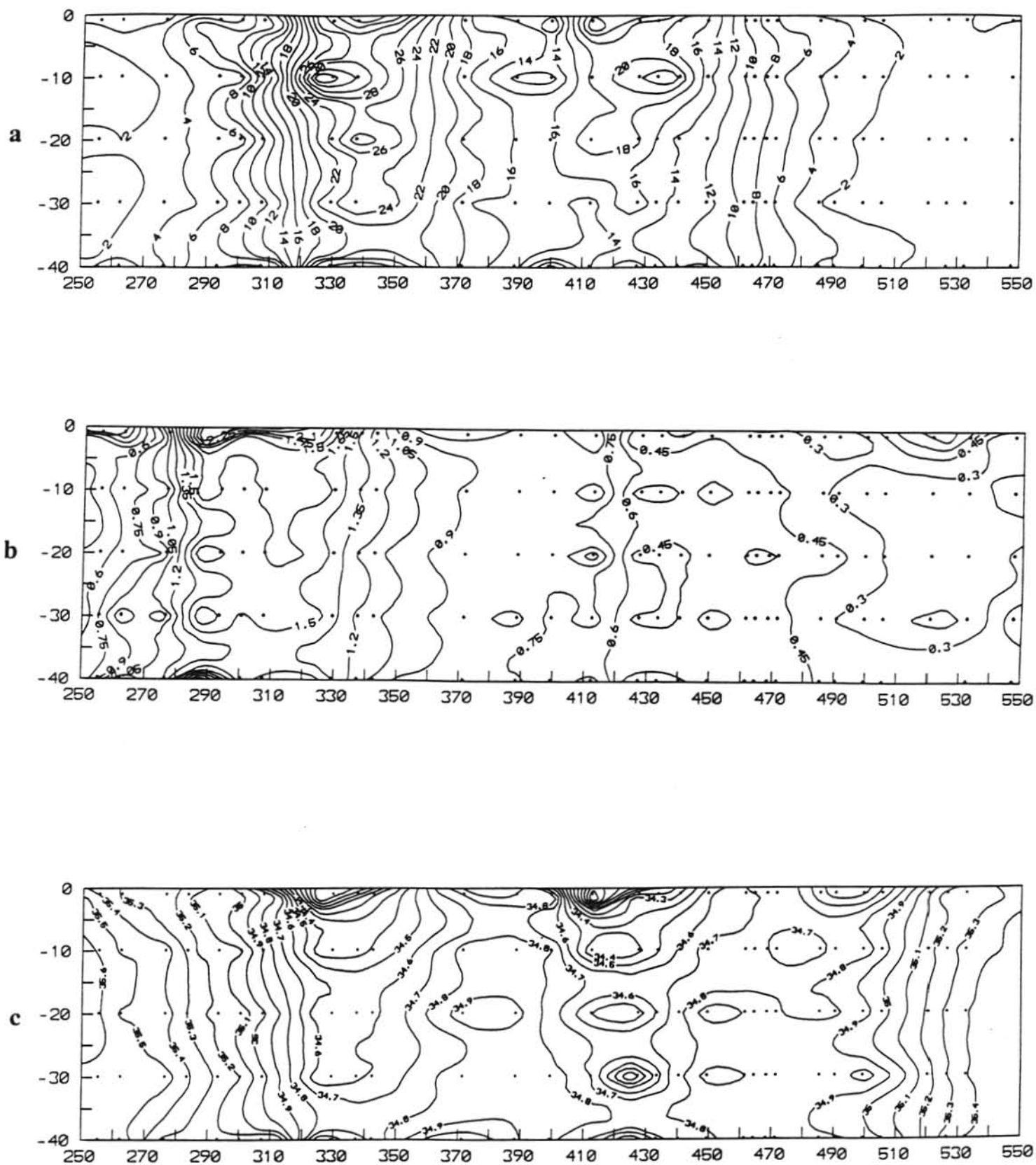


Fig. 23 : Evolution des nitrates (a), de l'ammonium (b) et de la salinité (c) dans la colonne d'eau à la station R3 entre septembre 1991 et juillet 1992.

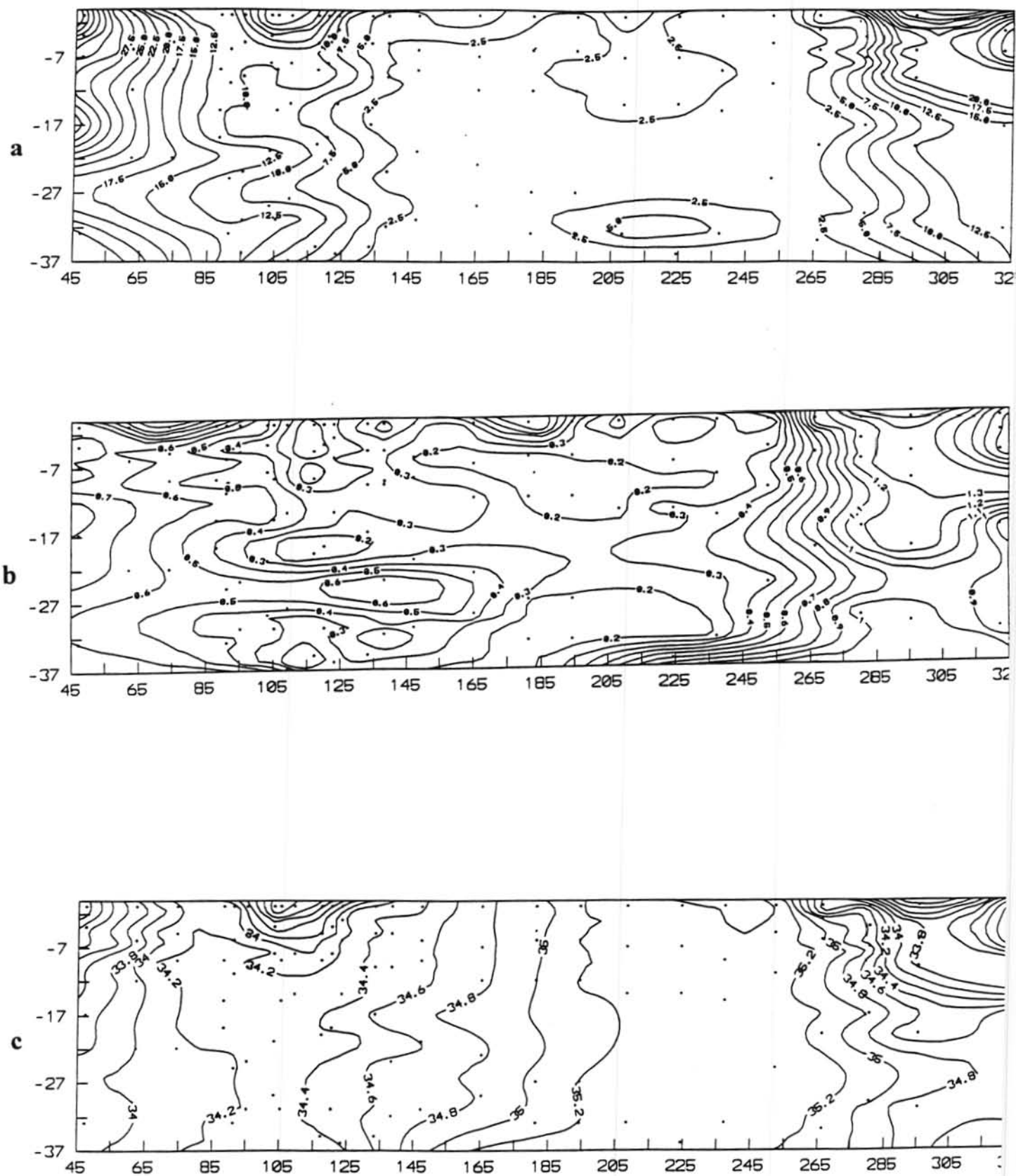


Fig. 24 : Evolution des nitrates (a), de l'ammonium (b) et de la salinité (c) dans la colonne d'eau à la station R3 entre février et novembre 1993.

en période printanière car même la forte crue d'avril 1993 ne provoque aucune augmentation spectaculaire des teneurs. En période automnale, l'ammonium présente une évolution remarquable. La concentration augmente en effet de façon homogène en septembre (de 0.4  $\mu\text{M}$  à 0.9  $\mu\text{M}$ ), puis au moment de la reprise des crues, une stratification est observée à la fois en surface et au fond, suite à l'importance de la régénération par le sédiment à cette période.



## Chapitre 3

### **La floraison printanière en rade de Brest : évolution interannuelle de la production azotée**

#### 3.1. Conditions générales du milieu

##### 3.1.1. Paramètres météorologiques et hydrologiques

###### *3.1.1.1. Précipitations et débits*

Une augmentation des précipitations est généralement synonyme d'augmentation du débit des fleuves, sauf en période estivale où les sols asséchés absorbent la quasi totalité de la pluie. Les débits de l'Aulne et de l'Elorn sont caractérisés par leur variabilité à la fois saisonnière et interannuelle (chapitre I 2.2.1.). Les variations saisonnières sont caractérisées par des crues en période automnale et hivernale et des périodes d'étiage en été. La variation interannuelle se distingue particulièrement au moment des crues hivernales. Ainsi pendant l'hiver 1991-1992, le débit maximal mesuré est cinq fois inférieur à celui mesuré en 1992-1993. De plus, des débits de l'ordre de  $60 \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$ , comparables aux maxima de l'hiver 1991-1992, ont été mesurés en avril 1993 alors que généralement les débits tendent à diminuer entre février et fin avril (cf. 1991 et 1992). Ce phénomène est à relier au caractère exceptionnel de la pluviosité du début de l'année 1993. Il est en effet tombé 553 mm d'eau en moins de quatre mois (dont 70 % entre



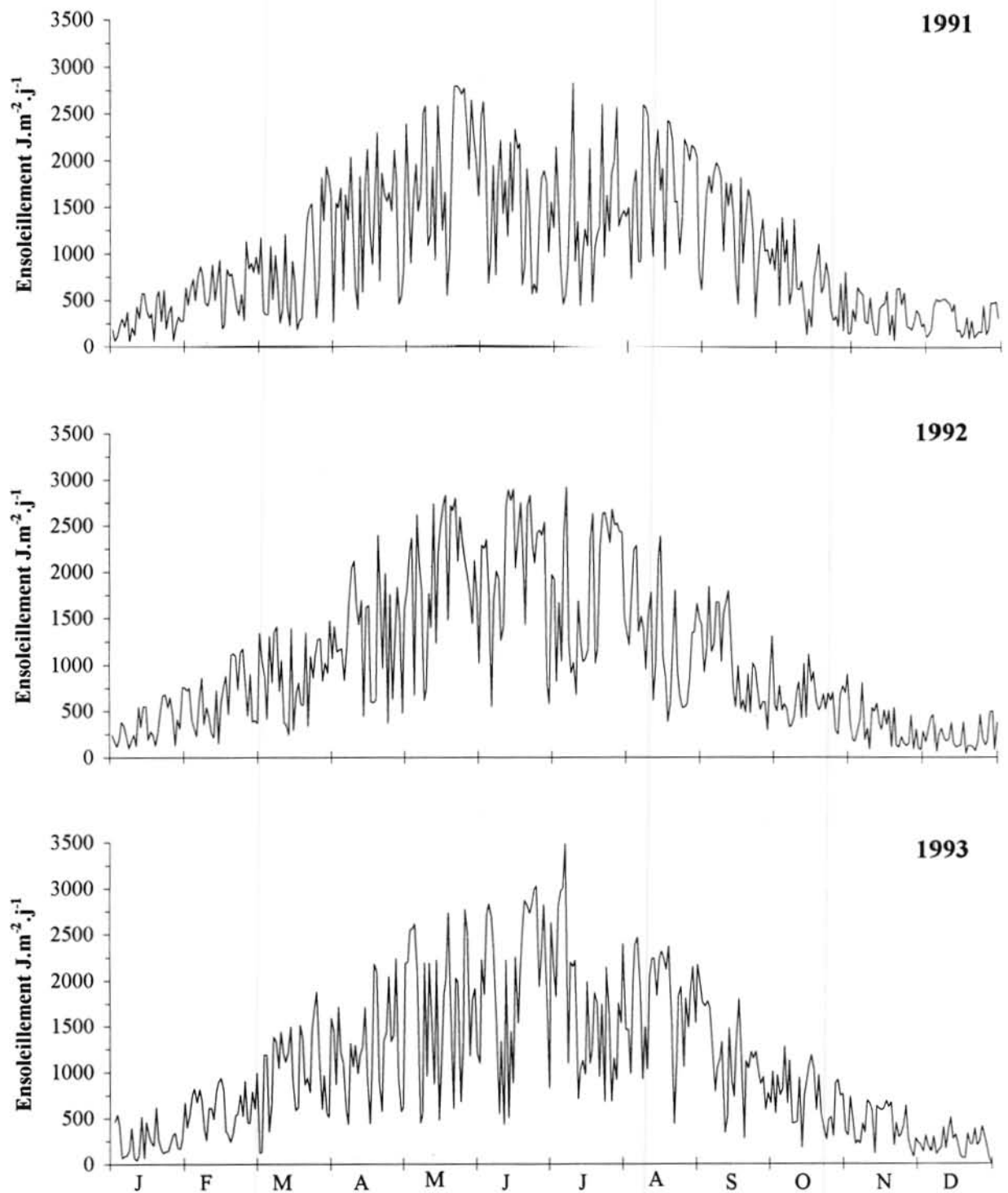


Fig. 25 : Evolution de l'ensoleillement à Lanvéoc entre 1991 et 1993.

le 30 mars et le 26 avril), soit plus de la moitié des précipitations annuelles moyennes (800-1000 mm).

### 3.1.2.2. L'ensoleillement

L'ensoleillement (Fig. 25) montre de grandes fluctuations journalières. Mais, il augmente régulièrement de janvier à juin et atteint des valeurs maximales de l'ordre de  $2000 \text{ J.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  en juillet et août. Une chute régulière est ensuite observée jusqu'à début décembre (valeurs moyennes de  $250 \text{ J.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ ). Aucune variation interannuelle très marquée n'a été observée en 1991, 1992 et 1993.

### 3.1.2. Paramètres physiques

#### 3.1.2.1. La température de l'eau

Le cycle de la température de l'eau de surface en rade de Brest (Fig. 26) est comparable à celui de l'ensoleillement. La température de l'eau augmente régulièrement entre la mi février (minimum  $6.3^{\circ}\text{C}$  le 18 février 1991) et début septembre (maximum  $18.0^{\circ}\text{C}$  le 13 septembre 1991). Le seuil de  $10^{\circ}\text{C}$ , considéré comme la température minimale permettant le développement potentiel du phytoplancton en rade de Brest (Dauchez et al., 1991), est franchi entre la mi-mars et début avril.

#### 3.1.2.2. La salinité

La variation de la salinité en R3 (Fig. 27) est directement reliée aux débits fluviaux car tout apport d'eau douce provoque une dessalure plus ou moins prononcée (minimum de 31.1 PSS le 25 mars 1991). Les valeurs minimales sont donc généralement relevées entre novembre et avril. Mais, si les débits sont faibles durant cette période, une salinité exceptionnellement élevée peut être mesurée (34.2 PSS en 1991). La salinité dépasse le seuil des 35 PSS dès le mois de mai, reste stable à environ 35.3 PSS durant la période d'étiage, puis diminue dès la reprise des crues en automne.

#### 3.1.2.3. L'oxygène

Les eaux de surface (Fig. 28) sursaturées en oxygène du printemps à l'été mettent en évidence la relation entre la teneur en oxygène dissous dans le milieu et l'activité biologique. Les teneurs augmentent régulièrement au cours du printemps et atteignent des maxima (127, 121.7, 122.3 % respectivement en 1991, 1992 et 1993) en phase avec ceux de la chlorophylle. Les valeurs inférieures à 100 % relevées en automne 1991 sont dues d'une part, à la dégradation de la matière particulaire particulièrement importante à cette période, et d'autre part aux faibles débits des fleuves qui provoquent une diminution du brassage entre les différentes masses d'eau.

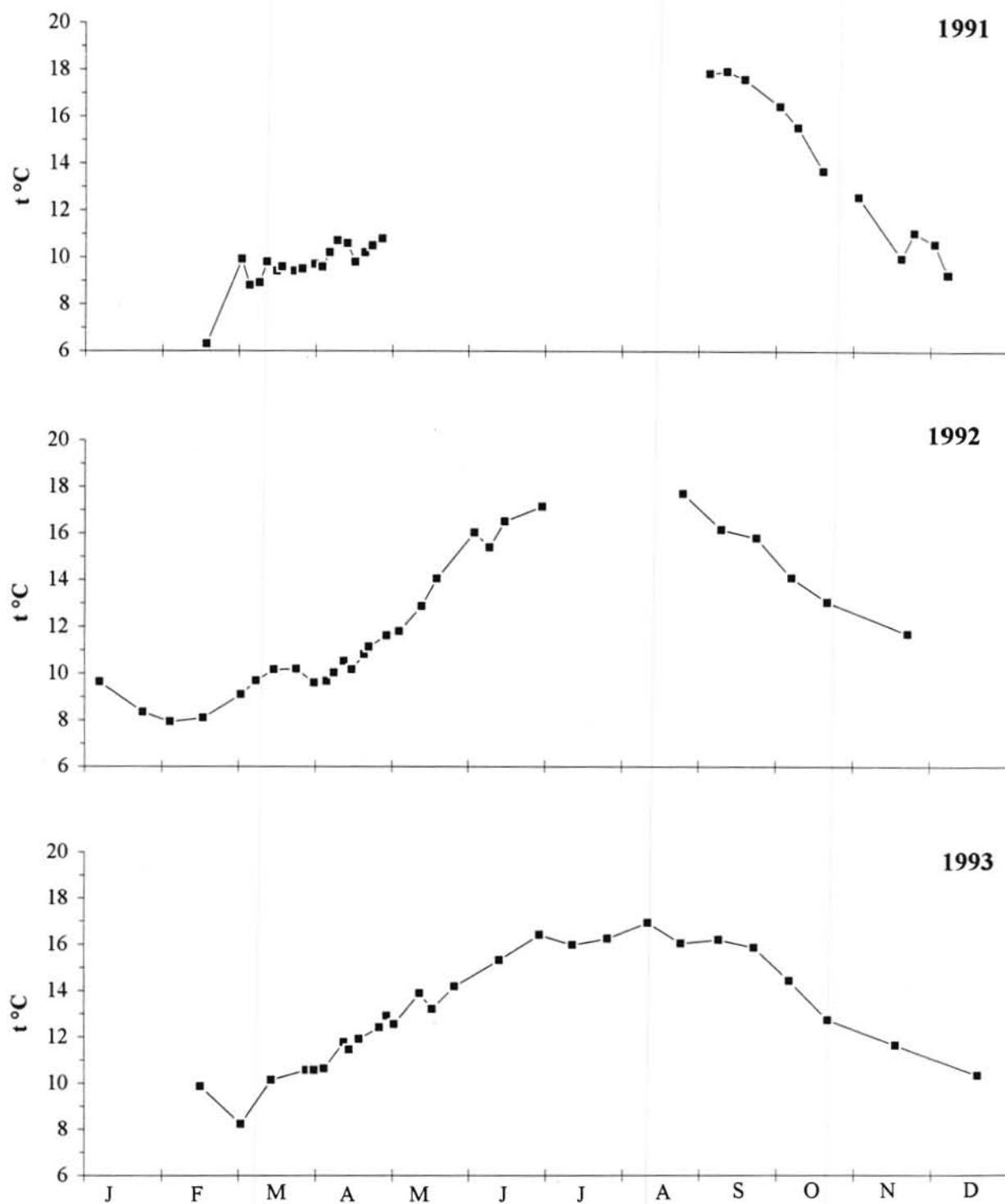


Fig. 26 : Variation de la température dans les eaux de surface à la station R3 entre 1991 et 1993.

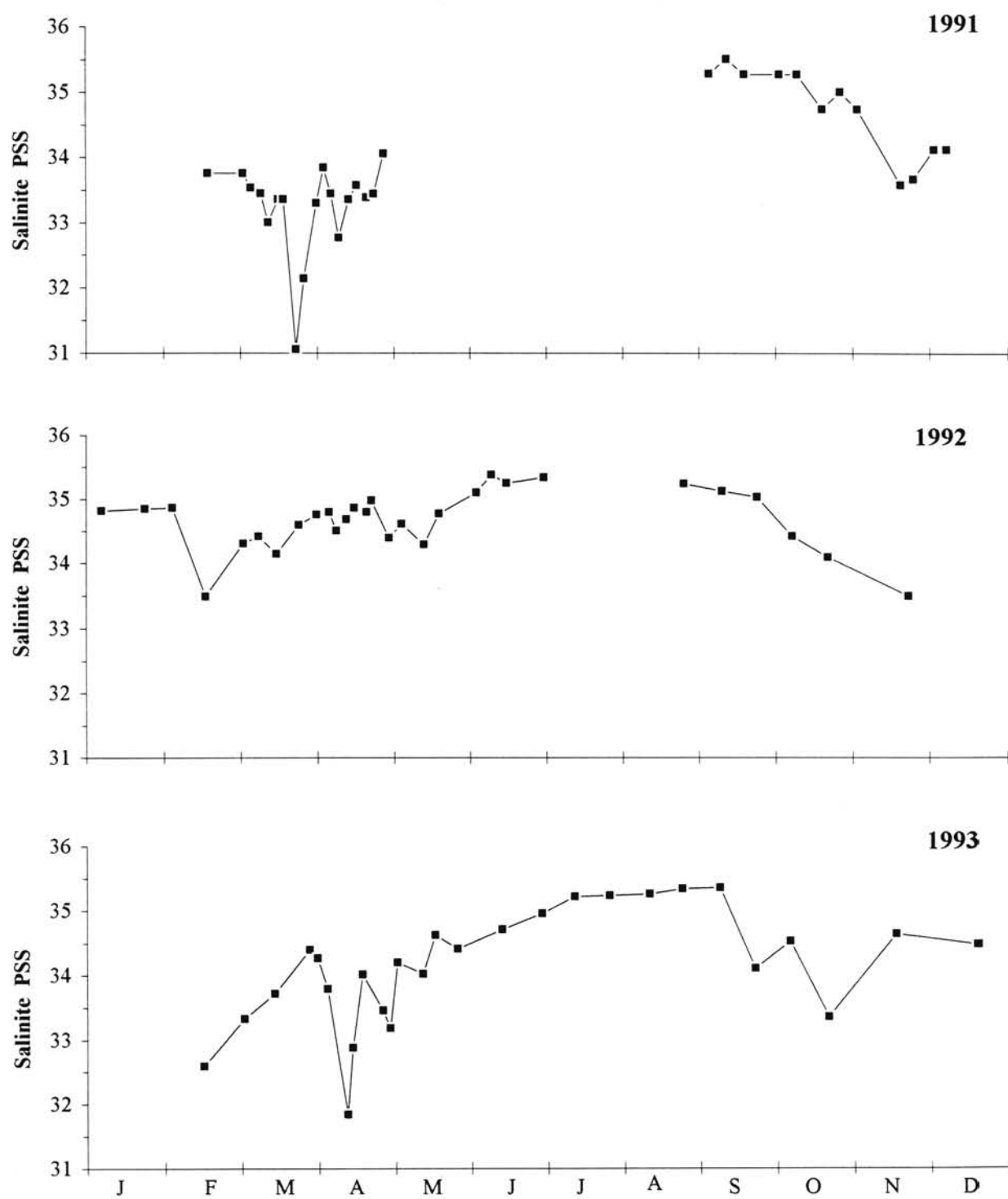


Fig. 27 : Evolution de la salinité dans les eaux de surface de la station R3 entre 1991 et 1993.

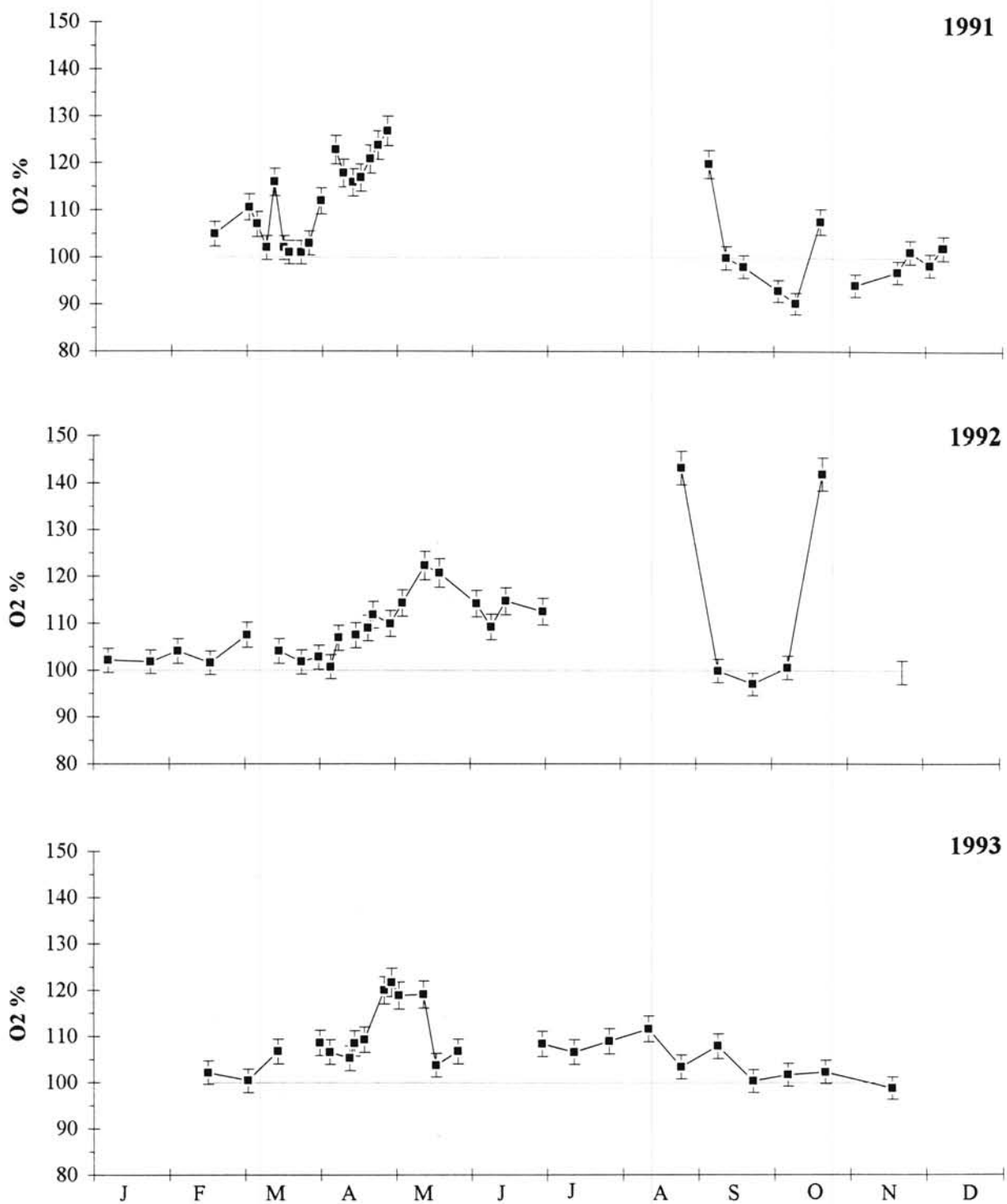


Fig. 28 : Evolution de la teneur en oxygène dans les eaux de surface à la station R3 entre 1991 et 1993.

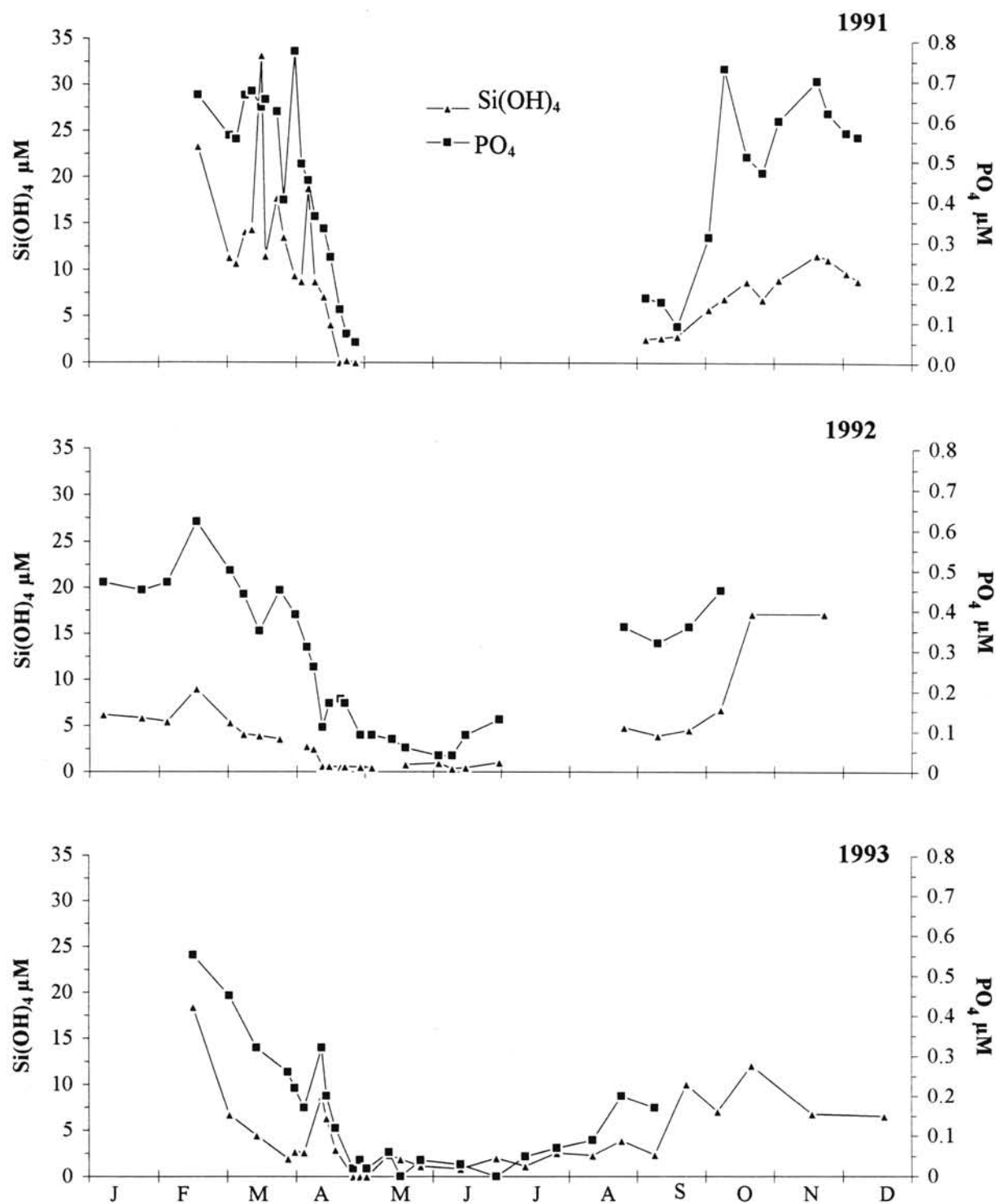


Fig. 29 : Evolution de la teneur en silicates et en phosphates dans les eaux de surface à la station R3 entre 1991 et 1993.

### 3.1.3. Paramètres chimiques

La transition typique entre la situation hivernale et la situation printanière est caractérisée par une brutale diminution de la concentration des sels nutritifs parallèlement à l'augmentation de tous les paramètres de production et de biomasse.

Les silicates (Fig. 29) passe de leur concentration hivernale ( $\approx 10-15 \mu\text{M}$ ) à une concentration inférieure à  $1 \mu\text{M}$  en une quinzaine de jours. D'après Guillard et al. (1973), une concentration de  $1 \mu\text{M}$  est considérée comme le seuil limitant la croissance des diatomées dans les eaux tempérées. Les silicates peuvent être donc considérés comme le premier sel nutritif potentiellement limitant en 1991, 1992 et 1993 dans les eaux de surface. La concentration se maintient sous  $1 \mu\text{M}$  jusque fin juin en 1992. Par contre en 1993, l'épuisement est bref (du 27 avril au 3 mai) et des valeurs de l'ordre de  $2 \mu\text{M}$  sont mesurées jusqu'à la fin de l'été.

Les phosphates (Fig. 29) ont un comportement comparable à celui des silicates : ils s'épuisent rapidement au cours du mois d'avril pour atteindre une valeur minimale (de l'ordre de  $0.05 \mu\text{M}$ ). Il est à noter que les valeurs mesurées en mai et juin 1992 sont supérieures à celles mesurées en 1993.

Si la teneur en nitrates (Fig. 22) tend également à diminuer à partir de début avril, elle reste avant tout très influencée par la variation des apports fluviaux. Les fortes crues d'avril 1993 portent ainsi la concentration à  $39.3 \mu\text{M}$  le 19 avril. Les teneurs relevées en mai 1992 et 1993 sont relativement élevées ( $\approx 5 \mu\text{M}$ ). Si les nitrates sont inférieurs à  $1 \mu\text{M}$ , il faut attendre début juillet en 1993. Puis, une concentration en nitrates inférieure à  $1 \mu\text{M}$  est observée du 4 au 10 juin 1992 et seulement début juillet en 1993 en raison de l'importance des apports fluviaux.

L'évolution de l'ammonium au cours du printemps (Fig. 22) est différente des trois autres sels nutritifs. Les apports d'ammonium en rade sont dus d'une part aux fleuves, mais aussi à la reminéralisation bactérienne et à l'excrétion des niveaux trophiques supérieurs. La concentration en ammonium varie par conséquent de façon aléatoire dans une gamme de  $0.3$  à  $0.8 \mu\text{M}$  de mars à avril tout en montrant une tendance à la baisse de mi-avril à début mai. Ce sel est épuisé seulement deux fois entre 1992 et 93 (le 5 mai 1992 et 30 avril 1993).

La concentration en urée (Fig. 30) dans les eaux de surface augmente régulièrement en avril 1993. Cette évolution, parallèle à celle des nitrates, est à relier aux apports fluviaux car, en accord avec Le Jehan (1982), les eaux fluviales sont riches en urée et peuvent constituer la source dominante de ce sel dans les estuaires en période hivernale et pré-printanière. Bien que Le Jehan (1982) observe des apports ponctuels d'urée provenant de rejets urbains, le pic d'urée observé le 27 mai semble plutôt être d'origine biologique (excrétion du zooplancton). Ensuite, les teneurs en urée augmentent légèrement de juillet à octobre ( $0.43$  à  $0.59 \mu\text{M}$ ) puis brutalement ( $> 1 \mu\text{M}$ ) dès la reprise des débits en novembre. En rade de Brest, les concentrations en urée sont comprises dans une gamme ( $0.2-1.2 \mu\text{M}$ ) comparable à celle mesurée dans d'autres écosystèmes :  $0.15-3.34 \mu\text{M}$  en baie de Seine (RNO, 1978),  $0.03-2 \mu\text{M}$

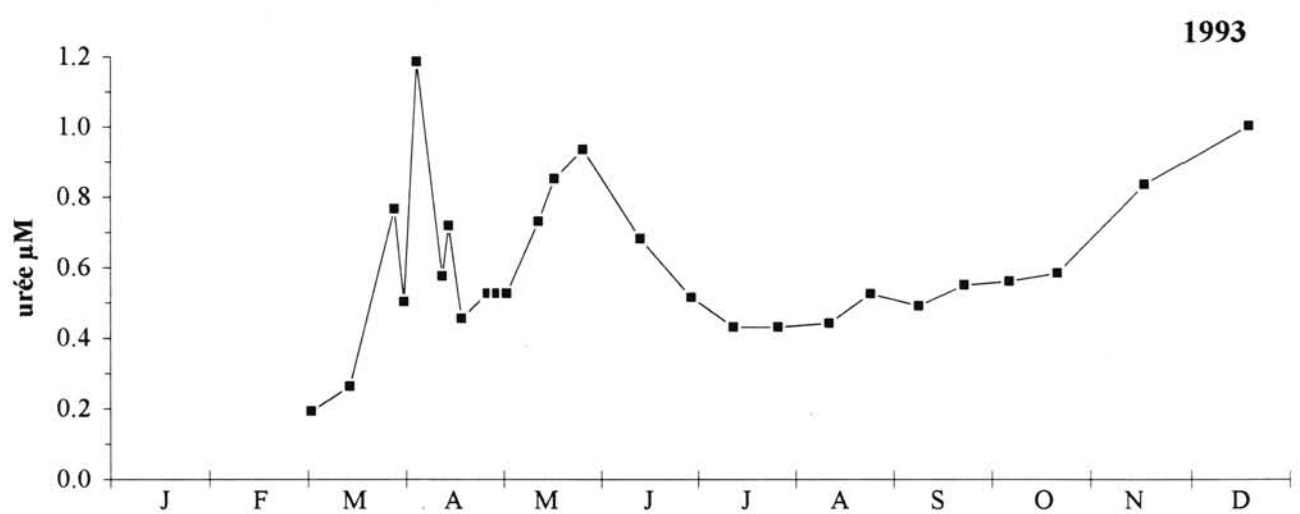


Fig. 30 : Evolution de l'urée dans les eaux de surface de la station R3 en 1993.



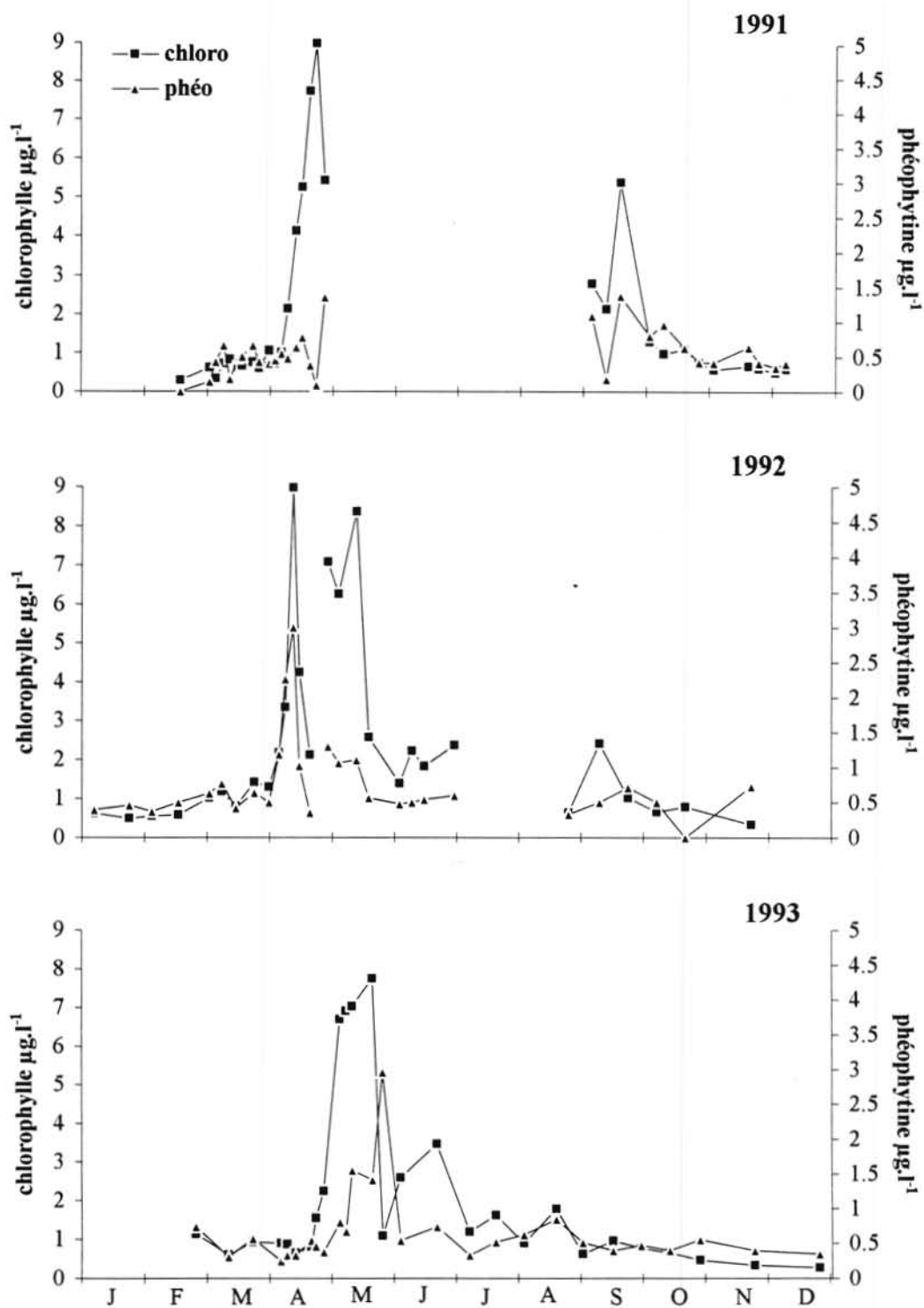


Fig. 31 : Evolution de la chlorophylle a et de la phéophytine dans les eaux de surface de la station R3 entre 1991 et 1993.

en Baie de Baffin (Harrison et al., 1985), 0.26-0.96  $\mu\text{M}$  dans le Kosterfjord (Pettersen, 1991), 0.04-0.21  $\mu\text{M}$  dans les eaux côtières de la Manche (L'Helguen et al., 1993).

### 3.1.4. Paramètres biologiques

#### 3.1.4.1. *Chlorophylle a et phéophytine*

La teneur en chlorophylle (Fig. 31) est très faible durant la période hivernale (environ 0.5  $\mu\text{g.l}^{-1}$ ) et est comparable à celle de la phéophytine. Puis, en avril, elle augmente brutalement pour atteindre un maximum d'environ 9  $\mu\text{g.l}^{-1}$  en 1991 et 1992, et de 6.5  $\mu\text{g.l}^{-1}$  en 1993. En 1991 et 1992, une chute brutale est observée tout de suite après ce premier pic. Par contre en 1993, la teneur en chlorophylle continue à augmenter pour atteindre 7.7  $\mu\text{g.l}^{-1}$  le 13 mai. Un second pic moins important (3.5  $\mu\text{g.l}^{-1}$ ) apparaît le 14 juin. Le scénario observé en 1992 est très différent car quatre pics ont été relevés : 9  $\mu\text{g.l}^{-1}$  le 13 avril, 7.1  $\mu\text{g.l}^{-1}$  le 30 avril, 8.4  $\mu\text{g.l}^{-1}$  le 14 mai et 2.2  $\mu\text{g.l}^{-1}$  le 10 juin. L'évolution de la phéophytine est quasiment parallèle à celle de la chlorophylle au cours du printemps.

L'étude menée en 1993 sur le fractionnement de taille (Fig. 32) a permis de montrer que la fraction microphytoplanctonique ( $> 10 \mu\text{m}$ ) représente en période de pré-bloom entre 41 et 59 % de la concentration totale en chlorophylle et jusqu'à 90-96 % au moment du maximum de développement phytoplanctonique. La principale caractéristique de la biomasse chlorophyllienne nanoplanctonique (2-10  $\mu\text{m}$ ) est le fait que sa croissance précède celle de la biomasse microphytoplanctonique. Mais, elle reste relativement faible durant toute la période d'étude (0.01-0.5  $\mu\text{g.l}^{-1}$ ). Il en est de même pour la phéophytine (0.08-0.25  $\mu\text{g.l}^{-1}$ ). Aucune réelle évolution de la biomasse chlorophyllienne picoplanctonique (0.6-2  $\mu\text{m}$ ) n'est observée au cours de l'année. Les faibles concentrations en pigments du nanoplancton et du picoplancton peuvent traduire l'existence d'un nombre important d'organismes hétérotrophes (nanoflagellés et picoflagellés hétérotrophes, bactéries) ; elles peuvent aussi être liées au fait que les cellules phytoplanctoniques de petite taille ont une teneur en chlorophylle *a* plus faible que les cellules de grande taille.

#### 3.1.4.3. *Carbone et azote organique particulaire*

Le carbone et l'azote organique particulaire (Fig. 33) présentent une évolution quasiment parallèle au cours de l'année. Leur comportement d'une année à l'autre montre quelques différences : leurs maxima sont en phase avec ceux de la chlorophylle (13 avril, 30 avril, 14 mai, 10 juin) en 1992 alors qu'en 1993, parmi les quatre pics principaux (15 avril, 30 avril, 13 mai, 14 juin), seuls les deux derniers correspondent à des maxima de chlorophylle, le premier étant antérieur au début de l'évolution printanière et le second apparaissant lors du plateau de chlorophylle.

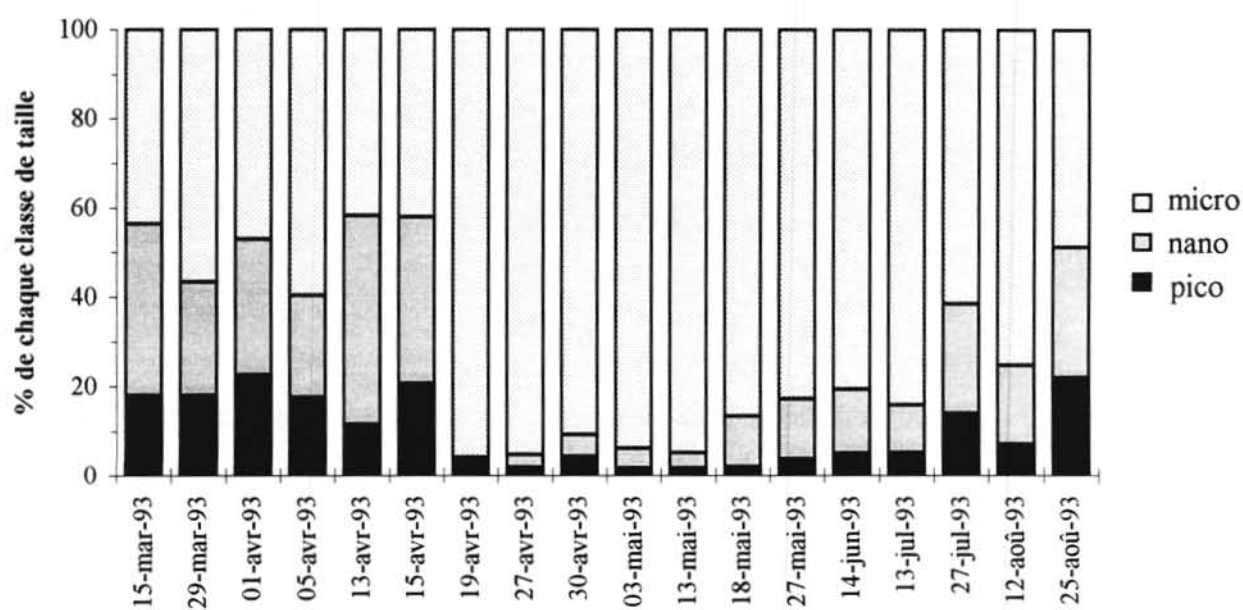


Fig. 32 : Evolution de la part de chaque classe de taille dans la concentration totale en chlorophylle dans les eaux de surface de la station R3 en 1993.

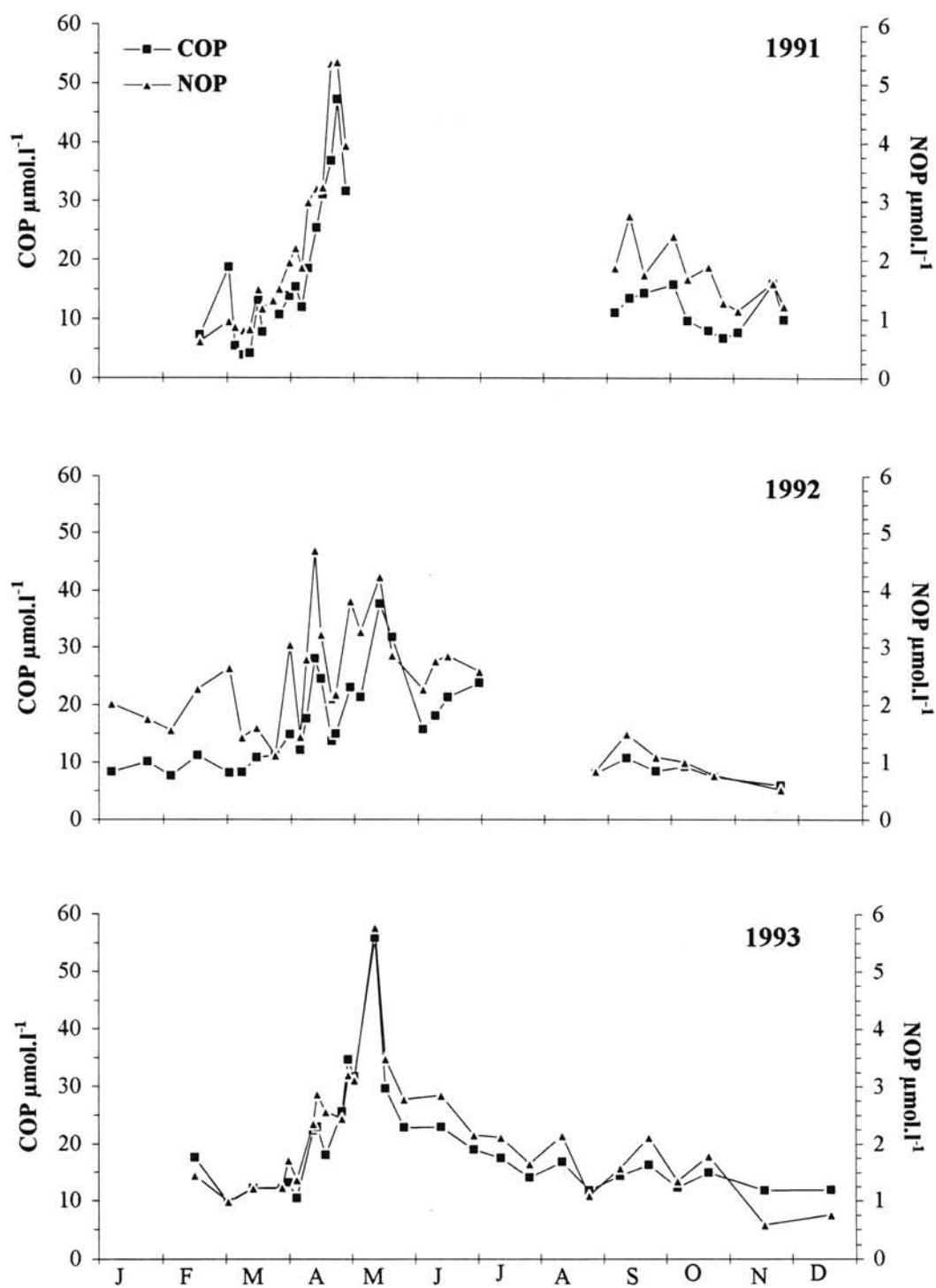


Fig. 33 : Evolution du COP et du NOP dans les eaux de surface de la station R3 entre 1991 et 1993.

L'azote et le carbone organique particulaire du compartiment microplanctonique ont une évolution comparable à celle du compartiment pélagique total. La contribution de ce compartiment (Fig. 34) est de 29 % du COP total et de 35 % du NOP total avant le bloom, respectivement de 60 % et de 55 % au cours du bloom (du 19 avril au 18 mai), puis jusque la fin de l'étude seulement de 45 % et de 40 % (et même 17 et 11 % le 26 août). La fraction nanoplanctonique représente la part la moins importante du COP et NOP total car elle représente au maximum respectivement 33 % et 40 %. Son évolution n'est pas en phase avec l'évolution du COP et NOP total. La fraction picoplanctonique représente plus de 40 % et 45 % du COP et NOP total avant le 13 avril (maximum de 59 % et 62 %). Sa contribution est ensuite de 30 % et de 35 % en moyenne au cours de l'efflorescence. Puis, à partir du mois de juin, la part du COP devient comparable à celle mesurée avant le bloom alors que celle du NOP reste semblable à celle mesurée pendant le bloom.

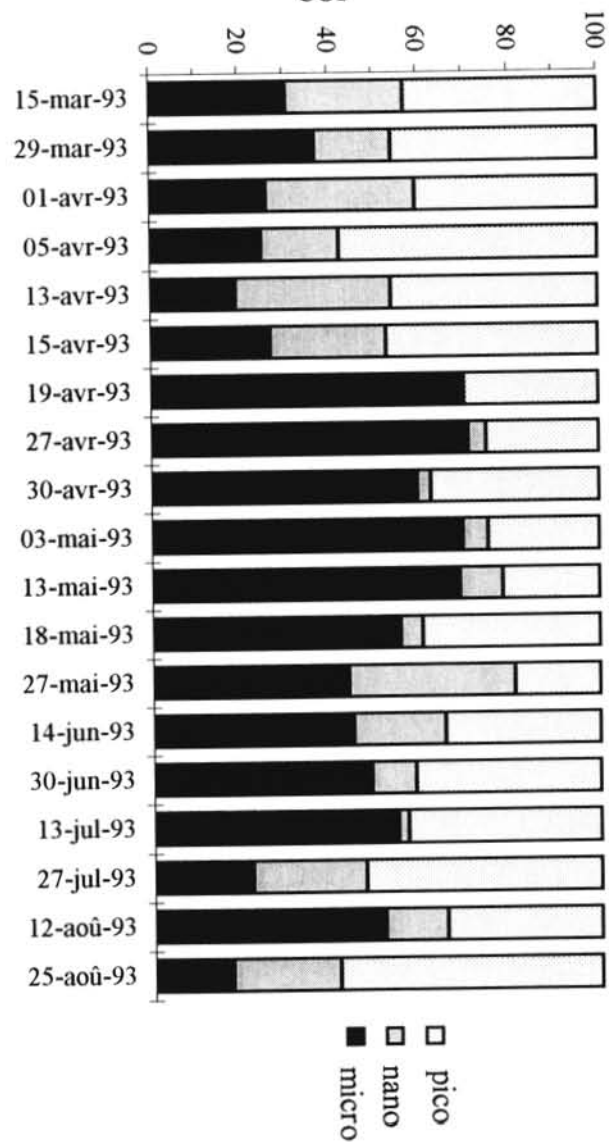
#### 3.1.4.3. Evolution des espèces phytoplanctoniques

*N.B : Les résultats concernant la détermination des espèces phytoplanctoniques ont été fournis par Yolanda Del Amo et Hervé Breton.*

Le nanoplancton, qui inclut des organismes autotrophes et hétérotrophes, est caractérisé par une relative stabilité ( $3.1 \cdot 10^5$  à  $1.0 \cdot 10^6$  cell.l<sup>-1</sup>) tout au long de l'année (Fig. 35). Il faut noter que le nanoplancton, et plus particulièrement les nanoflagellés, constitue l'essentiel de la biomasse en période hivernale, c'est à dire lorsque les conditions du milieu sont défavorables. Les variations saisonnières du microphytoplancton sont beaucoup plus marquées. La population microphytoplanctonique en période hivernale est très faible, puis augmente brutalement mi-avril pour atteindre des valeurs maximales fin avril. Le microzooplancton, limité à l'ensemble des ciliés, se développe au cours du mois de mars puis évolue sous forme de succession de pics (valeurs oscillants entre  $1.7 \cdot 10^3$  et  $1.3 \cdot 10^4$  cell.l<sup>-1</sup>) jusqu'à la fin du printemps.

Au cours du printemps, les blooms phytoplanctoniques se succèdent avec des changements dans la composition des espèces. Le microplancton est essentiellement constitué de diatomées et les maxima de chloro a correspondent aux développements successifs de différentes espèces. Ainsi, en 1992 (Del Amo, communication personnelle), le premier bloom est dominé par les nanoflagellés et les diatomées *Skeletonema costatum* et *Thalassiosira* sp.. Au cours du deuxième et du troisième bloom, on observe une transition entre *Thalassiosira* sp. et *Rhizosolenia fragilissima*. La fin du printemps est remarquable du point de vue du développement monospécifique de *Chaetoceros sociale* auquel est lié des concentrations en chlorophylle relativement faibles ( $< 2 \mu\text{g.l}^{-1}$ ), caractéristique de cette espèce phytoplanctonique (Quéguiner, 1982).

% de chaque classe de taille dans la teneur totale de  
COP



% de chaque classe de taille dans la teneur totale de  
NOP

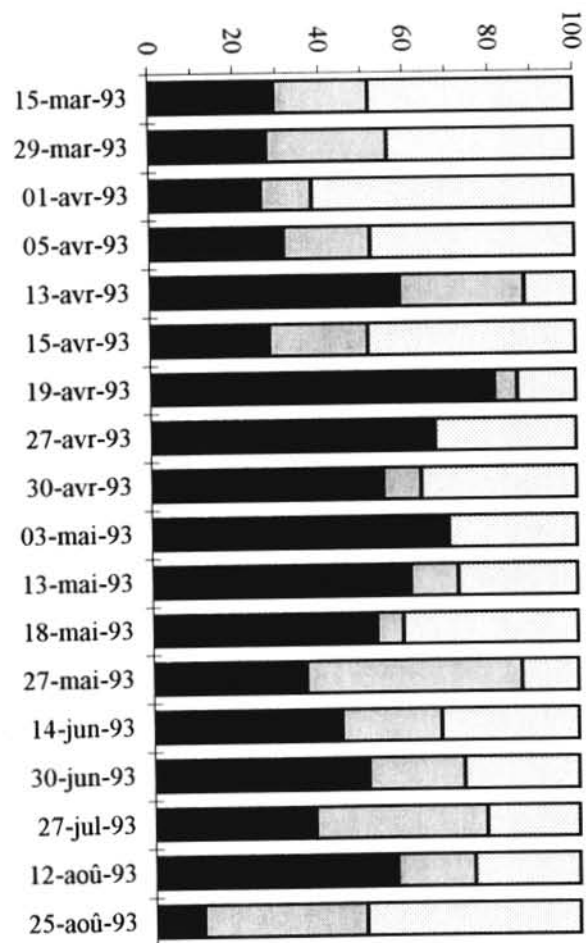


Fig. 34 : Evolution de la part de chaque classe de taille dans la teneur totale de COP et NOP dans les eaux de surface de la station R3 en 1993.

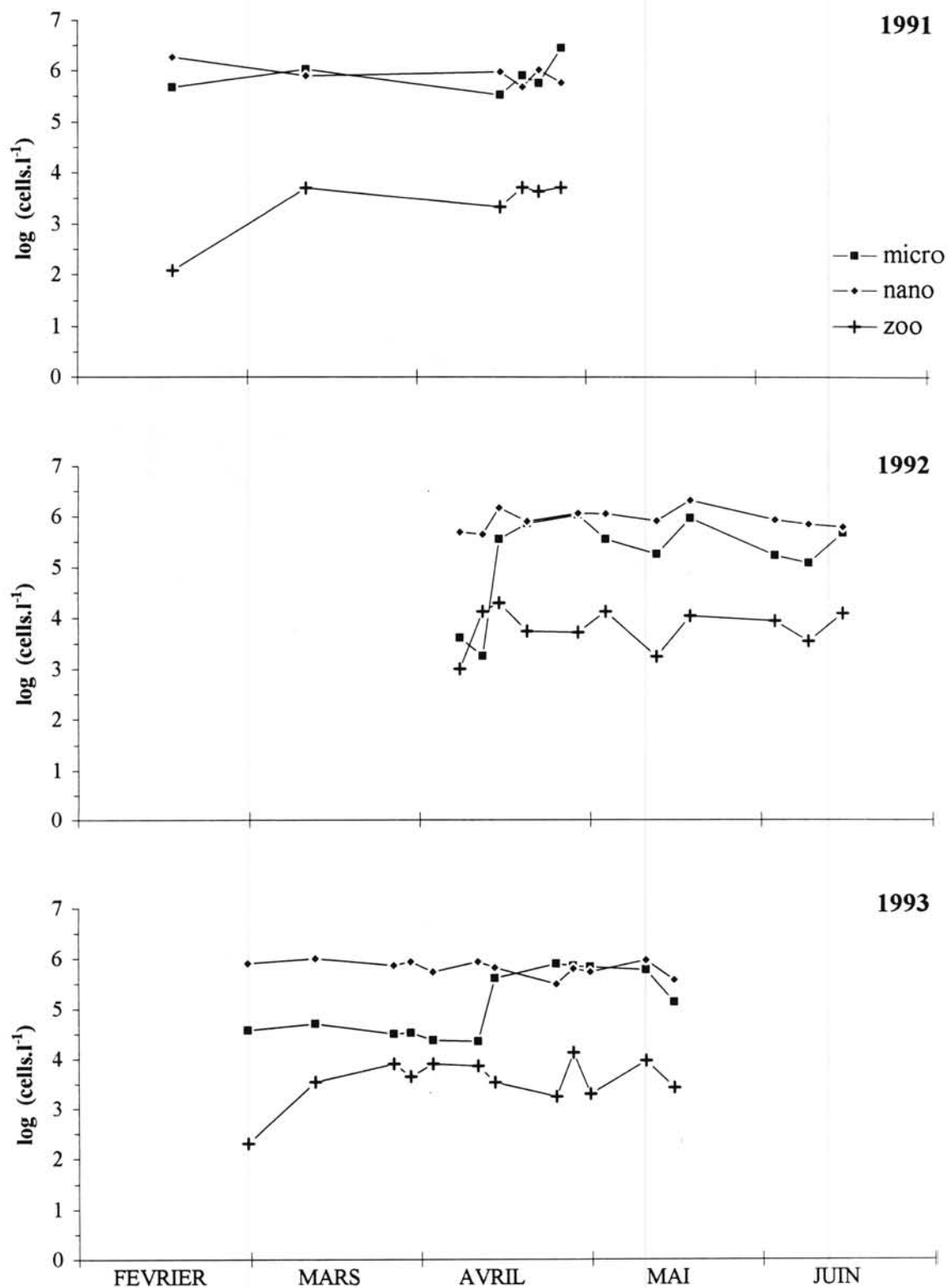


Fig. 35 : Evolution du microplancton, du nanoplancton et du zooplancton dans les eaux de surface de la station R3 entre 1991 et 1993.

En 1993, la succession des principales espèces peut également être décrite par trois périodes principales (Breton, 1993). La période précédant le bloom est dominée, comme en 1992, par les nanoflagellés et les diatomées *Skeletonema costatum* et *Thalassiosira fallax*. La période d'efflorescence est caractérisée par la transition entre *Thalassiosira* sp. et *Rhizosolenia delicatula* puis *Rhizosolenia fragilissima*. Cette période souligne la tendance à la monospécificité du bloom par le fait que *Thalassiosira fallax* a représenté jusqu'à 87 % des cellules microphytoplanctoniques le 19 avril. Au cours de la dernière période, l'espèce dominante ne représente plus que seulement 31 % du peuplement microphytoplanctonique. Cette période de forte diversité spécifique est surtout caractérisée par l'apparition de grands dinoflagellés tels que l'espèce toxique *Dinophysis* sp. précédée de *Prorocentrum micans*.

Les espèces nanoplanctoniques ne peuvent être décrites par la méthode d'analyse utilisée mais, à la vue de l'évolution des groupes majeurs, on peut distinguer l'existence d'une succession des espèces. Les cryptophycées majoritaires durant la période de pré bloom sont remplacés par les dinoflagellés pendant la période d'efflorescence. Cette transition correspond au maximum de concentration du microzooplancton. Puis, au moment de la chute des diatomées en 1993, un développement relativement important de *Phaeocystis pouchetii* se déclare allant jusqu'à atteindre  $1.4 \cdot 10^5$  cell.l<sup>-1</sup> le 18 mai.

## 3.2. La production primaire en rade de Brest

### 3.2.1. Evolution interannuelle des productions azotée et carbonée dans les eaux de surface de la rade de brest

*N.B. : Les mesures de production carbonée ont été effectuées en collaboration avec Olivier Ragueneau et Yolanda Del Amo.*

Les productions azotée et carbonée (Fig. 36) sont caractérisées durant la période printanière par une succession de maxima et de minima suivant un scénario qui a été totalement différent en 1991, 1992 et 1993.

#### 3.2.1.1. La production primaire en 1991

La méthode d'incubation utilisée en 1991 est différente de celle utilisée en 1992 et 1993. Les échantillons ont été incubés pendant 4 heures à 10°C sous une intensité lumineuse artificielle de  $70 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  au lieu d'être incubés "in situ simulé" pendant 24 heures comme en 1992 et 1993. Les résultats obtenus peuvent donc donner l'allure de l'évolution des productions azotées et carbonées mais ne peuvent être comparés quantitativement avec ceux des deux années suivantes.

Le déclenchement des productions azotée et carbonée s'opère dès le 11 avril. Les maxima de production sont relevés le 22 avril (en période de mortes eaux). La chute des productions relevée le 25 avril est à relier à l'épuisement des silicates dans le milieu. Une reprise de la



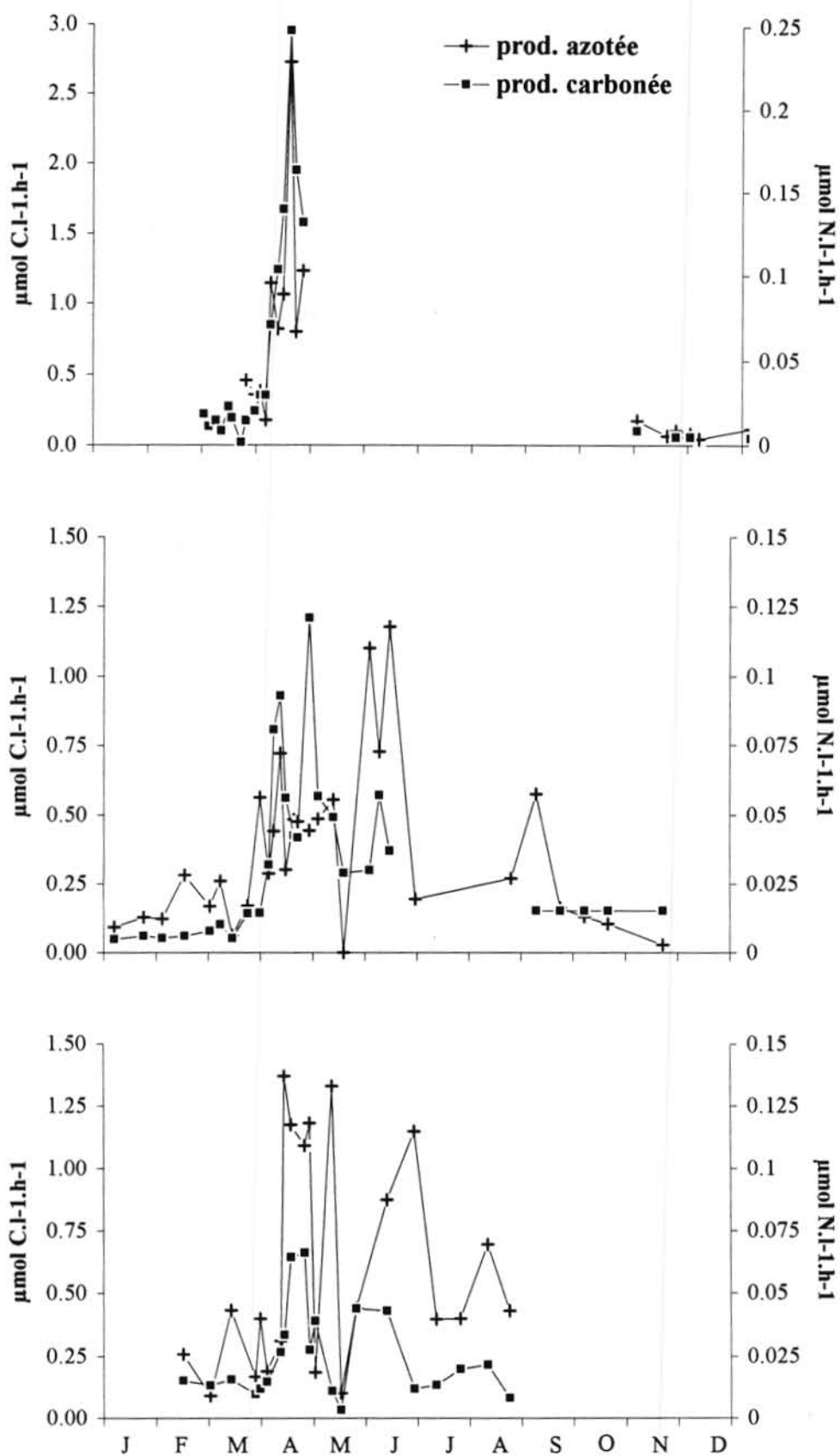


Fig. 36 : Evolution de la production azotée et de la production carbonée dans les eaux de surface de la station R3 entre 1991 et 1993.

production azotée est observée le 29 avril alors que la chute de la production carbonée continue. Les évolutions de la biomasse et des productions carbonée et azotée sont parallèles avec toutefois un décalage dans le temps des maxima (le 25 avril pour la biomasse). Le maximum de cellules microphytoplanctoniques (et de cellules vivantes totales) est également observé le 25 avril. Ce retard pourrait être causé par le broutage du phytoplancton par le zooplancton qui entraîne une diminution relative de la biomasse phytoplanctonique. *Thalassiosira sp.* domine le bloom du 18 au 25 avril, mais un changement de dominance semble s'opérer dès le 29 avril avec la présence de *Chaetoceros sp.*

### 3.2.1.2. La production primaire en 1992

En 1992, année relativement sèche, les variations de la production carbonée et de la biomasse sont en phase de début avril à fin juin. La progression de la production primaire est stoppée dès le 13 avril car le phytoplancton est alors essentiellement constitué de diatomées qui ne peuvent continuer à se développer lorsque les silicates sont épuisés dans le milieu (Ragueneau, 1994). Le fait que le mélange vertical de la colonne d'eau soit amplifié à ce moment (coefficient = 97 le 16 avril) contribue également à limiter la production primaire. Le déclenchement de la deuxième floraison le 30 avril est encore lié à la stabilité des eaux mais surtout à la régénération in-situ des silicates dans la colonne d'eau qui permet le soutien de la production carbonée jusqu'aux vives eaux suivantes (Ragueneau, 1994). La population phytoplanctonique est alors non plus dominée par *Thalassiosira* mais par *Rhizosolenia* qui semblent utiliser plus facilement les silicates régénérés. La dernière floraison du 10 juin est soutenue par un apport de silicates provenant du sédiment (Ragueneau, 1994). L'espèce phytoplanctonique principale est alors *Chaetoceros* qui possède la faculté de former des colonies, sous la forme d'une matrice gélatineuse, afin de couler pour atteindre des couches d'eau plus riches en sels nutritifs.

La production azotée est calquée sur l'évolution de la production carbonée et sur celle de la biomasse jusqu'au moment où les silicates sont épuisés dans le milieu (le 13 avril). Durant le reste du printemps 1992, elle est décalée et augmente lorsque la production carbonée décroît. Différents pics sont ainsi observés le 21 avril, le 5 mai, le 4 juin et le 16 juin. Il faut noter que le pic du 4 juin surgit lorsque le milieu est limité en nitrates ( $0.07 \mu\text{M}$ ) et lorsque la concentration en ammonium est assez élevée ( $0.76 \mu\text{M}$ ). Les valeurs mesurées en automne sont comparables à celles du pré bloom, sauf le 10 septembre où surgit un pic ( $0.487 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) d'une amplitude similaire à celui du 21 avril.

### 3.2.1.3. La production primaire en 1993

Le scénario observé en 1993 est totalement différent de celui de 1992. Les forts débits relevés en avril ont entraîné un indice de stratification très élevé. Les valeurs de production carbonée sont inférieures à celles mesurées en 1992 mais la période productive est plus

étendue. En raison des conditions météorologiques moins favorables, la première floraison commence seulement fin avril et, comme en 1992, en période de mortes eaux. La production primaire et la biomasse ont une évolution différente au cours de cette première floraison. Contrairement à 1992, les valeurs maximales ne sont plus observées lors d'une seule sortie mais sur plusieurs sorties successives. La production carbonée atteint son maximum (19 avril) avant la biomasse (27 avril). La chlorophylle maintient une teneur environ égale à  $7.7 \mu\text{g.l}^{-1}$  jusqu'au 13 mai alors que la production chute le 30 avril. Ceci semble être causé par la diminution de l'indice de stabilité (de 0.035 à 0.01). Mais la véritable chute de cette floraison intervient le 18 mai lorsque l'indice de stabilité retrouve une valeur semblable à celle mesurée au printemps 1992 ( $< 0.01$ ) et lorsque la concentration en nitrates devient inférieure à  $2 \mu\text{M}$ . Au cours des deux floraisons suivantes, la production carbonée et la biomasse évoluent parallèlement.

Le déclenchement des absorptions azotée et carbonée s'effectue au même moment (13 avril) mais la production azotée atteint une valeur maximale ( $0.1369 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$  le 15 avril) avant la production carbonée (19 avril). Les valeurs de production azotée sont élevées jusqu'au 30 avril alors que celles de la production carbonée chutent dès le 27 avril. La production azotée présente également deux valeurs maximales le 13 mai et le 30 juin à la suite des maxima de production carbonée du 3 mai et du 14 juin. Les chutes brutales observées le 18 mai et le 13 juillet semblent être causées par les faibles teneurs en nitrates mesurées à ce moment dans les eaux de surface (respectivement  $1.9 \mu\text{M}$  et  $0.7 \mu\text{M}$ ). Les valeurs de production azotée en 1993 sont en général plus élevées que celles mesurées en 1992.

### 3.2.2. Absorption de différentes formes d'azote dissous

#### 3.2.2.1. Evolution interannuelle

En fin de période hivernale, les absorptions de nitrates, d'ammonium et d'urée dans les eaux de surface de la rade de Brest sont faibles (de l'ordre de  $0.0040 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) et comparables entre elles (Fig. 37).

Durant les floraisons printanières de 1991, 1992 et 1993, l'absorption des nitrates représente toujours plus de 50 % de la production azotée totale (sauf le 4 juin 92). L'évolution de l'absorption azotée totale décrite au paragraphe précédent traduit donc surtout la contribution de l'absorption des nitrates.

La production basée sur l'ammonium n'augmente pas brusquement au début du printemps comme celle basée sur les nitrates. Un premier maximum ( $0.0175 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) est mesuré lors du déclenchement de la première floraison le 1<sup>er</sup> avril 1992. D'autres valeurs élevées sont observées lors de l'épuisement en nitrates dans le milieu le 20 mai, 4 juin et 10 juin 1992 (respectivement  $0.0245$ ,  $0.0533$  et  $0.0188 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). L'absorption de l'ammonium ne présente aucune évolution particulière en automne. Au cours du printemps 1993, les valeurs

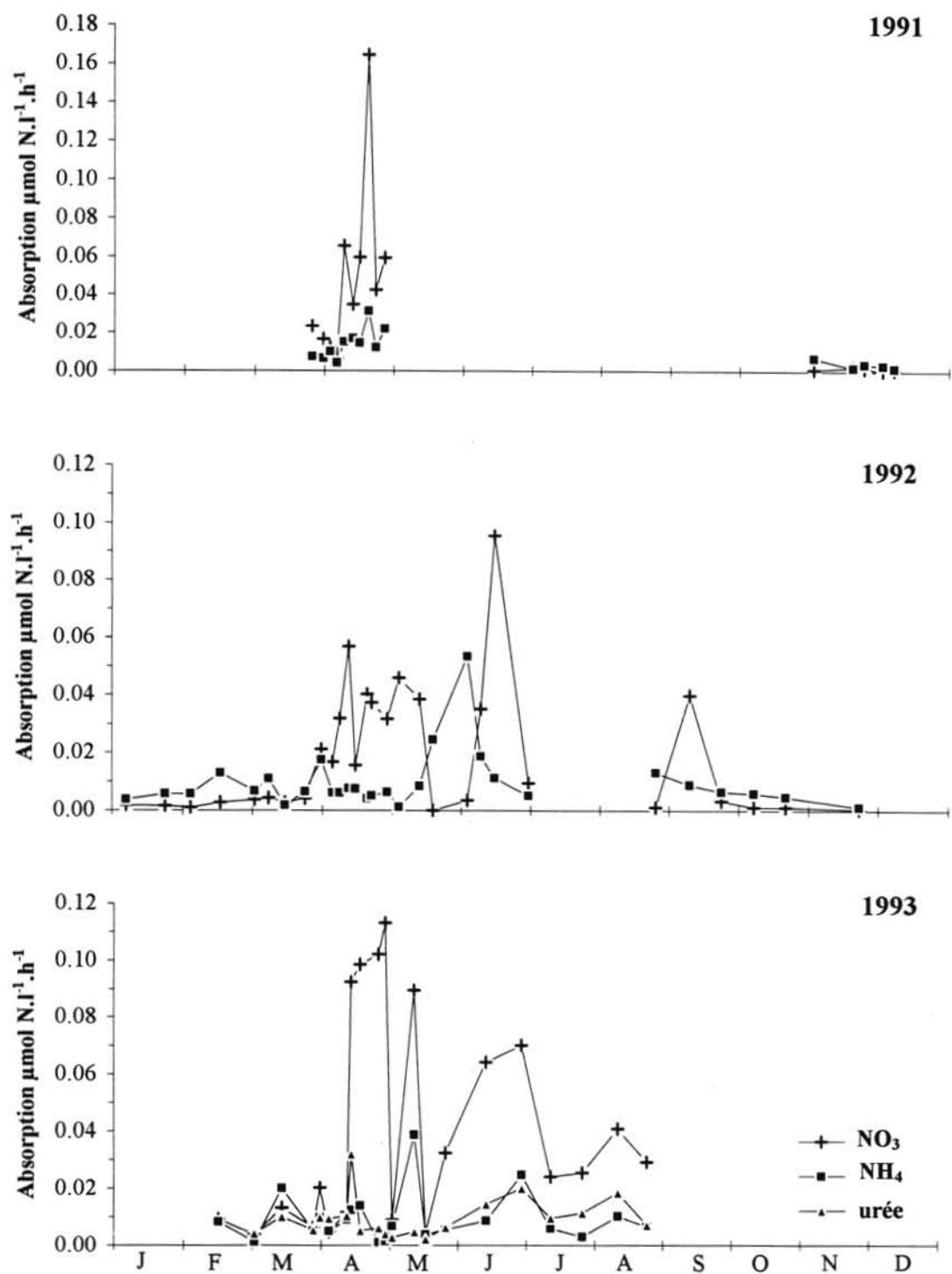


Fig. 37 : Evolution de l'absorption des nitrates, de l'ammonium et de l'urée dans les eaux de surface de la station R3 entre 1991 et 1993.

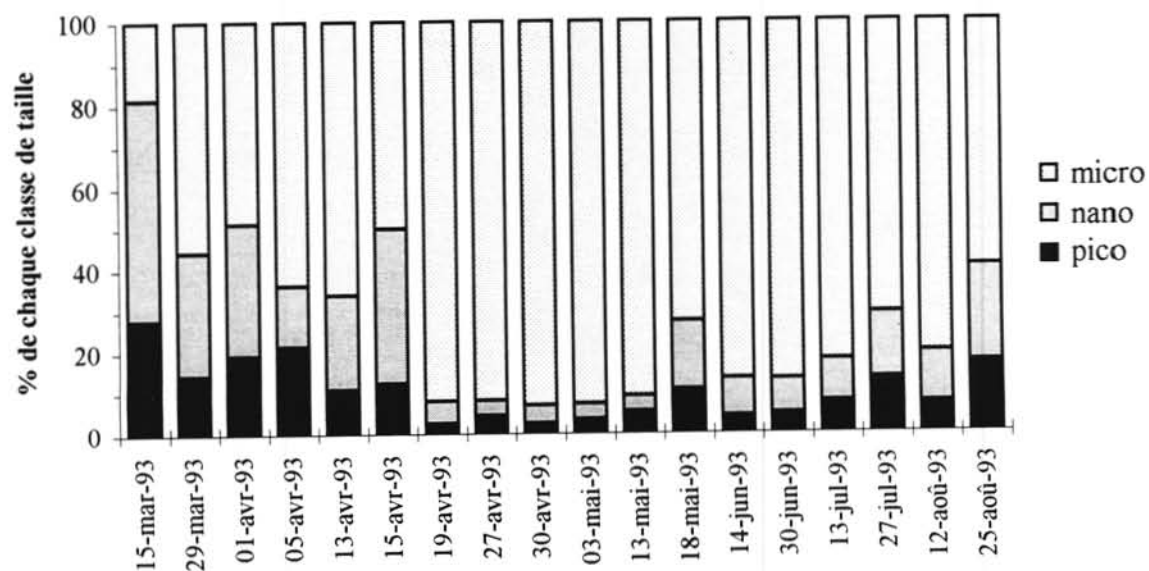


Fig. 38 : Evolution de la part de chaque classe de taille dans la production carbonée totale dans les eaux de surface de la station R3 en 1993.

DATE	PART DANS L'ABSORPTION AZOTEE TOTALE (%)			PART DANS LA CONCENTRATION TOTALE D'AZOTE DISSOUS (%)		
	NO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub>	Urée	NO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub>	Urée
3.03.93	41.3	12.1	46.6	97.3	2.1	0.6
15.03.93	30.4	46.5	23.1	94.5	4.4	1.2
29.03.93	37.5	31.0	31.5	88.7	4.7	6.6
1.04.93	50.5	24.7	24.8	89.6	6.5	3.9
5.04.93	24.9	25.5	49.6	86.0	3.8	10.1
13.04.93	37.5	28.9	33.5	97.2	1.4	1.4
15.04.93	67.6	9.1	23.4	95.9	1.3	2.8
19.04.93	83.8	11.8	4.4	91.9	4.6	3.5
27.04.93	93.5	0.9	5.6	97.6	0.4	2.0
30.04.93	95.7	1.1	3.3	96.6	0.3	3.1
3.05.93	48.9	35.7	15.4	87.2	5.1	7.7
13.05.93	67.3	29.2	3.5	81.2	9.5	9.3
18.05.93	42.9	36.4	20.7	61.3	11.3	27.5
27.05.93	73.2	12.4	14.4	79.9	4.9	15.2
14.06.93	73.6	9.9	16.6	87.2	3.4	9.4
30.06.93	61.0	21.6	17.4	60.4	24.1	15.5
13.07.93	60.7	15.0	24.3	50.7	16.6	32.7
27.07.93	64.2	7.3	28.6	94.6	0.7	4.8
12.08.93	58.9	14.6	26.5	74.9	10.9	14.2
25.08.93	68.4	15.0	16.6	71.3	12.4	16.4
<i>moyenne</i>	59.1	19.4	21.5	84.2	6.4	9.4

Tab. 4 : Part des différentes sources d'azote dissous dans la production azotée totale et dans la concentration totale d'azote dissous au cours du printemps 1993.

restent comparables à celles mesurées en hiver, à part le 13 mai où surgit un pic ( $0.0388 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) parallèle à celui de l'absorption des nitrates. Les absorptions d'ammonium et de nitrates évoluent ensuite de façon similaire jusqu'à la fin de l'été en augmentant régulièrement du 18 mai au 30 juin puis en chutant au cours de l'été.

Les mesures effectuées en 1993 dans les eaux de surface montrent que l'absorption de l'urée joue un rôle aussi important que celui de l'ammonium. Mis à part le pic mesuré lors du déclenchement du bloom ( $0.0320 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$  le 15 avril), l'absorption de l'urée varie peu au début du printemps et reste comprise dans une gamme comparable à celle rencontrée en hiver. Mais, dès le 18 mai, son évolution est similaire à celle de l'absorption de l'ammonium et des nitrates car un pic est observé le 30 avril ( $0.0200 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) ainsi qu'une chute des valeurs au cours de l'été.

#### *3.2.2.2. Part des différentes sources d'azote dissous*

De février à fin août, la forme azotée la plus absorbée est celle qui est en quantité la plus importante dans le milieu (Tab. 4), c'est à dire les nitrates. L'urée est à la fois en quantité légèrement plus importante dans le milieu et est légèrement plus absorbée que l'ammonium. Mais il faut tenir compte d'une grande variation saisonnière. Ainsi en période de pré-bloom, chaque forme est assimilée de façon comparable (30-40 % en moyenne) alors que les nitrates représentent plus de 95 % de l'azote dissous disponible. C'est au cours du déclenchement du bloom (13 avril-30 avril) que l'absorption azotée est principalement basée sur les nitrates (> 90 %). Si l'importance de l'absorption des nitrates chute entre le 3 et le 18 mai, celle de l'ammonium augmente considérablement (jusqu'à 35 %). Après le 18 mai, la part de l'absorption des nitrates reste comprise entre 60 et 70 % et celle de l'ammonium entre 10 et 20 %. La part de l'absorption de l'urée augmente régulièrement pour atteindre 25 % le 27 juillet. Ces résultats sont en accord avec ceux mesurés dans d'autres zones côtières riches en nitrates (McCarthy et al. 1977, Krinstiansen 1983, Probyn 1985, Harrison et al. 1985, L'Helguen 1993) où l'urée représente de 10 à 30 % de l'absorption azotée totale.

#### *3.2.3. Absorption de l'azote inorganique dissous et du carbone par les différentes classes de taille de phytoplancton au printemps 1993*

##### *3.2.3.1. Absorption du carbone par les différentes classes de phytoplancton*

En période de pré-bloom, le microphytoplancton assure 45 % de la production carbonée totale (Fig. 38). Mais, pendant le bloom d'avril, sa part représente 96 % de la production totale. Au cours des floraisons de juin et d'août, elle est respectivement de 86 % et de 80 %. L'importance du nanoplancton est plus faible que celle du microplancton dans la production carbonée totale mais elle représente une part non négligeable de la production totale en période de pré-bloom (en moyenne 25 %). Sa contribution reste ensuite inférieure à 5 % jusque mi-

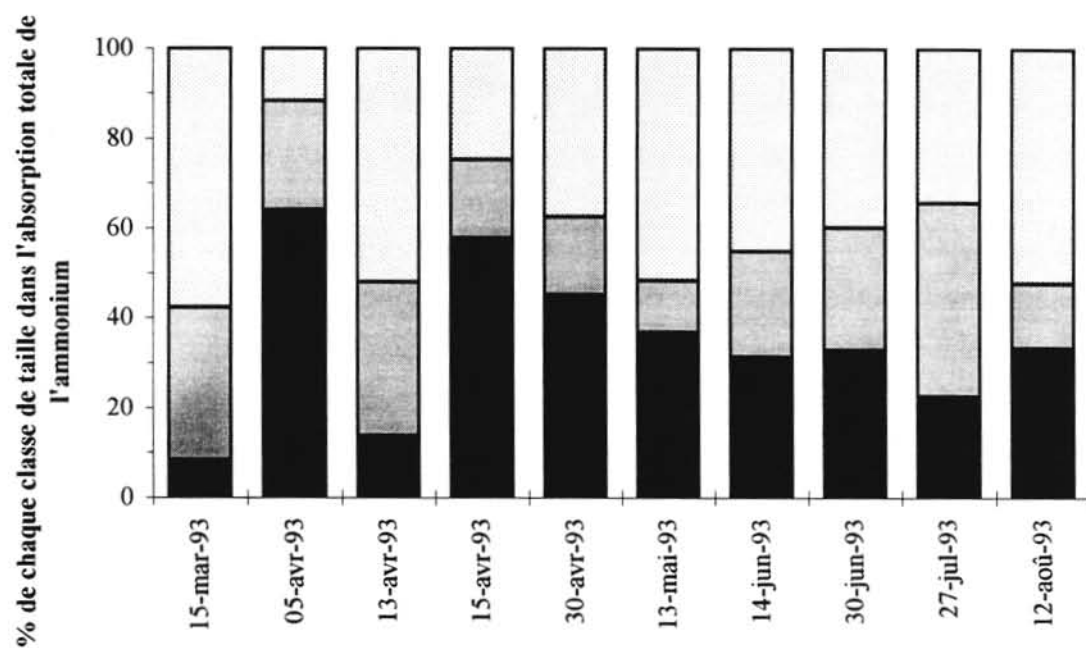
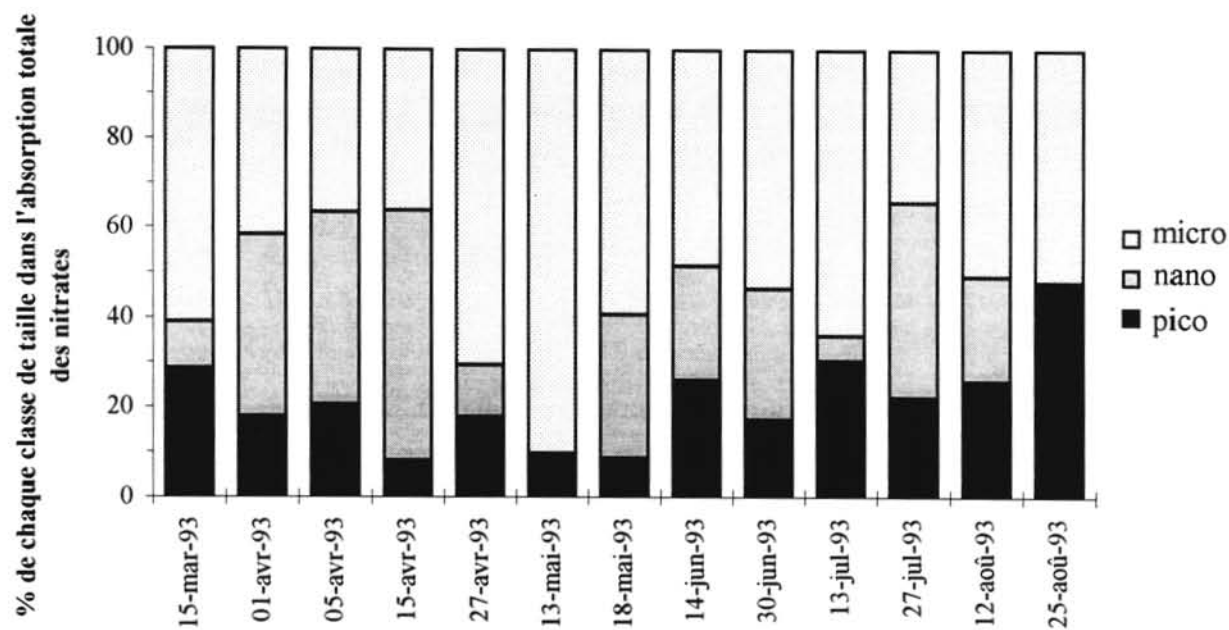


Fig. 39 : Evolution de la part de chaque classe de taille dans (a) l'absorption des nitrates et (b) dans l'absorption de l'ammonium dans les eaux de surface de la station R3 en 1993.



mai, puis inférieure à 10 % jusqu'à la fin de l'été. Cette chute au moment du bloom est sans doute liée à la part de plus en plus importante prise par les dinoflagellés et semble indiquer que la population phytoplanctonique est majoritairement hétérotrophe. La fraction picoplanctonique représente la part la moins importante de la production carbonée totale. Sa contribution maximale (27 %) se situe en période peu productive et confirme l'importance des bactéries dans cette fraction.

### 3.2.3.2. Absorption de l'azote inorganique dissous par les différentes classes de taille du phytoplancton

C'est le microphytoplancton qui consomme en moyenne à la fois le plus de nitrates (56.6 %) et d'ammonium (40.6 %). Si l'absorption de nitrates par le nanoplancton et le picoplancton sont comparables (respectivement 24.7 et 21.4 %), l'absorption de l'ammonium par le picoplancton est supérieure à celle du nanoplancton (34.7 et 24.7 %).

L'évolution saisonnière de l'absorption des nitrates (Fig. 39a) semble coïncider avec le changement d'espèces phytoplanctoniques. A la fin de la période hivernale, le milieu est dominé à 70 % par les diatomées *Skeletonema costatum* (espèce comprise dans le microplancton) et la part du microplancton dans l'absorption des nitrates est de 60 %. Mais, lors du déclenchement du bloom, l'espèce phytoplanctonique principale devient *Thalassiosira fallax* et l'absorption des nitrates par le microphytoplancton ne représente alors plus que 40 % du total. Ensuite, au moment du maximum de la production azotée (du 27 avril au 13 mai), *Thalassiosira* est remplacée par *Chaetoceros* puis par *Rhizosolenia cf. Fragillissima*. Ce changement d'espèce coïncide avec une augmentation de la part de l'absorption des nitrates par le microplancton (90 %). Cette part reste supérieure à 50 % au cours de l'été. La part de l'absorption des nitrates par le nanoplancton fluctue entre 56 et 0.3 % au cours du printemps. Celle du picoplancton présente une évolution plus régulière car elle est caractérisée par une tendance à la baisse entre le début du bloom et la mi-mai (de 28.5 % à 8 %) puis par une augmentation progressive jusqu'à fin août (47 %). Lorsque l'abondance des diatomées dans le milieu est maximale (période de bloom), l'absorption des nitrates est principalement supportée par le microplancton alors qu'en période de pré-bloom et en été, c'est l'ensemble nano et picoplancton qui domine.

C'est successivement le microplancton et le picoplancton qui absorbent le plus d'ammonium entre début mars et le 18 mai (Fig. 39b). L'importance de l'absorption de ces deux classes de taille à cette période varie brutalement entre 8.2 et 64 %. La part de la fraction microplanctonique est toujours la plus élevée (de 52 à 34 %) suivie de celle de la fraction picoplanctonique et de celle de la fraction nanoplanctonique (de 37 à 23 %). Mais globalement, l'absorption de l'ammonium en rade de Brest durant toute la période printanière est principalement dominée par l'ensemble nano et picoplancton. Ces résultats sont en accord avec ceux de Probyn (1985), Koike et al. (1986), Sahlsten et al. (1988).

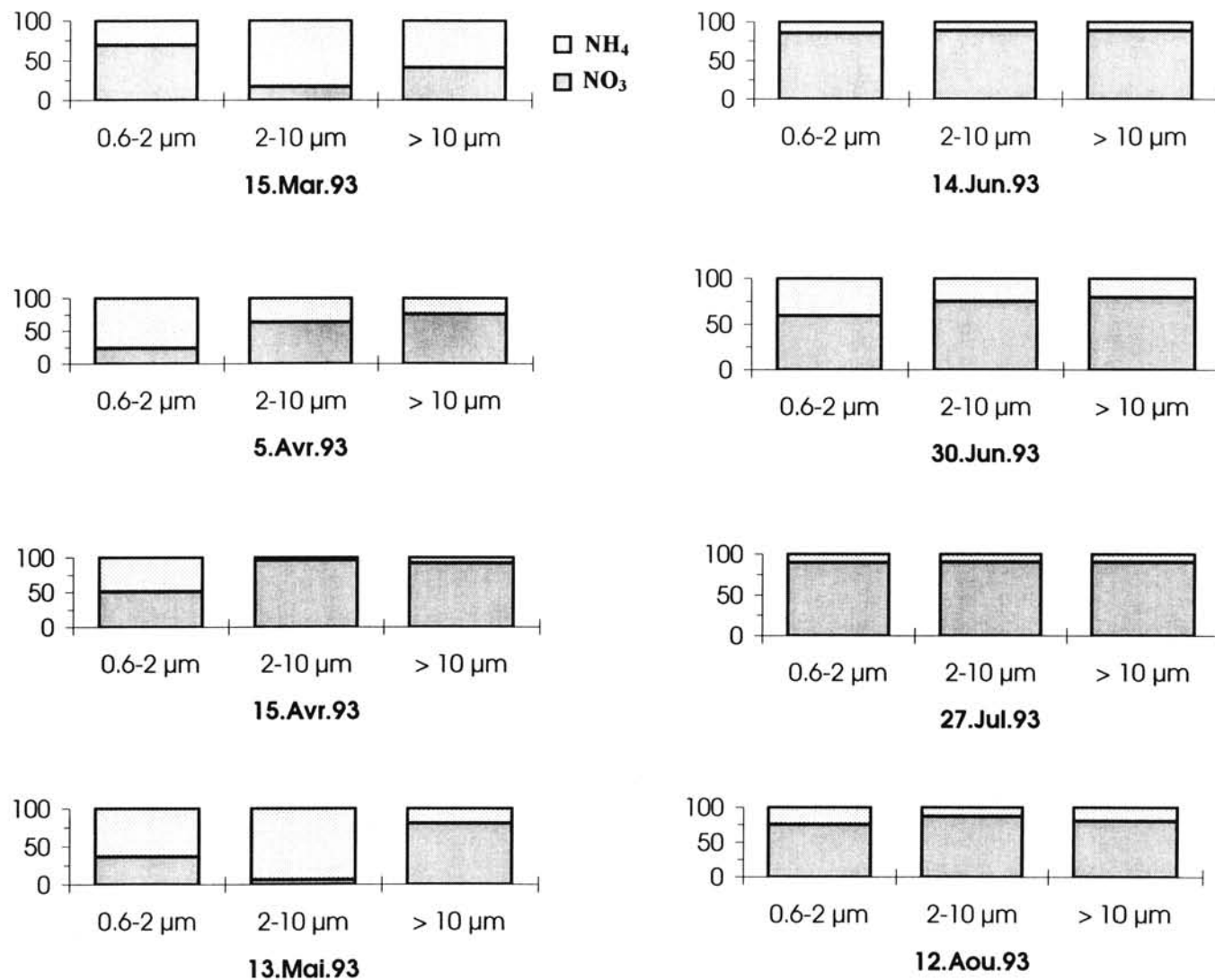


Fig. 40 : Evolution de la part de l'absorption des nitrates et de l'ammonium au sein de chaque classe de taille dans les eaux de surface à la station R3 en 1993.

### 3.2.3.3. *Part de l'absorption de l'azote inorganique dissous au sein de chaque classe de taille*

L'absorption des nitrates est supérieure à celle de l'ammonium au sein de chaque classe de taille au cours du printemps 93 (Fig. 40) : elle représente  $61.34 \pm 21.84$  de l'absorption de NID du picoplancton,  $65.33 \pm 32.72$  de celle du nanoplancton et  $78.24 \pm 15.17$  de celle du microplancton. Mais il faut tenir compte de variations saisonnières plus ou moins marquées. La part de l'absorption des nitrates dans la fraction microphytoplanctonique passe ainsi de 40.9 % en début de bloom à 91.6 % le 15 avril, puis stagne entre 80 et 90 % jusqu'à la fin de l'été. Son importance dans la fraction nanoplanctonique augmente également entre le début du printemps et le 15 avril (de 16.8 % à 95.9 %) mais elle chute brutalement le 13 mai puis reste comprise entre 75 et 90 %. L'importance de l'absorption des nitrates est plus variable dans la fraction picoplanctonique. Ainsi entre mi-mars et mi-mai, elle est successivement supérieure et inférieure à 50 %, et reste comprise de juin à août entre 60 et 90 %.

### 3.2.4. Absorption de l'azote inorganique dissous dans la colonne d'eau

L'absorption de l'ammonium est généralement uniforme dans la colonne d'eau (Fig. 41) : le coefficient de variation (écart-type sur la moyenne) entre l'absorption mesurée aux différentes profondeurs est en moyenne de 30 % au cours du printemps. Mais, lorsque des valeurs maximales sont enregistrées en surface (13 mai et 30 juin), aucune répercussion ne se produit aux autres profondeurs. L'allure du profil du 18 mai est assez remarquable : c'est la seule sortie qui présente une absorption croissante de la surface vers le fond parallèlement à l'évolution de la concentration en ammonium.

La distribution de l'absorption des nitrates dans la colonne d'eau est totalement différente de celle de l'ammonium. Au moment du bloom, l'absorption des nitrates est maximale en surface, chute brutalement de plus de moitié au niveau des 25 % de lumière incidente et atteint une valeur minimale au fond (inférieure à l'absorption des nitrates en surface en période hivernale). Mais, il faut noter que les profils du 3 mai et du 18 mai, qui correspondent aux sorties suivant les pics du 30 avril et du 13 mai, présentent des absorptions de nitrates plus élevées à 25 % qu'en surface et aux autres profondeurs. Après ce bloom, l'absorption de nitrates la plus importante est mesurée au seuil (100% ou 25%, et même 10 % le 13 juillet) possédant la concentration de nitrates la plus élevée. Si l'absorption des nitrates est toujours largement supérieure à celle de l'ammonium jusqu'à 10 % de lumière incidente, elle est comparable à 1 % et même inférieure au fond.

L'allure de la distribution de la production carbonée dans la colonne d'eau est beaucoup plus régulière que celle des nitrates. Les valeurs d'absorption carbonée sont en effet directement corrélées au pourcentage de lumière incidente, et ceci à chaque sortie, quelque soient les

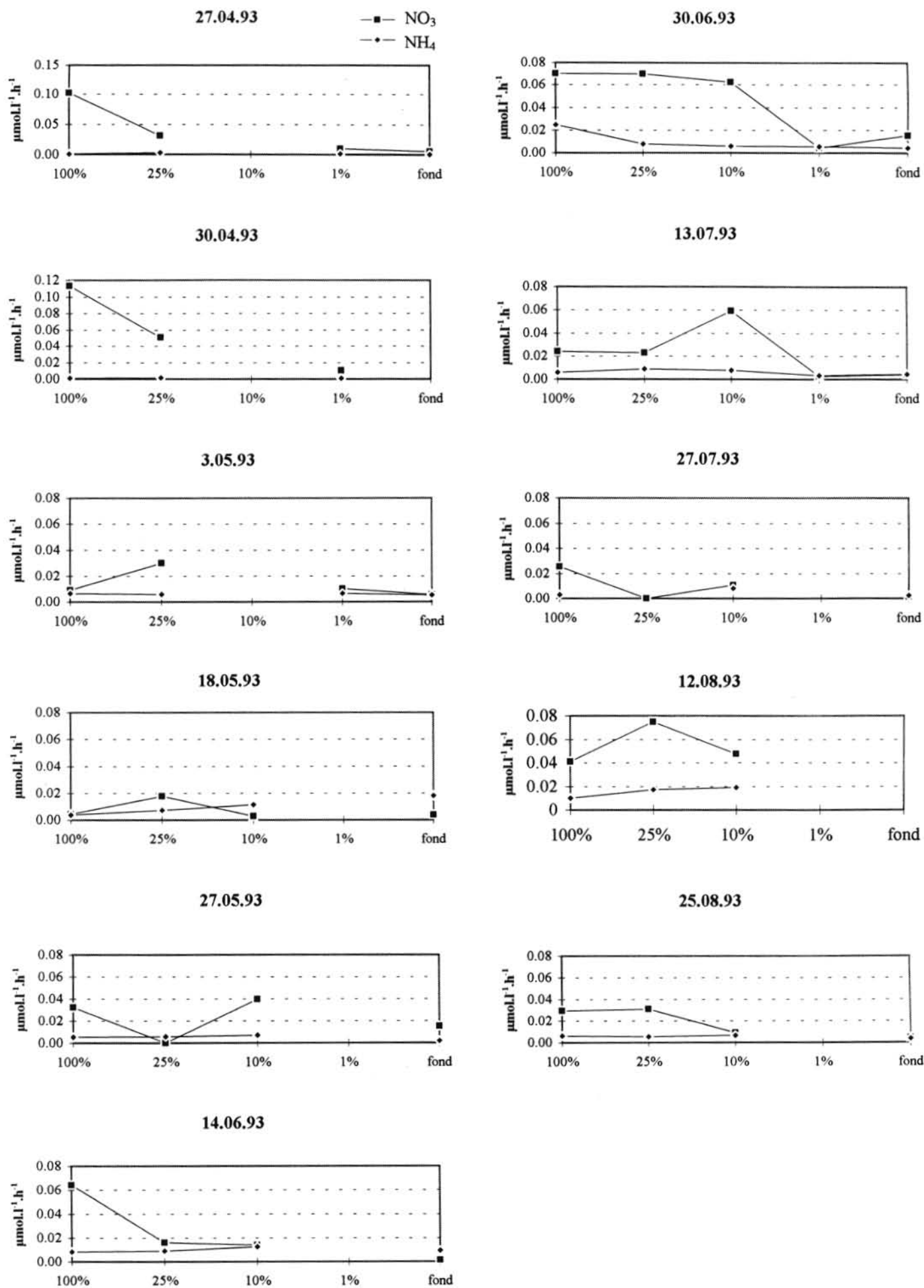


Fig. 41 : Evolution de l'absorption des nitrates et de l'ammonium dans la colonne d'eau à la station R3 en 1993.

conditions du milieu. La corrélation moyenne entre l'absorption carbonée et la profondeur de la mesure au cours de tout le printemps est de  $r^2 = 0.75$ .

### 3.3. Discussion

#### 3.3.1. Déclenchement de la floraison printanière

La productivité des écosystèmes marins dépend essentiellement de trois flux : le flux d'énergie solaire, le flux des sels nutritifs et le flux d'énergie auxiliaire. La période hivernale (décembre à mi-mars) en rade de Brest est caractérisée par d'importants apports d'eau douce et par un brassage important de la colonne d'eau sous l'effet des vents : l'énergie auxiliaire apportée au système est maximale mais le flux d'énergie solaire limite la productivité. Ceci se traduit par des teneurs élevées en sels nutritifs, une production primaire ralentie et une faible biomasse. En accord avec Quéguiner et Tréguer (1984), le bloom se déclenche en 1991, 1992 et 1993 début avril dès que la lumière incidente est suffisante (environ  $1000 \text{ J cm}^{-2} \text{ j}^{-1}$ ) et que la température de l'eau franchit le seuil des  $10^\circ\text{C}$ . Mais, l'énergie auxiliaire du système, définie comme une énergie non utilisée directement par les organismes vivants mais susceptible d'accroître l'efficacité de la production phytoplanctonique (Odum, 1976), joue également un rôle prépondérant dans ce phénomène (Ragueneau, 1994). En effet, si les apports fluviaux favorisent le déclenchement de la floraison printanière en induisant une fertilisation élevée et une stratification verticale, ils ont également pour conséquence d'élever la turbidité. Le rôle prépondérant de la lumière dans le déclenchement du bloom printanier implique que ce phénomène se déroule lorsque la pénétration de la lumière dans la colonne d'eau est maximale, c'est à dire en période de mortes eaux lorsque le mélange vertical de la colonne d'eau est minimal.

#### 3.3.2. Absorption azotée et disponibilité des sels azotés dissous

##### 3.3.2.1. Evolution temporelle

L'absorption azotée dans les eaux de surface de la rade de Brest montre de larges variations temporelles et est caractérisée par des maxima se succédant d'avril à juillet. Les valeurs de ces maxima obtenus dans les eaux de surface sont comparables à ceux de Pennock (1987) dans l'estuaire de Delaware, Harrison (1983) dans la baie de Delaware ainsi que celles de Fisher et al. (1982), Glibert et al. (1982), Paasche et Kristiansen (1982), Furnas (1983). Durant toute la période printanière, l'absorption azotée du phytoplancton est principalement basée sur les nitrates (68 % de la production azotée totale). L'influence de l'assimilation des nitrates par le phytoplancton sur la distribution de ce sel dans les eaux de surface est mise en évidence par une évolution non conservative des nitrates par rapport à la salinité dans les deux estuaires de l'Aulne et de l'Elorn en période printanière (Delmas, 1981). Pourtant, lors du déclenchement du

bloom, l'influence de la production azotée sur la distribution des sels azotés en rade reste très limitée. En effet, si la teneur en nitrates montre une tendance à la baisse en relation avec l'augmentation de la production primaire, elle est avant tout très sensible aux éventuelles augmentations des débits fluviaux, particulièrement dans les eaux de surface. De ce fait, les coefficients de corrélation entre la concentration d'une forme azotée et son absorption sont inférieurs à 0.3 en avril au cours des trois années de suivi. La disponibilité en nitrates dans le milieu est telle que la constante de demi-saturation, de l'ordre de  $1 \mu\text{M}$  dans les systèmes eutrophes (McIsaac et al. 1969, Collos et Slawyk 1980), est atteinte seulement 5 fois entre 1992 et 1993. Cette limitation de la production azotée intervient à la fin de la période printanière lorsque les débits fluviaux atteignent des valeurs minimales. En 1992, l'absorption des nitrates est stoppée lorsque la concentration en nitrates est proche du seuil de limite de détection ( $0.07 \mu\text{M}$  pour une vitesse de  $0.0003 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$  le 4 juin). La valeur minimale d'absorption de nitrates en 1993 ( $0.0043 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) est observée le 18 mai lorsque la teneur en nitrates est de  $1.9 \mu\text{M}$ . Il semble que cette faible valeur soit à relier au fait que la production primaire soit également à ce moment limitée en phosphates ( $\approx 0 \mu\text{M}$ ). La concentration de  $0.7 \mu\text{M}$  observée le 13 juillet ne provoque pas de limitation drastique de la production basée sur les nitrates car elle est semblable à la valeur enregistrée le 27 juillet lorsque les nitrates sont remontés à  $8.6 \mu\text{M}$ .

### 3.3.2.2. *Distribution verticale*

En accord avec les résultats de Anderson et Roels (1981), la majeure partie de l'absorption azotée se situe entre la surface et les 25% de lumière incidente. Ce phénomène est provoqué par l'importance de l'absorption basée sur les nitrates dans cette couche d'eau (entre 9 % et 39 % de l'absorption azotée totale de la colonne d'eau). Les nitrates sont en effet plus difficilement assimilés dans l'obscurité que l'ammonium (McIsaac et al. 1974, Conway et Whitley 1979, Nelson et Conway 1979, Price et al. 1985) car leur réduction au sein de la cellule nécessite une certaine énergie. L'absorption de l'ammonium est mieux répartie sur l'ensemble de la colonne d'eau. Elle représente entre la surface et les 25 % de lumière incidente seulement entre 3.5 et 7.9 % de la production azotée intégrée.

Contrairement aux résultats de Le Bouteiller (1986) en milieu océanique, l'absorption des nitrates n'est pas parallèle à celle de la production carbonée. La production carbonée dans la colonne d'eau est en effet directement reliée au pourcentage de lumière ambiante alors que, si l'influence de la lumière se ressent sur la production azotée, elle ne semble pas être le seul facteur limitant l'absorption des nitrates dans la colonne d'eau. En effet, une concentration en nitrates proche du  $K_s$  ( $1 \mu\text{M}$ ) dans les eaux de surface et inférieure à celle mesurée à 25 % provoque en surface une absorption de nitrates inférieure à celle observée à 25 % (le 13 mai, 18 mai, 12 août et 25 août). D'où, bien que le milieu ne soit pratiquement jamais pauvre en



nitrates, le fait d'approcher le  $K_s$  ne stoppe pas complètement l'absorption des nitrates mais la limite d'une façon plus importante que la diminution de lumière incidente.

### 3.3.3. Déphasage de la production azotée avec la biomasse et la production carbonée

Au cours des trois années d'étude, un déphasage entre la production azotée et les facteurs de biomasse (chlorophylle et matière organique particulaire) a été généralement observé pendant la période de floraison printanière (cf. Fig. 31, 33, 36). L'explication apportée au retard des maxima de biomasse par rapport à ceux de production est généralement le broutage du phytoplancton par le zooplancton qui entraîne une diminution relative de la biomasse phytoplanctonique. Mais cette explication ne peut être valable après le premier pic de la floraison printanière car, si l'évolution de la production azotée est décalée par rapport à la biomasse, ce n'est pas le cas de l'évolution de la production carbonée qui reste quasiment calquée sur celle de la biomasse. Ce phénomène semble donc être plutôt provoqué par une production d'azote organique particulaire non simultanée (inhibition de la nitrate réductase et formation de pool intracellulaire) ou par l'intervention d'hétérotrophes.

#### 3.3.3.1. Hypothèse du pool intracellulaire

En hiver, le nanoplancton constitue l'essentiel de la biomasse phytoplanctonique et les absorptions de nitrates, d'ammonium et d'urée sont d'égale importance dans l'absorption azotée totale. Mais, dès le déclenchement du bloom, parallèlement à l'augmentation du nombre de cellules microphytoplanctoniques, l'absorption azotée totale est dominée à 68 % par l'absorption des nitrates. Les mesures effectuées sur l'absorption azotée des différentes classes de taille du phytoplancton mettent en évidence la prédominance du microplancton, majoritairement constitué de diatomées, dans l'absorption totale des nitrates. Le fait que la photosynthèse du microplancton ( $> 20 \mu\text{m}$ ) soit principalement basée sur la production dite "nouvelle" (c'est à dire sur l'absorption des nitrates, Dugdale et Goering 1967) a été tout d'abord suggéré de façon indirecte par Malone (1980). Son hypothèse était basée sur le fait que le microplancton possède, d'une part un taux de croissance élevé, et d'autre part, des capacités de stockage importantes, spécialement lorsque la concentration en nitrates dans le milieu ambiant est élevée. Cette idée de stockage de sels nutritifs au sein de réservoirs intracellulaires contrôlant le taux de croissance a été émise par Droop (1973). En effet, l'absorption des nitrates par une cellule algale nécessite un grand nombre d'étapes de réduction avant incorporation dans les chaînes carbonées. Cette absorption est assez facile à mesurer mais elle est parfois difficile à interpréter en terme de croissance (Droop, 1968). Ainsi, l'accumulation d'azote dissous à plusieurs niveaux au cours du processus d'assimilation, et notamment sous forme de nitrates, entraîne des phénomènes de décalage temporels dans le processus de croissance du phytoplancton. Les données de Raven (1980), Collos (1982) et Dortch (1982)

ont montré le bien-fondé de cette hypothèse. En plus de l'influence sur la relation absorption-croissance, ce réservoir peut également constituer un important moyen de stockage et tenir un rôle majeur dans la régulation de l'assimilation des nitrates. Ce phénomène a été particulièrement observé pour les diatomées et les dinoflagellés (Pettersson, 1990, 1991).

### 3.3.3.2. Importance des hétérotrophes

La relation entre les classes de taille de phytoplancton et la source azotée utilisée pour réguler leur croissance a été mise en évidence par de nombreuses études (Glibert et al. 1982, Furnas 1983, Probyn 1985, Probyn et Painting 1985, Koike et al. 1986, Wheeler and Kirchman 1986). Ainsi, en accord avec l'hypothèse de Malone (1980), ces auteurs montrent que la production azotée du nanoplancton et du picoplancton est basée sur la production régénérée (c'est à dire sur l'ammonium ou l'urée). De plus, une étude de Wheeler et Kirchman (1986) révèle qu'une part importante de la production régénérée des petites classes de taille dans les eaux côtières de l'Atlantique Nord est causée par les hétérotrophes, contrairement au point de vue traditionnel qui limite l'absorption de NID au phytoplancton autotrophe (Dugdale et Goering, 1967). Cette importance des organismes hétérotrophes dans la production régénérée a été confirmée par les travaux de Laws (1985).

L'importance des hétérotrophes dans la fraction picoplanctonique en rade de Brest après le bloom a été démontrée par Jacq et al. (1985). Différents phénomènes permettent de confirmer cette observation en 1993. Ainsi, le rapport COP/chloro de la fraction picoplanctonique toujours supérieur à 500 au cours du printemps semble indiquer que le carbone particulaire est composé d'une quantité importante de carbone non-phytoplanctonique qui peut correspondre à de la matière organique détritique et/ou à des organismes hétérotrophes. Mais, la dominance des hétérotrophes dans cette fraction est appuyée par un rapport COP/NOP proche du rapport de Redfield au mois de mai (après le premier pic de la floraison printanière). De plus, la contribution mineure du picoplancton dans la production carbonée totale, malgré sa part importante dans la biomasse en termes de COP et NOP, certifie la présence des hétérotrophes.

Il apparait également que la fraction nanoplanctonique passe d'une population dominée par les autotrophes à une population dominée par les hétérotrophes au cours du printemps. Parallèlement à la fraction picoplanctonique, le rapport COP/chloro est supérieur à 100 dès le 3 mai alors que le rapport COP/NOP reste proche du rapport de Redfield. De plus, on observe une chute brutale de sa contribution dans la production carbonée totale au moment du bloom. Ce phénomène est sans doute à relier à la part de plus en plus importante prise par les dinoflagellés dans le nanoplancton. En effet, au début de printemps (avant le bloom), le nanoplancton est dominé par les cryptophycées et représente une part non négligeable de la production primaire. Puis, lors du maximum de développement des ciliés microzooplanctoniques, le développement des cryptophycées est stoppé. La meilleure



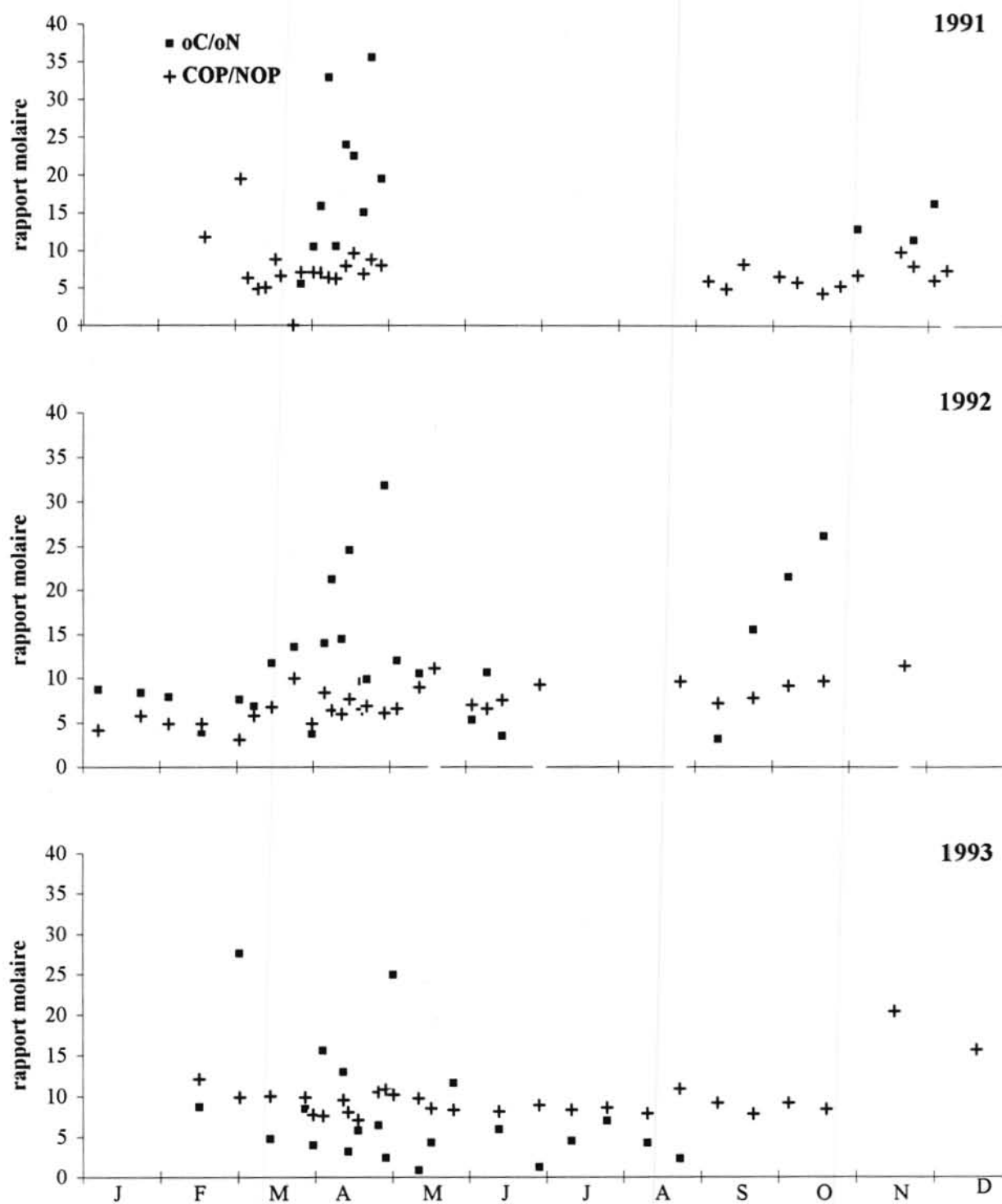


Fig. 42 : Evolution des rapports de biomasse et de production en carbone et en azote dans les eaux de surface de la station R3 entre 1991 et 1993.

explication à la disparition des cryptophycées est que la taille des proies des ciliés correspond à celle du nanoplancton (Banse 1982, Hansen 1992).

En accord avec les résultats de Probyn (1985), Koike et al. (1986), Harrison et Wood (1988), Horrigan et al. (1990) en zone côtière, l'absorption de l'ammonium dans la fraction picoplanctonique est plus importante que celle des nitrates juste après le bloom. D'après Pettersson et al. (1990), ce résultat est dû aux bactéries car leur absorption azotée est principalement basée sur l'ammonium. La présence d'une population hétérotrophe dans la fraction picoplanctonique peut donc avoir une forte influence sur l'absorption de l'ammonium. Par contre, dans la fraction nanoplanctonique, aucune évolution de l'absorption de l'ammonium n'est observée car sa contribution reste faible durant cette période (11-17 %). Les hétérotrophes semblent donc avoir une action limitée sur la production azotée : leur influence sur l'absorption de l'ammonium, est retrainte à la phase picoplanctonique, et ne peut donc avoir une grande conséquence sur le déphasage entre la production azotée totale et la chlorophylle car la part de l'ammonium dans la production azotée totale n'est jamais supérieure à 36 %.

#### 3.3.4. Evolution comparée des rapports de biomasse et de production en carbone et en azote

Le rapport COP/NOP est en moyenne supérieur au rapport de Redfield et est relativement stable, sauf en période hivernale où les forts débits fluviaux induisent un important apport de matière détritique (Tréguer et Quéguiner, 1989). La comparaison entre  $\rho C/\rho N$  et COP/NOP dans les populations naturelles est rendue difficile car de nombreux facteurs affectent les processus d'assimilation (Flynn, 1990) : les évolutions du COP et du NOP sont globalement synchrones tout au long de l'année alors que les productions azotée et carbonée sont en déphasage après le premier maximum de production.

Le rapport  $\rho C/\rho N$  est très variable d'une année à l'autre (Fig. 42). En 1991 et 1992, ce rapport est largement supérieur au rapport de Redfield alors qu'en 1993, il est très fluctuant et généralement inférieur ou égal à 6.6. L'échelle de variation de ce facteur est comparable à celle rencontrée dans de nombreux estuaires (Fisher et al. 1982, Harrison 1983, Kanda et al. 1985, Cochlan 1986, Petterson 1991) et dans les eaux riches de plusieurs upwelling côtiers : au Maroc et en Mauritanie (Slawyk et al., 1978), au Pérou (Wilkerson et al., 1987), en Namibie (Probyn, 1988). D'après Le Bouteiller (1993), ces rapports élevés semblent être dus au fait que la production carbonée est plutôt considérée comme de la production nette alors que la production azotée est considérée comme de la production brute. Pour avoir une production azotée nette, il aurait fallu retirer de la production brute la valeur de la régénération. Ces rapports élevés peuvent également être causés par une surestimation de la production carbonée (Pettersson, 1991) : si le carbone est utilisé pour la croissance de la cellule phytoplanctonique, il sert aussi dans les processus énergétiques de la cellule. La production azotée peut aussi biaiser la valeur du rapport  $\rho C/\rho N$  car la dilution isotopique de l'ammonium,

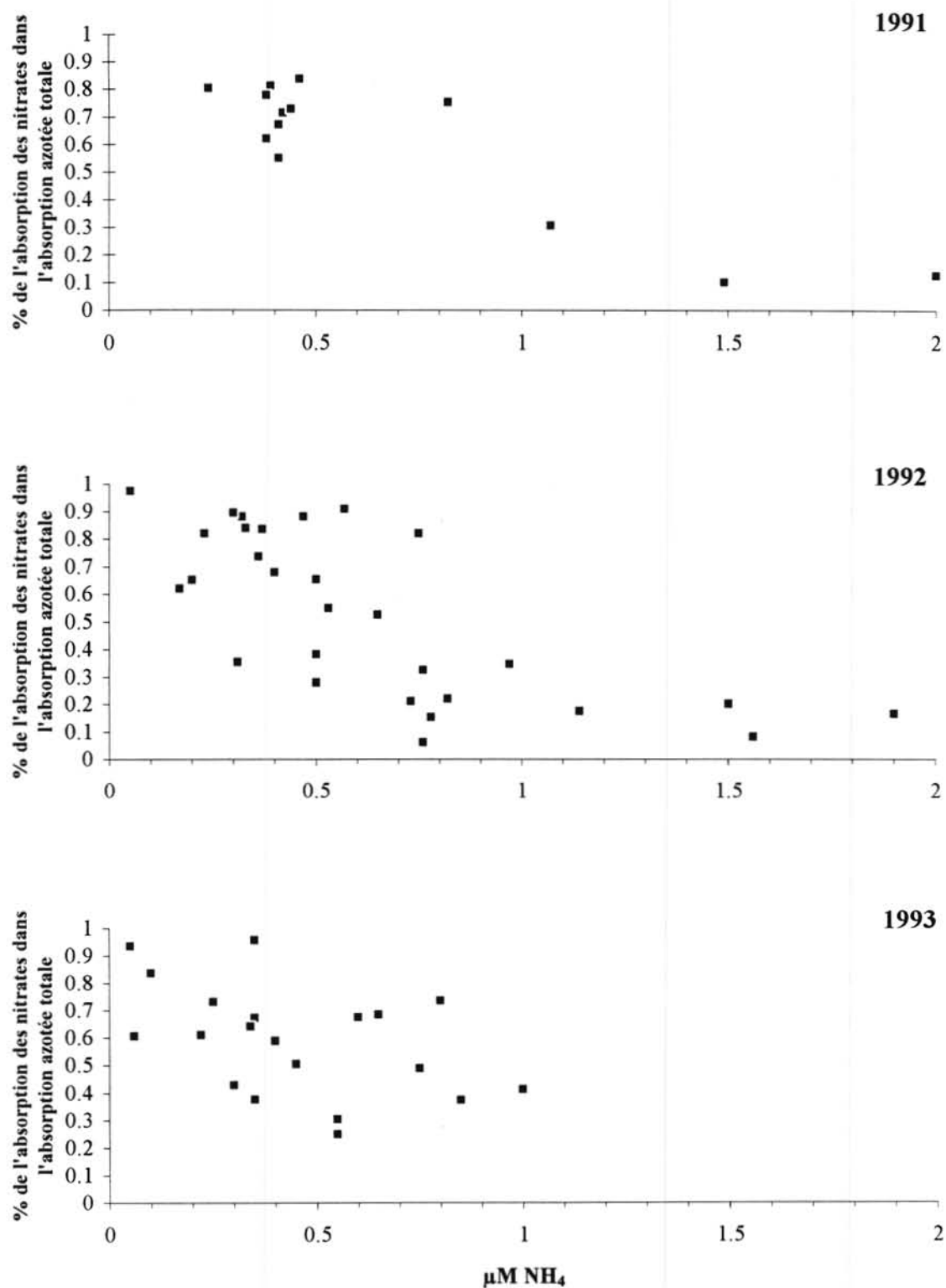


Fig. 43 : Relation entre la teneur en ammonium et l'importance de l'absorption des nitrates dans l'absorption azotée totale dans les eaux de surface de la station R3 entre 1991 et 1993.

induite par les phénomènes de régénération dans la bouteille d'incubation n'a pas été pris en compte dans cette étude et conduit probablement à une sous-estimation de la production azotée. Les valeurs d'absorption azotée peuvent également être surestimées lorsque la part du détritique dans le NOP devient considérable (Slawyk, 1979) : ceci peut expliquer les valeurs d'absorption azotée plus élevées en 1993 qu'en 1992 du fait de l'importance des apports fluviaux.

### 3.3.5. Relation entre l'absorption des nitrates et la teneur en ammonium

Lorsque la concentration en ammonium dans le milieu est élevée, le pourcentage d'absorption des nitrates est généralement faible. Pour certains auteurs, ce phénomène met en évidence l'inhibition de l'absorption des nitrates par l'ammonium dans les systèmes côtiers (McCarthy 1977, Garside 1981, Paasche et Kristiansen 1982, Carpenter et Dunham 1985, Cochlan 1986). La concentration en ammonium à laquelle les nitrates ne sont plus absorbés est très variable selon les systèmes. L'arrêt complet de l'absorption des nitrates a été observé en présence de concentrations en ammonium de 1 à 2  $\mu\text{M}$  (McCarthy 1977, Paasche et Kristiansen 1982) alors que dans certains systèmes très eutrophes (parcs à huîtres) une concentration dix fois plus élevée ( $> 20 \mu\text{M}$ ) peut être nécessaire pour la stopper (Maestrini et al. 1982). L'Helguen et al. (1993) observe en Manche Occidentale une diminution de l'absorption des nitrates lorsque la concentration en ammonium est inférieure à 0.2  $\mu\text{M}$ .

Le mécanisme par lequel l'ammonium exerce sa fonction d'inhibiteur n'est cependant pas bien compris (McCarthy 1981, Syrett 1981, Dortch 1990, Parker 1993). Il semble qu'il agisse d'une part sur le transport membranaire des nitrates et d'autre part, sur sa réduction intracellulaire en inhibant l'activité de la nitrate réductase et en supprimant sa synthèse. Mais, Dortch (1990) montre que la réduction de l'absorption des nitrates est rarement si sévère et que c'est un phénomène très variable. Il estime que la nature de l'interaction entre l'ammonium et l'absorption des nitrates est soit indirecte (c'est à dire une préférence relative pour l'ammonium), soit directe (inhibition de la nitrate réductase). En rade de Brest, il semble que l'ammonium présente seulement une interaction indirecte sur l'absorption des nitrates (Fig. 43). En effet, si l'absorption des nitrates tend à diminuer lorsque la teneur en ammonium augmente, on n'observe jamais un arrêt total de l'absorption des nitrates car elle représente toujours plus de 30 % de l'absorption azotée totale lorsque la concentration en ammonium est maximale (environ 0.7, 0.8  $\mu\text{M}$ ). De plus, l'absorption des nitrates est toujours supérieure à celle de l'ammonium au cours des trois printemps. Le fait que l'ammonium soit la forme azotée préférée semble donc être la meilleure explication au phénomène facilitant l'absorption des nitrates lorsque la concentration en ammonium est minimale.

1991			1992			1993			
RPI(NH4)		RPI(NO3)	RPI(NH4)		RPI(NO3)	RPI(NH4)	RPI(NO3)	RPI(uree)	
28/03/91	19.79	0.77	7.01.92	14.49	0.34	15/02/93	5.89	0.42	76.53
2/04/91	24.16	0.72	24.01.92	16.34	0.23	3/03/93	10.63	0.32	20.01
5/04/91	32.96	0.56	4.02.92	10.57	0.16	15/03/93	6.55	0.42	4.77
8/04/91	29.08	0.63	17.02.92	20.20	0.18	29/03/93	3.79	0.56	6.42
11/04/91	16.09	0.82	03.03.92	42.23	0.36	1/04/93	6.64	0.29	4.90
15/04/91	17.62	0.69	9.03.92	24.08	0.29	5/04/93	21.28	0.39	23.53
18/04/91	13.01	0.82	16.03.92	44.57	0.63	13/04/93	6.73	0.70	8.43
22/04/91	4.97	0.87	25.03.92	20.02	0.39	15/04/93	2.57	0.91	1.25
25/04/91	8.00	0.80	1.04.92	13.10	0.57	19/04/93	2.28	0.96	2.77
29/04/91	6.08	0.76	6.04.92	7.56	0.76	27/04/93	3.65	0.99	1.03
4.11.91	5.57	0.15	9.04.92	5.75	0.86	30/04/93	7.02	0.56	2.00
21.11.91	6.32	0.58	13.04.92	2.46	0.93	3/05/93	3.07	0.83	0.38
26.11.91	10.48	0.31	16.04.92	4.67	0.73	13/05/93	3.22	0.70	0.75
4.12.91	20.53	0.11	21.04.92	1.15	0.99	18/05/93	2.53	0.92	0.95
9.12.91	20.12	0.32	23.04.92	1.94	0.94	27/05/93	2.88	0.84	1.77
			30.04.92	2.95	0.88	14/06/93	0.90	1.01	1.12
			5.05.92	2.50	0.98	30/06/93	0.90	1.20	0.74
			14.05.92	3.25	0.87	13/07/93	11.02	0.68	6.00
			4.06.92	1.03	0.73	27/07/93	1.34	0.79	1.87
			10.06.92	0.93	1.04	12/08/93	1.21	0.96	1.02
			16.06.92	1.01	1.00				
			1.07.92	2.12	0.78				
			26.08.92	1.68	0.18				
			10.09.92	1.03	0.99				
			24.09.92	4.02	0.41				
			8.10.92	4.09	0.21				
			22.10.92	7.29	0.23				
			23.11.92	8.79	0.22				

Tab. 5 : Evolution des valeurs de RPI dans les eaux de surface de la station R3 entre 1991 et 1993.

### 3.3.6. Détermination de la forme azotée préférée (RPI)

#### 3.3.6.1. Définition

Pour déterminer la forme azotée préférentiellement assimilée par le phytoplancton, Mc. Carthy et al. (1977) ont déterminé un indice de préférence relative (RPI) qui est défini comme le rapport du pourcentage de l'absorption d'un nutriment donné par rapport à l'absorption azotée totale sur le rapport du pourcentage de sa concentration ambiante :

$$RPI_{urée} = \frac{\rho_{urée} / (\rho_{NO_3} + \rho_{NH_4} + \rho_{urée})}{C_{urée} / (C_{NO_3} + C_{NH_4} + C_{urée})} \quad \text{par exemple pour l'urée}$$

une valeur de RPI > 1 montrant une préférence pour cette forme.

#### 3.3.6.2. RPI de la fraction totale

Le calcul de cet indice met en évidence un changement de comportement du phytoplancton vis à vis de chaque forme azotée au cours de l'année (Tab. 5). Le  $RPI_{NO_3}$  est généralement inférieur à 1 mais une augmentation régulière se produit entre mars et juin : le seuil de 1 est dépassé légèrement le 10 juin 1992 et le 13 juillet 93. Le  $RPI_{NH_4}$  est toujours largement supérieur à 1, sauf en juin-juillet lorsque  $RPI_{NO_3}$  atteint une valeur proche de 1. Les deux formes sont assimilées à cette période avec la même préférence. Le  $RPI_{urée}$  est largement supérieur à 1 (> 4.7) jusqu'au déclenchement du bloom. Il est assez stable (entre 2.7 et 1.03) jusqu'au 3 mai. Puis, du 13 au 27 mai, il descend sous la barre de 1. Les valeurs mesurées jusqu'à la fin de la période d'étude restent très proches de 1. On peut donc considérer que les formes azotées préférées sont alternativement l'ammonium et l'urée sont alternativement jusqu'au déclenchement du bloom, puis l'ammonium entre début mai et fin juin. Par contre, au cours de l'été, aucune forme azotée n'est réellement préférée aux autres (à part le 27 juillet,  $RPI_{NH_4} = 11$ ).

Des valeurs de  $RPI_{NO_3}$  inférieures à 1 ont déjà été observées dans de nombreuses études, même lorsque les valeurs d'absorption basée sur les nitrates et la concentration des nitrates dans le milieu ambiant sont élevés. La préférence du phytoplancton pour les formes réduites de l'azote est considérée comme un phénomène universel des écosystèmes marins (Dugdale 1976, McCarthy et al. 1977 1982, Collos et Slawyk 1980, Glibert et al. 1982, Paasche et Kristiansen 1982, Wheeler et al. 1982, Furnas 1983, Kaufman et al. 1983, Harrison et al. 1985, Probyn 1985, Cohan 1986, Pennock 1987, Kristiansen et Lund 1989). Eppley et al. (1969)

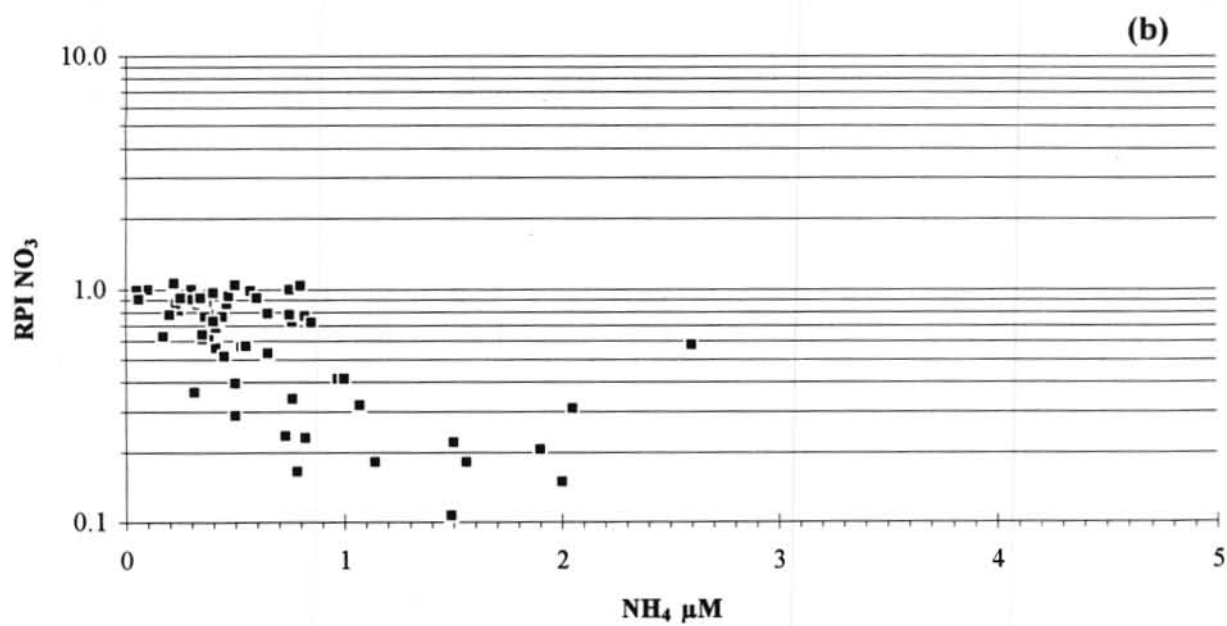
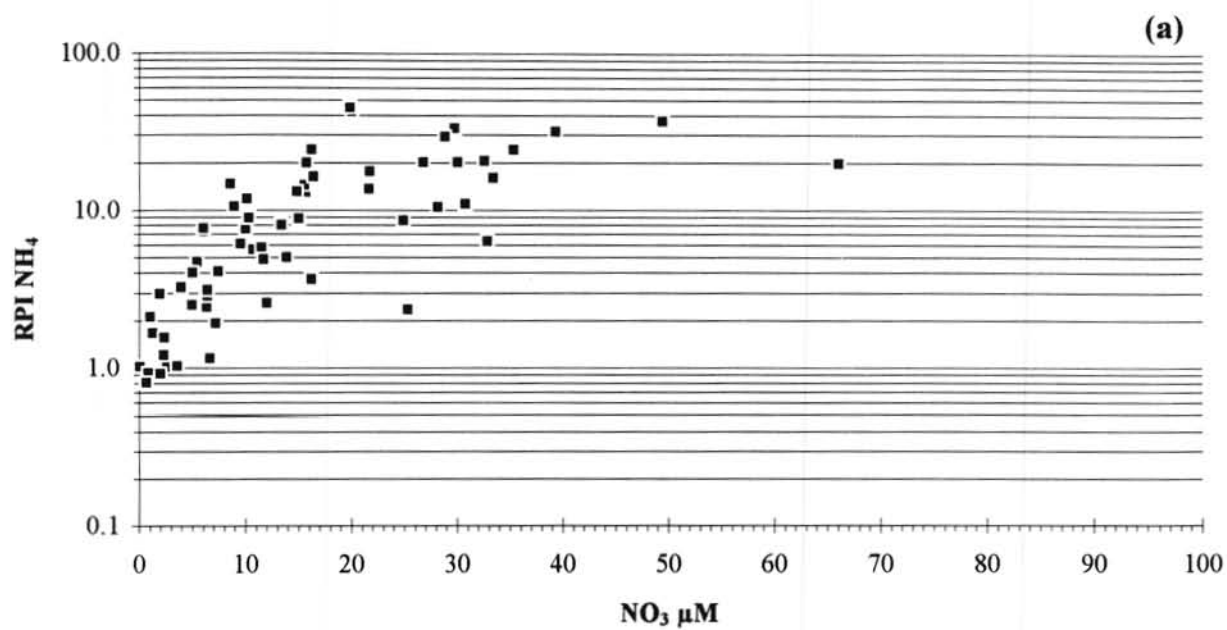


Fig. 44 : Evolution (a) du  $RPI\ NH_4$  en fonction de la concentration en nitrates et (b) du  $RPI\ NO_3$  en fonction de la concentration en ammonium.



suggère que la préférence relative de l'ammonium par le phytoplancton, alors que les nitrates représentent plus de 90 % de l'azote dissous, peut s'expliquer par le fait que le mécanisme intracellulaire de formation des acides aminés est basé sur l'ammonium : l'absorption directe de ce composé se fait donc à moindre coût énergétique que l'absorption indirecte des nitrates. McCarthy (1977) et Harrison et al. (1985) ont également montré que l'urée était la forme azotée préférée après les nitrates et avant l'ammonium.

Le  $RPI_{NH_4}$  montre une nette tendance à diminuer lorsque la concentration en nitrates décroît (Fig. 44a) : dès que la concentration en nitrates est inférieure à 5  $\mu M$ , la majorité des valeurs de  $RPI_{NH_4}$  est comprise entre 2 et 1, voir inférieure. Le  $RPI_{NO_3}$  est inversement corrélé à la teneur en ammonium. (Fig. 44b) Ceci suggère que les nitrates sont autant utilisés que l'ammonium lorsque la concentration en ammonium est faible mais sont rejetés lorsque cette concentration est relativement élevée.

### 3.3.6.3. *RPI des différentes fractions phytoplanctoniques*

Le  $RPI_{NO_3}$  du microplancton croît rapidement dès le déclenchement du bloom et reste supérieur à 0.8. Le  $RPI_{NO_3}$  de la fraction nanoplanctonique varie avec une grande amplitude et atteint une valeur proche de 1 seulement à partir du 14 juin. La fraction picoplanctonique montre un RPI relativement faible jusqu'au 14 juin.

L'allure du  $RPI_{NH_4}$  total suit jusque 30 avril celle du RPI du picoplancton qui est la fraction représentant la plus grande part à cette absorption. Par conséquent, la chute dès le début du bloom du  $RPI_{NH_4}$  du micro est masquée dans l'allure du RPI total. Le  $RPI_{NH_4}$  du microplancton est en effet toujours inférieur à 5 sauf le 27 juillet où il atteint 15. Le  $RPI_{NH_4}$  du nanoplancton ne dépasse jamais 9 sauf le 15 mars et le 27 juillet. Du 14 juin au 12 août, chacune des classes de taille possède un  $RPI_{NH_4}$  équivalent.

Une corrélation inverse est observée entre la concentration en ammonium et le  $RPI_{NO_3}$  des fractions picoplanctoniques et nanoplanctoniques. De plus, dès que la concentration en ammonium est inférieure à 0.3  $\mu M$ ,  $RPI_{NO_3}$  frôle le seuil de 1. Le  $RPI_{NO_3}$  de la fraction microplanctonique est toujours très proche de 1 quelque soit la concentration en ammonium. Ceci met en évidence la capacité du microplancton à utiliser l'une ou l'autre des formes azotées. Le  $RPI_{NH_4}$  est directement corrélé à la concentration en nitrates dans le milieu ambiant pour toutes les classes de taille. Les RPI obtenus lorsque la concentration en nitrates est inférieure à 2  $\mu M$  sont proches de 1 dans les fractions pico et nanoplanctoniques et inférieures à 1 dans la fraction microplanctonique. Cette relation met en évidence le besoin en nitrates de la cellule phytoplanctonique lorsque cet élément devient limitant.



### 3.3.6.4. RPI dans la colonne d'eau

Le  $RPI_{NH_4}$  est supérieur à 1 durant tout le printemps sur toute la colonne d'eau en R3. Les valeurs les plus faibles sont généralement rencontrées en surface puis elles augmentent progressivement avec la profondeur. Jusqu'au 30 avril, les valeurs rencontrées sur l'ensemble de la colonne d'eau sont très éparpillées car comprises entre 4.8 et 32.7. Puis, du 3 mai au 14 juin, elles diminuent (inférieures ou égales à 5) et sont assez uniformes sur toute la colonne d'eau. Au cours de l'été, les  $RPI_{NH_4}$  obtenus à chaque profondeur évoluent de façon parallèle, les valeurs du fond et de 1 % étant comparables et supérieures à celles mesurées à 10, 25 et 100 %. Les  $RPI_{NO_3}$  évoluent suivant un scénario différent de celui de l'ammonium. En effet, si les RPI mesurés en surface et à 25 % sont assez stables car supérieurs à 0.8 du 19 avril au 25 août, ceux rencontrés à 10 %, 1 % et au fond sont beaucoup plus variables. Les RPI de 1 % et du fond sont toujours inférieurs à 0.6 sauf les 27, 30 avril et 27 mai où tous les  $RPI_{NO_3}$  de la colonne d'eau sont comparables ( $> 0.9$ ).

La corrélation positive entre le  $RPI_{NH_4}$  et la concentration en nitrates, et la corrélation inverse entre le  $RPI_{NO_3}$  et la concentration en ammonium sont observées à chaque profondeur. Par contre, les pentes de ces corrélations sont très différentes à chaque profondeur:  $RPI_{NO_3}$  est plus élevé en surface qu'au fond pour une même concentration en ammonium, de même  $RPI_{NH_4}$  mesuré en surface est inférieur à celui mesuré au fond pour une même concentration en nitrates. Ce résultat montre que la préférence pour l'ammonium de la part du phytoplancton est encore plus importante au fond qu'en surface.

### 3.3.7. Régime de production

#### 3.3.7.1. Définition

Introduisant, pour le milieu océanique, le concept de production "nouvelle" (basée sur l'absorption des nitrates) et "régénérée" (basée sur l'absorption de l'ammonium et de l'urée), Eppley et Peterson (1979) ont défini le rapport  $f$ , tel que :

$$f = \frac{\rho_{NO_3}}{(\rho_{NO_3} + \rho_{NH_4} + \rho_{urée})}$$

Il est souvent admis que ce rapport  $f$  ne peut pas être appliqué aux eaux côtières. Les apports anthropogéniques (station d'épuration, épandage de lisiers, ...) peuvent en effet constituer une importante source d'azote réduit extérieur au milieu (Harrison et al., 1987) et peuvent donc induire une erreur sur le calcul de  $f$ . Or, en rade de Brest, la seule source d'apport en ammonium est représentée par les apports fluviaux, et à partir de la fin de printemps par le sédiment. La part de l'ammonium et de l'urée réunis ne représente pas plus de

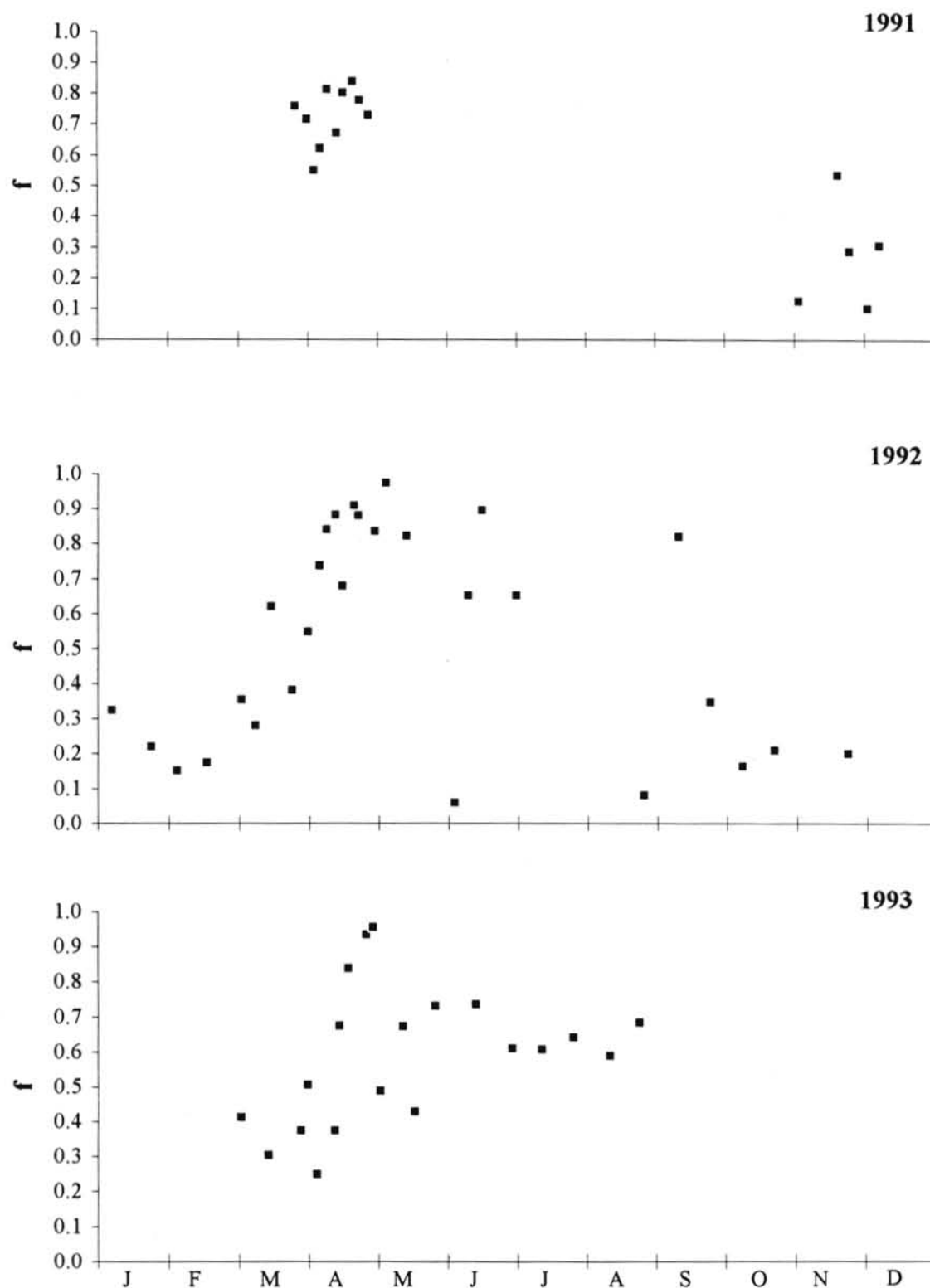


Fig. 45 : Evolution du facteur f dans les eaux de surface de la station R3 entre 1991 et 1993.

5 % de l'azote dissous total importé en rade par les fleuves en période printanière. Le calcul de  $f$  n'a donc que peu de chances d'être perturbé de manière importante. D'autre part la situation rencontrée au cours de la première partie du printemps 1992 est très similaire à celle rencontrée dans les eaux océaniques : les exportations d'ammonium vers l'Iroise sont supérieures aux importations par les fleuves, l'ammonium disponible pour la croissance phytoplanctonique est donc essentiellement dû aux processus de régénération.

### 3.3.6.2. *Evolution du facteur $f$*

Le facteur  $f$  a été calculé en 1991 et 1992 en considérant que l'absorption de l'urée est aussi importante que l'absorption de l'ammonium. L'évolution du facteur  $f$  en 1991, 1992 et 1993 (Fig. 45) peut être séparée en deux périodes principales : la période hivernale caractérisée par un facteur  $f$  inférieur à 0.5 et le printemps par une valeur supérieure à 0.5 (sauf le 4 juin 1992, lorsque les nitrates sont épuisés dans le milieu). Les valeurs obtenues au cours de cette étude sont comparables à celles de Dauchez et al. (1991). Eppley et Peterson (1979) ont relevé des valeurs de  $f$  comprises entre 0.3 et 0.46 dans les eaux côtières de la Chesapeake Bay, Glibert et al. (1982) une moyenne annuelle de 0.6.

Le  $f$  du microphytoplancton est toujours supérieur à 0.5 sauf le 15 mars. La fraction nanoplanctonique atteint également rapidement une valeur supérieure à 0.95 mais chute brutalement le 29 avril à 6 % pour être de nouveau supérieur à 0.60 jusqu'à la fin de l'étude. C'est le  $f$  de la fraction picoplanctonique qui fluctue le plus et qui donc détermine l'allure du  $f$  de la fraction totale. Cette classe de taille est celle qui est de façon la plus fréquente et la plus importante en régime régénéré du fait de l'importance des hétérotrophes dans cette fraction. Le facteur  $f$  est généralement plus faible pour les petites fractions que pour les grandes (Malone 1980, Probyn 1985) bien que Furnas (1983) trouve que le nano et le net absorbe de la même manière le NID dans la baie de Narragansett.

Le facteur  $f$  baisse généralement avec la profondeur (Probyn 1985). Certains auteurs utilisent l'allure des profils d'absorption des nitrates pour déterminer la nature du régime de production. Ainsi, une absorption de nitrates élevée en surface diminuant avec la profondeur est caractéristique de zones pourvues en azote alors qu'une absorption de nitrates faible en surface et maximale au niveau de la nitracline est typique de zones limitées en azote (MacIsaac and Dugdale 1969, Harrison 1983, Cochlan 1986).

## Conclusion générale

Parmi les nombreuses méthodes électrochimiques et spectrométriques proposées pour l'analyse des nitrates, la colorimétrie est la méthode la plus fiable pour effectuer des analyses en eau de mer. La détermination des nitrates par colorimétrie nécessite trois étapes réactionnelles irréversibles. L'échantillon est tamponné à un pH neutre, puis les nitrates sont réduits en nitrites en passant à travers une colonne de cadmium cuivrée. Les nitrites ainsi obtenus réagissent ensuite en milieu acide avec la sulfanilamide pour former un ion diazoïque. La réaction entre ce diazoïque et le chlorhydrate de N-naphtyl-éthylènediamine donne un composé coloré qui peut être quantifié spectrophotométriquement.

Le flux segmenté est la méthode analytique de référence en océanographie (AutoAnalyzers Technicon). Mais, ce système d'analyse est difficilement adaptable sur un analyseur submersible car des bulles d'air sont utilisées pour segmenter le flux d'échantillon. Lors des tests d'évaluation des différentes techniques d'analyse colorimétrique, la FIA est apparue comme la méthode la plus apte à effectuer des mesures in situ sous la forme profileur (temps d'analyse de l'ordre de la minute, pas de problème de contamination entre échantillons,...). Comme pour la technique du flux segmenté, les réactifs et l'échantillon sont propulsés dans le circuit analytique à l'aide d'une pompe péristaltique et la détection s'effectue à l'aide d'un colorimètre. Par contre, le bullage est supprimé et l'échantillon est injecté dans le flux de réactifs à l'aide d'une vanne d'injection. Malheureusement, lors de l'injection de l'échantillon dans le flux de réactifs, il se crée un gradient d'indice (l'effet de Schlieren) le long de l'axe de la zone réactionnelle. Il est caractérisé par un signal sinusoïdal lors de l'injection d'une solution de 0  $\mu\text{M}$ . Le problème majeur a donc été de définir une référence (un "blanc"). Le traitement de signal proposé est basé sur une simple modification de la loi de Beer Lambert : dans les conditions stables du laboratoire, le signal considéré comme référence est l'intégration pendant 60 s du signal précédemment obtenu avec une solution de 0  $\mu\text{M}$ . Grâce à ce traitement de signal, la relation

linéaire classique entre la concentration et l'absorbance est retrouvée. Par contre, ce traitement n'est pas satisfaisant lors d'une utilisation in situ : la variation de la salinité et de la température provoque à la fois un changement de l'amplitude et un déplacement dans le temps de l'effet de Schlieren. Le traitement de signal alors proposé consiste à mesurer simultanément le signal à deux longueurs d'onde différentes : une à laquelle la solution absorbe la lumière, et une autre à laquelle aucun changement d'absorbance dû à la réaction chimique n'est observé. Cette méthode permet d'obtenir une très bonne sensibilité (5 % à 0.5  $\mu\text{M}$ ) et une faible limite de détection ( $3\sigma_b = 0.45 \mu\text{M}$ ) lors de mesures in situ simulées, spécialement lorsque la concentration en nitrates est faible.

L'étape suivante a été la phase de marinisation de l'instrumentation utilisée au laboratoire. Cette étude a porté sur l'évaluation des différents composants (pompe, vannes, manifold, circuit optique, ...) dans les conditions in situ simulées (variation de pression et contact avec l'eau de mer). L'appareil présenté dans cette thèse a été conçu pour mesurer les variations temporelles et spatiales des teneurs en nitrates et nitrites dans des zones à fort gradient de salinité jusqu'à 300 m de profondeur. Le système est calibré à l'aide d'une vanne de sélection qui permet d'introduire dans le circuit soit l'échantillon, soit un blanc, soit des standards de concentration connue en nitrates et nitrites. Les tests d'intercalibration menés entre les mesures effectuées in situ avec la maquette de faisabilité et l'analyse au laboratoire des échantillons recueillis de façon conventionnelle, montrent une très bonne résolution entre les deux méthodes ( $\pm 1.3 \%$ ). Les campagnes en mer ont démontré la polyvalence de cet appareil : il peut aussi bien travailler à fréquence rapide (une mesure toutes les minutes) sous forme de profileur dans la colonne d'eau jusqu'à 300 m de profondeur ou bien à fréquence plus faible à un point fixe durant une période assez longue. La surveillance de la teneur en nitrates dans les eaux côtières à l'aide d'un capteur immergé avec une bonne précision est maintenant tout à fait concevable.

Cette étude constitue une étape préliminaire dans le développement de l'analyseur submersible. Il a prouvé que l'adaptation d'une méthode d'analyse de laboratoire reconnue sur un analyseur submersible permet d'obtenir des résultats d'une excellente précision. Différentes versions de cet appareil sont envisageables. Pour effectuer des mesures dans l'océan ouvert, il serait nécessaire d'adapter des vannes pouvant travailler sous 600 bars de pression. Une version est également prévue pour être adaptée sur le réseau de bouées instrumentées MAREL. La mise au point du dosage des autres sels nutritifs (silicates, phosphates, ammonium, ...) est d'ores et déjà en cours de réalisation.

La rade de Brest est un écosystème où les apports d'azote inorganique dissous sont surtout d'origine fluviale. Depuis deux décennies, une nette augmentation des teneurs en nitrates est observée dans l'Aulne et dans l'Elorn. Ainsi, entre 1980 et 1992, la concentration en nitrates

dans l'Aulne à débit constant a pratiquement doublé. Cette augmentation des teneurs en nitrates peut être imputée, pour une grande part, au mode de développement agricole (surépandage d'engrais, intensification de l'élevage hors sol, ...). La relation de type logarithmique observée entre le débit et la concentration en nitrates dans les deux fleuves en 1992 caractérise en effet une source de pollution diffuse où le lessivage des sols est prépondérant. La concentration en ammonium a également augmentée de façon spectaculaire dans l'Aulne en 1992 alors qu'elle est restée quasiment au même niveau dans l'Elorn.

Cette augmentation des apports azotés fluviaux se ressent surtout au moment des fortes crues en rade. En réponse à ces fortes concentrations dans la colonne d'eau, les nitrates sont exportés à la fois vers le sédiment en période hivernale et printanière, qui peut alors être considéré comme un puits d'azote nitrique, et vers la mer d'Iroise. Mais, malgré l'intensité du renouvellement des eaux avec la mer d'Iroise, certains facteurs mettent en évidence la fragilité de cet écosystème à faire face à la diminution du rapport Si:N en période printanière. Ainsi, en mai 1993, en raison de l'importance des apports fluviaux, on a pu observé l'apparition d'espèces phytoplanctoniques non siliceuses et toxiques, *Phaeocystis pouchetti* suivie de *Dynophysis sp.*. Le développement de ces espèces en rade de Brest avait avant ces dernières années un caractère tout à fait exceptionnel. Leur apparition récente dénote une dégradation de la qualité du milieu et met en évidence la fragilisation de l'écosystème. Ce remplacement des populations de diatomées par une population à base de dinoflagellés a déjà été rencontrée dans les eaux côtières de la mer du Nord (Billen, 1991) ainsi que dans la baie de Chesapeake (Conley et Malone, 1992). D'après Smayda (1990), l'intensité du développement de *Phaeocystis pouchetti* est à relier à l'accroissement des apports anthropogéniques d'azote et de phosphore. Les risques de développement de dinoflagellés sont en effet accentués dans la mesure où l'azote ne peut jouer un rôle limitant à la suite de l'épuisement des silicates provoqué par les précédentes floraisons de diatomées.

L'absorption azotée dans les eaux de surface de la rade de Brest montre de larges variations temporelles et est caractérisée par une succession de maxima entre avril et juillet. Durant toute la période printanière, l'absorption azotée est principalement basée sur les nitrates (68 % de la production totale) et les absorptions d'ammonium et d'urée sont de même amplitude. Mais, en raison de l'intensité des apports fluviaux en nitrates, il n'existe pas de corrélation entre la concentration d'une forme azotée et son absorption. De plus, la disponibilité en nitrates est telle que la constante de demi-saturation n'est que très rarement atteinte. Mais le fait d'approcher le  $K_s$  suffit à limiter l'absorption des nitrates d'une façon plus importante que la diminution de la lumière incidente dans la colonne d'eau entre 100 % et 25 % de lumière incidente. La majeure partie de l'absorption azotée se situe entre la surface et les 25 % de lumière incidente. En effet, si l'ammonium est absorbé de façon quasi uniforme sur l'ensemble de la colonne d'eau, l'absorption des nitrates décroît avec la diminution de l'intensité lumineuse.



Les mesures effectuées sur l'absorption azotée des différentes classes de taille mettent en évidence la prédominance du microplancton, majoritairement constitué de diatomées, à la fois dans l'absorption totale des nitrates et dans celle de l'ammonium. L'hypothèse de réservoirs intracellulaires au sein des cellules microphytoplanctoniques capables de contrôler le taux de croissance semble être une explication potentielle au déphasage temporel observé au cours de la floraison printanière entre la production azotée et, la production carbonée et les différents facteurs de biomasse. L'absorption de l'ammonium en période printanière est globalement dominée par l'ensemble nano et picoplancton. Ce résultat semble être dû à l'importance prise par les hétérotrophes dans cette fraction au cours du printemps.

Les calculs de RPI ont montré que la forme azotée préférentiellement absorbée par le phytoplancton globalement au cours d'une année est l'ammonium, puis l'urée et enfin les nitrates. Cette préférence pour l'ammonium est accentuée dans la colonne d'eau. La corrélation inverse entre le  $RPI_{NO_3}$  et la teneur en ammonium suggère que les nitrates sont aussi utilisés que l'ammonium lorsque la concentration en ammonium est faible, mais sont rejetés lorsque cette concentration est élevée. Mais, ce n'est pas pour ainsi qu'on peut parler d'inhibition de l'absorption des nitrates par l'ammonium : aucun arrêt total de l'absorption des nitrates n'a été observé lorsque la concentration en ammonium est maximale et l'absorption des nitrates est toujours supérieure à celle de l'ammonium. Le régime de production en rade de Brest est de type régénéré en hiver, puis est basé sur la production nouvelle dès le déclenchement du bloom.

## Références bibliographiques



Al-Wehaid A., Townshend A., (1986). Spectrophotometric flow-injection determination of nitrate based on reduction with titanium (III) chloride. *Anal. Chim. Acta*, 186, pp. 289-294.

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

Aminot A., Kérouel R., (1982). Dosage automatique de l'urée dans l'eau de mer : une méthode très sensible à la diac  tylmonoxime. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39, pp. 174-183.

Anderson L., (1979). Simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate by flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta*, 110, pp. 123-128.

Anderson S.M., Roels O.A., (1981). Effects of light intensity on nitrate and nitrite uptake and excretion by *Chaetoceros curvisetus*. *Mar. Biol.*, 62, pp. 257-261.

APHA-AWWA-WPCF, (1980). *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 15 edn., Washington D.C., pp. 370-376.

Armstrong F.A., (1963). The determination of nitrate in water by ultra-violet spectrophotometry. *Anal. Chem.*, 35, pp. 1292-1294.

Armstrong F.A., Stearns C.R., Strickland J.D.H., (1967). The measurement of upwelling and subsequent biological processes by means of the Technicon Autoanalyser and associated equipment. *Deep-Sea Res.*, 14, pp. 381-389.

Arthur C.R., Rigler F.H., (1967). A possible source of error in the <sup>14</sup>C method of measuring primary productivity. *Limnol. Oceanogr.*, 12, pp. 121-124.

Atkins W.R.G., (1954). *J.Cons. inst. Explor. Mer.*, 22, pp. 271.

Atlas E.L., Hager S.W., Gordon L.I., Park P.K., (1971). *A practical manual for use of the Technicon Autoanalyser in seawater nutrient analyses*. revised, Technical report 215; Dept. of Ocean. Oregon State Univ., Corvallis, 55p.

Austin K.H., Strickland J.D.H., (1959). The direct estimation of ammonia in sea water with notes on "reactive" iron, nitrate, and inorganic phosphorus. *J. Cons. perm. int. Explor. Mer.*, 24, pp. 446-449.

Banse K., (1982). Cell volumes, maximal growth rates of unicellular algae and ciliates, and the role of ciliates in the marine pelagial. *Limnol. Oceanogr.*, 27, pp. 1059-1071.

Basargin N.I. and Chernova E.A., (1968). *Vernadskii institute of geochemistry and analytical chemistry*, Academy of sciences of the USSR, Moscow, translated from *Zh. Anal. Khim.*, 23, pp. 102.

Bastian R., Weberling R., Palilla F., (1957). *Anal.Chem.*, 29, pp. 1795.

Beale R.N., Croft D., (1961). A sensitive method for the colorimetric determination of urea. *J. Clin. Pathol.*, 14, pp. 418-424.

Benschneider K. and Robinson R.J., (1952). A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *J. Mar. Res.*, 11, pp. 87-96.

Bernhard M., Macchi G., (1966). Application and possibilities of automatic chemical analysis in oceanography. *Technicon Symposia*, 1965, Mediad, N.Y, pp. 255-259.

Bernhard M., Torti E., Ghibaudo M., Rossi G. and Bruschi A., (1967). An underwater apparatus for in-situ determinations with the AutoAnalyser. "Automation in analytical chemistry", European Technicon Symposium, Brighton (England), 1967, 391-395.

Berthelot M.E.P., (1859). Répertoire de chimie appliquée. 284 p.

Breton H., (1993). Etude des facteurs controlant la production primaire et la biomasse du phytoplancton en rade de Brest en période printanière : évolution comparée du microplancton, du nanoplancton et du picoplancton. Rapport DEA Océanologie Biologique, UBO, 27 p.

Brewer P. G., Riley J.P., (1967). A study of some manual and automatic procedures for the determination of nitrate and silicate in ocean water. Deep-Sea Res., 14, pp. 475-477.

Brewer P.G., Riley J.P., (1965). The automatic determination of nitrate in sea water. Deep-Sea Res., 12, pp. 765-772.

Carpenter E.J., Dunham S., (1985). Nitrogenous nutrient uptake, primary production and species composition of phytoplankton in the Carmans River estuary, Long Island, N.Y. Limnol. Oceanogr. 30, pp. 513-526.

Casey H. and Clarke R.T., (1979). Statistical analysis of nitrate concentrations from the river Frome (Dorset) for the period 1965-76. Freshwater Biol., 9, pp. 91-97.

Chin C.S., Johnson K.S., Coale K.H., (1992). Spectrophotometric determination of dissolved manganese in natural waters with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol : application to analysis in situ in hydrothermal plumes. Marine Chem., 37, pp. 65-82.

Chow D.T.W., Robinson R.J., (1953). J. Marine Res., 12, p.1.

Chow T.J. and Johnstone M.S., (1962). Determination of nitrate in sea water. Anal. Chim. Acta., 27, pp. 441-446.

Clinch J.R., Worsfold P.J. and Casey H., (1987). An automated spectrophotometric field monitor for water quality parameters : determination of nitrate. Anal. Chim. Acta., 200, pp. 523-531.

Coale K.H., Chin C.S., Massoth G.J., Johnson K.H., Baker E.T., (1991). In situ chemical mapping of dissolved iron and manganese in hydrothermal plumes. Nature, 352, pp. 325-328.

Cochlan W.P., (1986). Seasonal study of uptake and regeneration of nitrogen on the Scotian shelf. Cont. Shelf. Res., 5, pp. 555-577.

Collos Y., (1982). Régimes transitoires dans l'assimilation de l'azote par le phytoplancton marin. Thèse de 3ème cycle, Université d'Aix-Marseille II, 123 p.

Collos Y., Slawyk G., (1980). Uptake and assimilation by marine phytoplankton. In : Primary productivity in the sea. Eds : Falkowski P.G., New York : Plenum Press, pp. 195-211.

Collos Y., Yin K., Harrison P.J., (1992). Mar. Chem., 38, p. 325.

Conway H.L., Whittedge T.E., (1979). Distribution, fluxes and biological utilization of inorganic nitrogen during a spring bloom in the New York bay. J. of Mar. Res., 37 (4), pp. 657-668.

Costa R.L., (1951). Bol. Inst. Esp. Oceanogr., 43, pp. 13.

Crumpton W.G., Isenhardt T.M., Mitchell P.D., (1992). Nitrate and organic N analyses with second-derivative spectroscopy. Limnol. Oceanogr., 37 (4), pp. 907-913.

Dal Pont G., (1962). CSIRO Australia Oceanogr. Cruise Rept. 4, Oceanographic Obs. in the Indian Ocean in 1960.

Dauchez S., Quéguiner B., Tréguer P., Zeyons C., (1991). A comparative study of nitrogen and carbon uptake by phytoplankton in a coastal eutrophic ecosystem (Bay of Brest, France). *Oceanol. Acta*, 14 (1), pp. 87-95.

Davison W., Woof C., (1979). Interference studies in the batch determination of nitrate in freshwater by reduction with cadmium to nitrite. *Analyst*, 104 (1238), pp. 385-390.

Delmas R., (1981). Etude de l'évolution saisonnière des sels nutritifs dans la rade de Brest en fonction des apports fluviaux et des échanges avec l'Iroise. Thèse de 3<sup>ème</sup> cycle, Université de Bretagne Occidentale, Brest, 163 p.

Dortch Q., (1982). Effect of growth conditions on accumulation of internal nitrate, ammonium, amino acids, and protein in three marine diatoms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 61, pp. 243-264.

Dortch Q., (1990). The interaction between ammonium and nitrate uptake in phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 61, pp. 183-201.

Droop M.R., (1968). Vitamin B<sub>12</sub> and marine ecology. IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 48, pp. 689-733.

Droop M.R., (1973). Some thoughts on nutrient limitation in algae. *J. Phycol.*, 9, pp. 264-272.

Dugdale R.C., (1976). Nutrient cycles. In : Cushing, D.H., Walsh J.J. (Eds.). *The ecology in the sea*. Blackwell's Scientific Publications, Oxford. pp. 141-172.

Dugdale V.A., Dugdale R.C., (1965). Tracer studies of the assimilation of inorganic sources. *Limnol. Oceanogr.*, 10, pp. 53-57.

Dugdale, R.C., Goering J.J., (1967). Uptake of new and regenerated forms of nitrogen in primary productivity. *Limnol. and Oceanogr.*, 12 (2), pp. 196-206.

Eppley R.W., Peterson B.J., (1979). Particulate organic matter flux and planktonic new production in the deep ocean. *Nature*, 282, pp. 677-680.

Eppley R.W., Renger E.H., (1988). Nanomolar increase in surface layer nitrate concentrations following a small wind event. *Deep-Sea Res.*, 35, pp. 1119-1125.

Eppley R.W., Rogers J.N., McCarthy J.J., (1969). Half-saturation constants for uptake of nitrate and ammonium by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 14, pp. 912-919.

Fiedler R., Proksch G., (1975). The determination of nitrogen-15 by emission and mass spectrometry in biochemical analysis : a review. *Anal. Chim. Acta*, 78, pp. 1-62.

Fisher T.R., Carlson P.R., Barber R.T., (1982). Carbon and nitrogen primary productivity in three North Carolina estuaries. *Est. Coast. and Shelf Science*, 15, pp. 621-644.

Flynn K.J., (1990). The determination of nitrogen status in algae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 61, pp. 297-307.

Fogg A.G., Chamsi A.Y., Abdalla M.A., (1983). Flow injection voltammetric determination of nitrate after reduction to nitrite. *Analyst*, 108, pp. 464-469.

- Furnas M.J., (1983). Nitrogen dynamics in lower Narragansett Bay, Rhode Island. I. Uptake by size-fractionated phytoplankton populations. *J. Plankton. Res.*, 5, pp. 657-676.
- Furnas M.J., Hitchcock G.L., Smayda T.J., (1976). Nutrient-phytoplankton relationships in Narragansett Bay during the 1971 summer bloom. In : *Estuarine Processes* (Ed : Wiley M.), Academic Press, New York, pp. 118-134.
- Gardner W.S., Wynne D.S., Dunstan W.M., (1976). Simplified procedure for the manual analysis of nitrate in seawater. *Mar. Chem.*, 4, pp-393-396.
- Garside C., (1981). Nitrate and ammonium uptake in the apex of the New York Bight. *Limnol. Oceanog.*, 26, pp. 731-739.
- Garside C., (1982). A chemiluminescent technique for the determination of nanomolar concentrations of nitrate and nitrite in seawater. *Mar. Chem.*, 11, pp. 159-167.
- Giné M.F., Bergamin F. H., Zagatto E.A.G., Reis B.F., (1980). Simultaneous determination of nitrate and nitrite by flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta*, 114, pp. 191-197.
- Glibert P.M., Biggs D.C., MacCarthy J.J., (1982). Utilization of ammonium and nitrate during austral summer in the Scotia sea. *Deep-Sea Res.*, 29 (7a), pp. 837-850.
- Glibert P.M., Goldman J.C., Carpenter E.J., (1982). Seasonal variations in the utilization of ammonium and nitrate by phytoplankton in Vineyard Sound, Massachusetts. *Mar. Biol.*, 70, pp. 237-249.
- Glibert P.M., Lipschultz F., McCarthy J.J., Altabet M.A., (1982). Isotope dilution models of uptake and remineralization of ammonium by marine plankton. *Limnol. Oceanog.*, 27, pp. 639-650.
- Gordon L.I., Jennings J.C., Ross J.A.A., Krest J.M., (1993). A suggest protocol for continuous flow automated analysis of seawater nutrients in the WOCE hydrographic program and the Joint Global Ocean Fluxes Study. WOCE hydrographic program office, Methods manual, section NNNNNNN.
- Grasshoff K., (1964). Zur Bestimmung von Nitrat in Meer- und Trinkwasser. *Kieler Meeresforsch.*, 20 (1), pp. 5-11.
- Grasshoff K., (1969). A multiple channel system for nutrient analysis in seawater with analog and digital data record. *Advances in automated analysis. Technicon Int. Symposium Chicago*, p. 133-145.
- Grasshoff K., (1983). Methods of seawater analysis. in Grasshoff K., Ehrhardt and Kremling (Eds.), *Methods of seawater analysis*, 2nd edn., Verlag Chemie, Weinheim.
- Griess J.P., (1864). *Philos. Trans. R.S. (London)*, p. 679.
- Griess J.P., (1879). Bemerkungen zu der Abandlung der H.N. Weselsky und Benedikt 'Über einige Azoverbindungen'. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 12, pp. 426.
- Guillard R.L., Kilham P., Jackson T.A., (1973). Kinetics of SI-limited growth in marine diatom *Thalassiosira pseudonana* hasle and hermdal. (*Cyclotella nana* Hustedt). *J. Phycol.*, 9, pp. 233-237.
- Guillaud J.F., Aminot A., Menesguen A., (1992). Urban wastewater disposal and eutrophication risk assesment in the coastal zone. *Wat. Sci. Tech.*, 25(12), pp. 77-86.
- Hafsaoui M., (1984). Fertilisation d'un système eutrophe à forte variabilité saisonnière et annuelle (rade de Brest). Mise en évidence des facteurs limitants de la production phytoplanctonique. Assimilation simultanée

des différentes formes d'azote inorganique et organique. Thèse de 3<sup>ème</sup> cycle, Université de Bretagne Occidentale, Brest, 334 p.

Hager S.W., Atlas E.L., Gordon L.I., Mantyla A.W., Park P.K., (). A comparison at sea of manual and autoanalyser analyses of phosphate, nitrate and silicate. *Deep-Sea Res.*, , pp-931-937.

Hall F.R., (1970). Dissolved solids-discharge relationships, I-Mixing models. *Water Resour. Res.*, 6 (3), pp. 845-850.

Hansen J., (1992). Prey size selection, feeding rates and growth dynamics of heterotrophic dinoflagellates with special emphasis on *Gyrodinium spirale*. *Mar. Biol.*, 114, pp. 327-334.

Harrison W.G., (1983). Use of isotopes. In : Nitrogen in marine environment. Eds : Carpenter E.J., Capone D.G., Academic press, 900 p.

Harrison W.G., Head E.J.H., Conover R.J., Longhurst A.R., Sameoto D.D., (1985). The distribution and metabolism of urea in the eastern Canadian Arctic. *Deep-Sea Res.*, 32, pp. 23-42.

Harrison W.G., Platt T., Lewis M.L., (1987). f-ratio and its relationship to ambient nitrate concentration in coastal waters. *J. Plankton Res.*, 9 (1), pp. 235-248.

Harrison W.G., Wood L.J.E., (1988). Inorganic nitrogen uptake by marine picoplankton : evidence for size partitioning. *Limnol. Oceanogr.*, 33 (3), pp. 468-475.

Harvey H.W., (1926). Nitrate in the sea. *J. Mar.Biol.Ass. U.K.*, 14, pp. 71-88.

Harvey H.W., (1930). Nitrate in the sea. II. *J. Mar.Biol.Ass. U.K.*, 15, pp. 183-190.

Henriksen A., (1965). An automatic method for determining nitrate and nitrite in fresh and saline waters. *Analyst*, 90, pp. 83-88.

Henriksen A., Selmer-Olsen A.R., (1970). Automatic method for the determining nitrate and nitrite in water and soil extracts. *Analyst*, 95, pp. 514-518.

Horrigan S.G., Montova J.P., Nevins J.L., McCarthy J.J., Ducklow H., Goericke R., Malone T., (1990). Nitrogenous nutrient transformations in the spring and fall in the Chesapeake Bay. *Est. Coast. Shelf Sci.*, 30, pp. 369-391.

Huxley J.R. and Wisel D., (1974). A review of methods for the determination of nitrate in waters. In : Examination of waters : evaluation of methods for selected characteristics (Ed. McGlynn J.A.), Australian Government Publishing Service, Canberra, 109 p.

Hydes D.J. and Hill N.C., (1985). Determination of nitrate in seawater : nitrate to nitrite reduction with copper-cadmium alloy. *Est. Coast. Shelf Science*, 21, pp. 127-130.

Ilosvay M.L., (1889). *Bull. Soc. Chim.*, 2, 388.

Isaeva A.B., (1956). *Trud. Inst. Okeanol. Adad. Nauk S.S.S.R.*, 26, pp. 234.

Jacq E., Quéguiner B, Prieur D., Tréguer P., (1985). Modification de l'aspect des peuplements bactériens en relation avec un bloom phytoplanctonique en Rade de Brest. *Oceanis*, 11, pp. 213-222.

James A.T., Martin A.J.P., (1952). *Analyst*, 77, p. 915.

Jenkins D. and Medsker L.L., (1964). *Anal. Chem.*, 36, pp. 611.

Johnson K.S. and Petty R.L., (1983). Determination of nitrate and nitrite in seawater by flow injection analysis. *Limnol. Oceanogr.*, 28(6), pp. 1260-1266.

- Johnson K.S., Beehler C.L. and Sakamoto-Arnold C.M., (1986). A submersible flow analysis system. *Anal. Chim. Acta.*, 179, pp. 245-257.
- Johnson K.S., Sakamoto-Arnold C.M. and Beehler C.L., (1989). Continuous determination of nitrate concentrations in situ. *Deep-Sea Res.*, 36, pp. 1407-1413.
- Kanda J., Saino T., Hattori A., (1985). Nitrogen uptake by natural populations of phytoplankton and primary production in the Pacific Ocean : regional uptake capacity. *Limnol. Oceanog.*, 30, pp. 987-999.
- Kaufman Z.G., Lively J.S., Carpenter E.J., (1983). Uptake of nitrogenous nutrients by phytoplankton in a barrier island estuary : Great South Bay, N.Y. *Est. Coast. Shelf Sci.*, 17, pp. 483-493.
- Keay J., Menage P.M.A. (1970). *Analyst*, 95, p. 379.
- Keeney K.E., Byrnes B.H., Genson J.J., (1970). *Analyst*, 95, pp. 383.
- Koike I., Holm-Hansen O., Biggs D.C., (1986). Inorganic nitrogen metabolism by Antarctic phytoplankton with special reference to ammonia cycling. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 30, pp. 105-116.
- Koroleff F., (1970). Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. Revised version of I.C.E.S., C.M. 1969/C:9, Interlab. Rep., 3, pp. 19-22.
- Koupparis M.A., Walczak K.M., Malmstadt H.V., (1982). Automated determination of nitrate in waters with reduction column in a microcomputer-based stopped-flow sample processing system. *Anal. Chim. Acta*, 142, pp. 119-127.
- Kristiansen S., (1983). Urea as a nitrogen source for the phytoplankton in the Oslo fjord. *Mar. Biol.*, 74, pp. 17-24.
- Kristiansen S., Lund B.A., (1989). Nitrogen cycling in the Barents Sea. I. Uptake of nitrogen in the water column. *Deep-Sea Res.*, 36, pp. 255-268.
- Kuenzler E.J., Stanley D.W., Koenings J.P., (1979). Nutrient kinetics of phytoplankton in the Pamlico river, North Carolina. Water Resources Research Institute of the University of North Carolina, project No. B-092-NC.
- L'Helguen S., Madec C., Le Corre P., (1993). Nutrition azotée du phytoplankton dans les eaux brassées de la Manche occidentale. *Oceanol. Acta*, 16 (5-6), pp. 653-660.
- Lambert J.L., Zitomer F., (1960). *Anal. Chem.*, 32, pp. 1684.
- Langmuir D., Jacobson R.L., (1970). *Environ. Sci. Tech.*, 4, pp. 834.
- Le Bouteiller A. (1986). Environmental control of nitrate and ammonium uptake by phytoplankton in the Equatorial Atlantic Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 30, pp. 167-179.
- Le Bouteiller A. (1993). Comparison of in-bottle measurements using  $^{15}\text{N}$  and  $^{14}\text{C}$ . *ICES mar. Sci. Symp.*, 197, pp. 121-131.
- Le Jehan S., (1982). Contribution à l'étude des matières organiques et nutritives dissoutes dans deux écosystèmes eutrophes : cycle de l'azote, du phosphore et du silicium. Thèse de 3<sup>ème</sup> cycle, Université de Bretagne Occidentale, Brest, 236 p.
- Lignell R., (1992). Problems in filtration fractionation of  $^{14}\text{C}$  primary productivity samples. *Limnol. Oceanogr.*, 37, pp. 172-178.



- Loder T.C., M. Glibert P.M., (1976). Blank and salinity corrections for automated nutrient analysis of estuarine and sea waters. 7th Technicon International Congress, December 13-15 1976 New York. pp. 48-56.
- Logan B.E., (1993). Theoretical analysis of size distribution determined with screens and filters. *Limnol. Oceanogr.*, 38, pp. 372-381.
- Madsen B.C., (1981). Utilization of flow injection with hydrazine reduction and photometric detection for the determination of nitrate in rain-water. *Anal. Chim. Acta*, 124, pp. 437-441.
- Maestrini S.Y., Robert J.M., Truquet I., (1982). Simultaneous uptake of ammonium and nitrate by oster-pond algae. *Mar. Biol. Letts.*, 3, pp. 143-153.
- Malone T.C. (1977). Light-saturated photosynthesis by phytoplankton size fractions in the New York Bight, USA. *Mar. Biol.*, 42, pp. 281-292.
- Malone T.C. (1980). Algal size. In : *The physiological ecology of phytoplankton*. Ed : Morris I. Blackwell, London.
- Manczak H., Florczik H., (1971). Interpretation of results from studies of pollution of surface flowing water. *Water Res.*, 5 (8), pp. 575-584.
- Martinat J., (1992). Capteurs et industrie. Le progrès technique, Fév. 1992.
- Materne M., Petiau L.M., Van Damme P., (1991). Le cycle de l'azote et les nitrates dans l'eau. *Tribune de l'eau*, 551(3), pp. 33-45.
- McCarthy J.J., (1981). The kinetics of nutrient utilization. In : *Physiological bases of phytoplankton ecology*. Ed : T. Platt. *Can. Bull. Fish. aquat. Sci.*, 210, pp. 211-233.
- McCarthy J.J., Taylor W.R., Taft J.L., (1977). Nitrogenous nutrition of the plankton in the Chesapeake Bay. I. Nutrient availability and phytoplankton preferences. *Limnol. Oceanogr.*, 22(6), pp. 996-1011.
- McDonald J.C., Haddad L., (1970). *Environ.Sci. Technol.*, 4, pp. 676.
- McIsaac J.J., Dugdale R.C., (1969). The kinetics of nitrate and ammonia uptake by natural populations of marine phytoplankton. *Deep-Sea Res.*, 16, pp. 45-57.
- McIsaac J.J., Dugdale R.C., Barber R.T., Balsco D., Packard T.T., (1985). Primary production cycle in an upwelling center. *Deep-Sea Res.*, 32, pp. 503-529.
- McIsaac J.J., Dugdale R.C., Slawyk G., (1974). Nitrogen uptake in the northwest Africa upwelling area : results from the Cineca-Charcot II cruise. *Téthys*, 6, pp. 69-76.
- Meybeck M., Helmer R., (1989). The quality of rivers : from pristine stage to global pollution. *Palaeogeo. Paleoclim. Paleoecol.*, 75, pp. 283-309.
- Meyer C., Hirel B., Morot-Gaudry J.F., Caboche M., (1993). L'utilisation de l'azote par les plantes. *La recherche*, 257(24), pp. 956-962.
- Middleton K.R., (1957). *Chem. and Ind. (London)*, 34, p. 1147.
- Morelli J., Girart-Reydet L., Marchal T., Masniere P., Fedoroff M., Rouchaud J.C., Debove L., Carlier P., (1984). Fluctuations temporelles fines de la composition chimique de l'aérosol côtier. Third european symposium on physical-chemical behaviour of atmospheric pollutants, Varèse (Italy).
- Morris A.W., Riley J.P., (1963). The determination of nitrate in sea water. *Anal. Chim. Acta*, 29, pp. 272-279.

- Mullin J.B., Riley J.P., (1955). The spectrophotometric determination of nitrate in natural waters with particular reference to sea water. *Anal. Chim. Acta*, 12, pp. 464.
- Mullin J.B., Riley J.P., (1965). The spectrophotometric determination of silicate-silicon in natural waters with special reference to seawater. *Anal. Chim. Acta*, 46, pp. 491-501.
- Murphy J., Riley J.P., (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta*, 27, pp. 31-36.
- Nagy G., Feher Z.S., Pungor E., (1970). Application of silicone rubber-based graphite electrodes for continuous flow measurements. Part II. Voltametric study of active substances injected into electrolyte streams. *Anal. Chim. Acta*, 52, p. 57.
- Nedwell D.B., (1982). Exchange of nitrate and the products of nitrate reduction between seawater and sediment from an UK saltmarsh. *East. Coast. Shelf Sci.*, 14, pp. 557-566.
- Nelson D.M., Conway H.L., (1979). Effects of the light regime on nutrient assimilation by phytoplankton in the Baja California and northwest Africa upwelling systems. *J. Mar. Res.*, 37, pp. 301-318.
- Nelson J.L., Kurtz L.T., Bray R.H., (1954). *Anal. Chem.*, 26, pp. 1081.
- Nixon S.W., (1993). Nutrients and coastal waters : too much of a good thing? *Oceanus*, Summer, pp. 38-47.
- Norwitz G., Keliher P.N., (1984). Spectrophotometric determination of nitrite with composite reagents containing sulfanilamide, sulfanilic acid or 4-nitroaniline as the diazotisable aromatic amine and N-(1-naphthyl)ethylenediamine as the coupling agent. *Analyst*, 109, pp. 1281-1286.
- Norwitz G., Keliher P.N., (1985). Study of interferences in the spectrophotometric determination of nitrite using composite diazotation - coupling reagents. *Analyst*, 110, pp. 689-694.
- Norwitz G., Keliher P.N., (1986). Study of organic interferences in the spectrophotometric determination of nitrite using composite diazotation - coupling reagents. *Analyst*, 111, pp. 1033-1037.
- Nydahl F., (1976). On the optimum conditions for the reduction of nitrate to nitrite by cadmium. *Talanta*, 23, pp. 349-357.
- O'Brien J.E., Fiore J., (1962). "Robost Chemist" determines nitrates in sewage and wastes. *Wastes Engng.*, 33, pp. 128-132.
- Odum E.P., (1976). *Ecologie*. Editions HRV. Montreal - Québec : 252 pp.
- Olson R.J., (1980). Nitrate and ammonium uptake in antarctic waters. *Limnol. Oceanog.*, 25 (6), pp. 1064-1074.
- Otsuki A., (1978). A reactivation solution for a copperized cadmium column in the automatic determination of nitrate in natural waters. *Anal. Chim. Acta*, 99, pp. 375-377.
- Oudot C., Montel Y., (1988). A high sensitivity method for the determination of nanomolar concentrations of nitrate and nitrite in seawater with a Technicon AutoAnalyser II. *Mar. Chem.*, 24, pp. 239-252.
- Paasche E. and Kristiansen S., (1982). Nitrogen nutrition of the phytoplankton in the Oslo fjord. *Est. Coast. Shelf Sci.*, 14, pp. 237-249.



- Parker R.A., (1993). Dynamic models for ammonium inhibition of nitrate uptake by phytoplankton. *Ecological modelling*, 66, pp. 113-120.
- Pennock J.R., (1987). Temporal and spatial variability in phytoplankton ammonium and nitrate uptake in the Delaware estuary. *Est., Coast. and Shelf Sci.*, 24, pp. 841-857.
- Pettersson K., (1991). Seasonal uptake of carbon and nitrogen and intracellular storage in planktonic organisms in the Skagerrak. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 151, pp. 121-137.
- Pettersson K., Sahlsten E. (1990). Diel patterns of combined nitrogen uptake and intracellular storage of nitrate by phytoplankton in the open Skagerrak. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 138, pp. 167-182.
- Pirou J.Y., (1990). Marées vertes littorales et nitrates. In : *Nitrates, agriculture, eau*, Paris. pp. 113-120.
- Pözl L., Reiter R., (1960). Eine einfache Methode zur Bestimmung von nitrate-Ionen im atmosphärischen Niederschlag und in Aerosol-Kondensaten mit Anwendung auf Probleme der Luftelektrizität während Niederschlägen. *Z. Aerosol Forsch. Ther.*, 8, pp. 252-264.
- Price J.B., Priddy R.R., (1959). Colorimetric determinations of nitrite and nitrate nitrogen in brackish waters. *Bull. mar. Sci. Gulf. Caribb.*, 9, pp. 310-314.
- Price N.M., Cochlan W.P., Harrison P.J., (1985). Time course of uptake of inorganic nitrogen by phytoplankton in the strait of Georgia : comparison of frontal and stratified communities. *MAR. ECOL. PROG. SER.*, 27, pp. 39-53.
- Prieur L., Copin-Montégut C., Claustre H., (1993). Biophysical aspects of "ALMFRONT-1", an intensive study of geostrophic frontal jet. *Ann. Inst. Océanogr.*, Paris, 69 (1), pp. 71-86.
- Probst J.L., (1985). Nitrogen and phosphorus exportation in the Garonne basin (France). *J. of hydrology*, 76, pp. 281-305.
- Probyn T.A., (1985). Nitrogen uptake by size-fractionated phytoplankton populations in the southern Benguela upwelling system. *MAR. ECOL. PROG. SER.*, 22, pp. 249-258.
- Probyn T.A., (1988). Nitrogen utilization by phytoplankton in the Namibian upwelling region during an austral spring. *Deep-Sea Res.*, 35, pp. 1387-1404.
- Quéguiner B., (1982). Variations qualitatives et quantitatives du phytoplancton dans un écosystème eutrophe fortement soumis aux effets des marées : la rade de Brest. Thèse de 3<sup>ème</sup> cycle, Université de Bretagne Occidentale, Brest, 123 p.
- Quéguiner B., (1988). Synthèse scientifique du programme pluriannuel 1983-1988 de la commission quadripartite chargée de l'aménagement halieutique et de la protection hydrobiologique de la Baie de Quiberon-Vilaine. Université de Bretagne Occidentale, Brest, 134 p.
- Quéguiner B., Tréguer P., (1984). Studies on the phytoplankton in the Bay of Brest (Western Europe). Seasonal variations in composition, biomass and production in relation to hydrological and chemical features (1981-1982). *Botanica Mar.*, 27, pp. 449-459.
- Ragueneau O., (1994). La dynamique du phytoplancton en écosystèmes côtiers macrotidaux : couplage avec l'hydrodynamique et le cycle biogéochimique du silicium. Thèse de 3<sup>ème</sup> cycle, Université de Bretagne Occidentale, Brest, 334 p.

Raimbault P., Slawyk G., Coste B., Fry J., (1990). Feasability of using an automated colorimetric procedure for the determination of seawater nitrate in the 0 to 100 nM range : examples from field and culture. *Mar. Biol.*, 104, pp. 347-351.

Raven J.A., (1980). Nutrient transport in microalgae. In : *advances in microbial physiology* (Eds : A.H. Rose, Morris J.G.), Academic Press, London, pp. 47-266.

Réseau National d'Observation de la Qualité du Milieu Marin. Recueil des observations. Campagnes 1977. Ministère de l'environnement/CNEXO.

Ruzicka, J., Hansen, E.H., (1975). Flow Injection Analysis. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Anal. Chim. Acta*, 78; p. 145.

Sahlsten E., Sörensson F., Pettersson K., (1988). Planktonic nitrogen uptake in the south-eastern Kattegat. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 121, pp. 227-246.

Sakamoto-Arnold C.M., Johnson K.S., Beehler C.L., (1986). Determination of hydrogen sulfide in seawater using flow injection analysis and flow analysis. *Limnol. Oceanog.*, 31(4), pp. 894-900.

SAUM de la rade de Brest, (1980). Rapport final. Ministère de l'environnement-Ministère des transports-DDE Brest, 197 p.

Scudlark J.R., Church T.M., (1993). Atmospheric input of inorganic nitrogen to Delaware bay. *Estuaries*, 16(4), pp. 747-759.

Shinn M.B., (1941). Colorimetric method for determination of nitrite. *Ind. Engng. Chem., Analytical Edn*, 13, pp. 33-35.

Skeggs L.T., (1957). *Am. J. Clin. Pathol.*, 28, p. 311.

Slawyk G., (1979).  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  uptake by phytoplankton in the Antarctic upwelling area : results from the Antiprod I cruise in the Indian Ocean sector. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 30, pp. 431-438.

Slawyk G., Collos Y., Minas M., (1978). On the relationship between carbon-to-nitrogen composition ratios of the particulate matter and growth rate of marine phytoplankton from the northwest African upwelling area. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 33, pp. 119-131.

Smayda T.J., (1990). Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea : evidence for a global epidemic. In : *Toxic marine phytoplankton*. (Eds : E. Granelli et al.), pp. 29-40.

Smetacek V., Bathmann U., Nöthing E.M., Scharek R., (1991). Coastal eutrophication : causes and consequences. In : *Ocean margin processes in global change*. (Eds : Mantoura et al.), pp. 251-279.

Snyder L.R., Kirkland J.J., (1979). *Introduction to modern Liquid Chromatography*, 2nd edn., Wiley, New York, chap. 17.

Souchu P., (1986). Contribution à l'étude du cycle de l'azote en écosystème macrotidal. Thèse de 3<sup>ème</sup> cycle, Université de Bretagne Occidentale, Brest, 124 p.

Stainton M.P., (1974). Simple, efficient reduction column for use in the automated determination of nitrate in water. *Anal. Chem.*, 46(11), pp. 1616.

Standard methods for the examination of water and wastewater, 12 th ed, American Public Health Association, Inc., New York, NY, (1965).

Stewart K.K., Beecher G.R., Hare P.E., (1976). Rapid analysis of discrete samples. The use of nonsegmented continuous flow. *Anal. Biochem.*, 70, p. 167.

Strickland J.D.H., Parsons T.R., (1965). A manual of seawater analysis, Bul. 125, 2<sup>nd</sup> ed., Fisheries Research Board of Canada, Ottawa.

Strickland J.D.H., Parsons T.R., (1972). A practical handbook for analysis of seawater, Bul. 167, Fisheries Research Board of Canada, Ottawa.

Syrett P.J., (1981). Nitrogen metabolism of microalgae. In : Platt T., (Ed.) Physiological bases of phytoplankton ecology, Bull. No. 210, Canadian Government Publishing Center, Hull, Quebec, Canada, pp. 182-210.

Technicon Industrial Method 43-67W, (1970). Nitrate + nitrite in sea water. Technicon Industrial Systems, Tarrytown, NY.

Thomas O., (1991). Analyse spectrale ultraviolette pour le contrôle de la qualité des eaux. *Analisis*, 19 (2), pp. 39-41.

Thomas O., Gallot S., Mazas N., (1990). Ultraviolet multiwavelength absorptiometry (UVMA) for the examination of natural waters and wastewaters. Part II : Determination of nitrate. *Fresenius J Anal Chem*, 338, pp. 238-240.

Timmer-Ten Hoor A., (1974). Sulfide interaction on colorimetric nitrite determination. *Mar.Chem.*, 2, pp. 149-151.

Tréguer P., Le Corre P., (1975). Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer. Utilisation de l'auto-Analyseur II: Technicon, 2<sup>ème</sup> édition. Laboratoire d'Océanographie Chimique, Université de Bretagne Occidentale, Brest, pp.110.

Tréguer P., Quéguiner B., (1989). Seasonal variations in conservative and non conservative mixing of nitrogen compounds, in a Western European macrotidal estuary. *Oceanol. Acta*, 12, pp. 371-380.

Utermöhl M., (1931). Über das umgekehrte Mikroskop. *Arch. Hydrobiol., Beih., Ergebn. Plankt*, 22, pp. 643-645.

Van Bennekom A.J., Salomons W., (1981). Pathways of nutrients and organic matter from land to ocean through rivers. In : River inputs to ocean systems. (Eds : J.M. Martin et al.), UNEP/UNESCO, pp. 33-51.

Van Staden J.F., (1982). Automated simultaneous determination of nitrate and nitrite by pre-valve reduction of nitrate in a flow-injection system. *Anal. Chim. Acta*, 138, pp. 403-408.

Welz B., (1985). Atomic Absorption Spectrometry, 2nd edn., VCH, Weinheim.

Wheeler P.A., Glibert P.M., McCarthy J.J., (1982). Ammonium uptake and incorporation by Chesapeake Bay phytoplankton : short term uptake kinetics. *Limnol. Oceanog.*, 27, pp. 1113-1128.

Wheeler P.A., Kirchman D.L., (1986). Utilization of inorganic and organic nitrogen by bacteria in marine systems. *Limnol. Oceanog.*, 31, pp. 998-1009.

Wilkerson F.P., Dugdale R.C., Barber R.T., (1987). Effects of El Niño on new, regenerated, and total production in eastern boundary upwelling systems. *J. Geophys. Res.*, 92, pp. 14347-14353.

Willis R.B., (1980). Reduction column for automated determination of nitrate and nitrite in water. *Anal. Chem.*, 52, pp. 1376-1377.

Wood E.D., Armstrong F.A., Richards F.A., (1967). Determination of nitrate in sea water by cadmium-copper reduction to nitrite. *J. mar. biol. ass. U.K.*, 47, pp. 23-31.

Worsfold P.J., Clinch J.R., Casey H., (1987). Spectrophometric field monitor for water quality parameters : the determination of phosphate. *Anal. Chim. Acta*, 197, pp. 43-50.

Wroblewski J.S., (1977). A model of phytoplankton plume formation during variable Oregon upwelling. *J. Mar. Res.*, 35, pp. 357-394.

Yentsch C.S., Menzel D.W., (1963). A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and pheophytin by fluorescence. *Deep-Sea Res.*, 10, pp. 221-231.

Zagatto E.A.G., Jacintho A.O., Mortatti J., Bergamin F<sup>o</sup> H., (1980). An improved flow injection determination of nitrite in waters by using intermittent flows. *Anal. Chim. Acta*, 120, pp. 399-403.

Zwicker B.M.G., Robinson R.J., (1944). The photometric determination of nitrate in sea water with a strychnidine reagent. *J.Mar.Res.*, 5, pp. 214-232.

## **Annexe 1**

**Tableau de données des paramètres physiques, chimiques, biologiques et de production mesurés dans les eaux de surface de R3 entre 1991 et 1993**

		NO3	NH4	Urée	Si(OH)4	PO3	COP	NOP	chloro	phéo	oNo3	oNh4	o Uree	oC	O2	t° eau	salinité
		μM	μM	μM	μM	μM	μmol/l	μmol/l	μg/l	μg/l	μmol/l/h	μmol/l/h	μmol/l/h	μmol/l/h	%	°C	PSU
18/02/91	48	29.7	0.60		23.30	0.66	7.29	0.62	0.30	0.00					104.9	6.300	33.75
4/03/91	62	28.5	0.56		11.30	0.56	18.63	0.96	0.62	0.14				0.22	110.6	9.900	33.75
7/03/91	65	29.7	0.83		10.70	0.55	5.47	0.87	0.34	0.43				0.13	107.0	8.800	33.53
11/03/91	69	34.5	0.64		14.10	0.66	3.92	0.81	0.73	0.66				0.17	102.0	8.900	33.44
14/03/91	72	42.5	0.86		14.30	0.67	4.17	0.83	0.83	0.18				0.10	116.0	9.800	33.00
18/03/91	76	25.5	0.94		33.24	0.63	13.15	1.50	0.64	0.48				0.27	102.0	9.400	33.35
20/03/91	78	32.5	0.79		11.45	0.65	7.75	1.18	0.67	0.50				0.19	101.0	9.600	33.35
25/03/91	83	64.4	0.78		17.70	0.62		1.31	0.75	0.66				0.02	101.0	9.400	31.06
28/03/91	86	66.0	0.82		13.50	0.40	10.72	1.51	0.60	0.43	0.023	0.007		0.17	103.0	9.500	32.14
2/04/91	91	35.3	0.42		9.40	0.77	13.84	1.95	1.05	0.40	0.016	0.007		0.24	112.0	9.700	33.30
5/04/91	94	29.7	0.41		8.75	0.49	15.40	2.20	0.73	0.45	0.012	0.010		0.35		9.600	33.84
8/04/91	97	28.8	0.38		18.80	0.45	11.97	1.87	1.01	0.54	0.007	0.004		0.35	123.0	10.200	33.44
11/04/91	100	33.4	0.39		8.75	0.36	18.47	2.98	2.13	0.48	0.066	0.015		0.85	118.0	10.700	32.76
15/04/91	104	21.7	0.41		7.13	0.33	25.36	3.21	4.12	0.63	0.035	0.017		1.24	116.0	10.600	33.35
18/04/91	107	15.7	0.24		4.11	0.26	31.01	3.23	5.24	0.77	0.060	0.015		1.67	117.0	9.800	33.57
22/04/91	111	13.9	0.46		0.00	0.13	36.84	5.34	7.74	0.38	0.165	0.031		2.96	121.0	10.200	33.39
25/04/91	114	13.4	0.38		0.22	0.07	47.26	5.37	9.00	0.09	0.043	0.012		1.95	124.0	10.500	33.44
29/04/91	118	9.5	0.44		0.00	0.05	31.60	3.95	5.42	1.35	0.059	0.022		1.58	127.0	10.800	34.06
6/09/91	248	1.5	0.52		2.56	0.16	11.09	1.87	2.79	1.08					120.1	17.900	35.30
13/09/91	255	2.6	0.66		2.74	0.15	13.51	2.75	2.13	0.18					100.0	18.000	35.53
20/09/91	262	1.3	0.11		2.92	0.09	14.35	1.75	5.40	1.37					98.1	17.650	35.29
4/10/91	276	2.2	0.77		5.78	0.31	15.86	2.41	1.28	0.80					92.9	16.500	35.29
11/10/91	283	2.9	1.82		6.98	0.73	9.75	1.68	0.98	0.96					90.2	15.600	35.29
21/10/91	293	9.1	2.60		8.80	0.51	8.11	1.89	1.10	0.63					107.7	13.700	34.76
28/10/91	300	6.5	1.69		6.85	0.47	6.82	1.28	0.75	0.43							35.03
4.11.91	307	10.7	2.00		9.04	0.60	7.78	1.15	0.58	0.42	0.0010	0.0067		0.10	94.1	12.600	34.76
21.11.91	324	32.8	2.60		11.68	0.70	16.02	1.61	0.67	0.64	0.0020	0.0017			96.9	10.000	33.59
26.11.91	329	28.1	2.05		11.25	0.62	9.91	1.23	0.60	0.42	0.0014	0.0035		0.06	101.3	11.090	33.68
4.12.91	337	32.6	1.49		9.78	0.57	6.93	1.12	0.50	0.35	0.0003	0.0031		0.06	98.4	10.620	34.13
9.12.91	342	30.0	1.07		8.92	0.56	6.74	0.90	0.59	0.41	0.0007	0.0015			102.1	9.300	34.13
7.01.92	371	15.5	0.76		6.17	0.47	8.29	2.02	0.63	0.40	0.0018	0.0037		0.05	102.1	9.630	34.82
24.01.92	388	16.4	0.82		5.83	0.45	10.08	1.76	0.50	0.46	0.0016	0.0056		0.06	101.8	8.340	34.85
4.02.92	399	8.9	0.78		5.46	0.47	7.55	1.56	0.55	0.37	0.0010	0.0056		0.05	104.0	7.940	34.87
17.02.92	412	26.8	1.14		8.98	0.62	11.12	2.28	0.59	0.50	0.0027	0.0127		0.06	101.6	8.100	33.49
03.03.92	427	20.0	0.31		5.31	0.50	8.09	2.63	1.02	0.63	0.0036	0.0066		0.08	107.5	9.090	34.31
9.03.92	433	16.2	0.50		4.06	0.44	8.21	1.43	1.18	0.77	0.0042	0.0108		0.10		9.690	34.42
16.03.92	440	19.8	0.17		3.92	0.35	10.73	1.60	0.80	0.42	0.0028	0.0017		0.05	104.1	10.150	34.15
25.03.92	449	15.7	0.50		3.59	0.45	11.11	1.12	1.42	0.64	0.0040	0.0065		0.14	101.8	10.180	34.60
1.04.92	456	14.8	0.53			0.39	14.76	3.04	1.30	0.50	0.0213	0.0175		0.14	102.8	9.600	34.76
6.04.92	461	10.0	0.36		2.79	0.31	12.01	1.44	2.18	1.18	0.0168	0.0060		0.32	100.7	9.650	34.80
9.04.92	464	11.5	0.33		2.52	0.26	17.61	2.78	3.34	2.26	0.0319	0.0061		0.81	106.9	10.020	34.51
13.04.92	468	6.3	0.32		0.65	0.11	27.88	4.69	8.97	3.00	0.0569	0.0076		0.93		10.530	34.69
16.04.92	471	5.4	0.40		0.60	0.17	24.49	3.22	4.25	1.02	0.0155	0.0073		0.56	107.4	10.160	34.87
21.04.92	476	6.7	0.57		0.53	0.18	13.58	2.10	2.12	0.36	0.0403	0.0040		0.43	108.9	10.810	34.80
23.04.92	478	7.1	0.47		0.57	0.17	14.91	2.18			0.0374	0.0051		0.42	111.8	11.140	34.98
30.04.92	485	6.2	0.37		0.50	0.09	23.00	3.81	7.08	1.30	0.0317	0.0063		1.21	109.9	11.610	34.40
5.05.92	490	4.7	0.05		0.45	0.09	21.28	3.27	6.26	1.06	0.0460	0.0012		0.57	114.2	11.790	34.62
14.05.92	499	3.9	0.23			0.08	37.62	4.23	8.36	1.10	0.0386	0.0084		0.49	122.3	12.860	34.29
20.05.92	505	5.7	0.32		0.78	0.06	31.63	2.85	2.56	0.57		0.0245		0.29	120.7	14.050	34.78



		NO3	NH4	Urée	Si(OH)4	PO3	COP	NOP	chloro	phéo	oNo3	oNh4	o Uree	oC	O2	t° eau	salinité
		μM	μM	μM	μM	μM	μmol/l	μmol/l	μg/l	μg/l	μmol/l/h	μmol/l/h	μmol/l/h	μmol/l/h	%	°C	PSU
4.06.92	520	0.1	0.76		0.95	0.04	15.70	2.27	1.38	0.48	0.0035	0.0533		0.30	114.2	16.020	35.10
10.06.92	526	0.8	0.50		0.36	0.04	18.03	2.75	2.22	0.50	0.0353	0.0188		0.57	109.2	15.380	35.38
16.06.92	532	2.6	0.30		0.44	0.09	21.33	2.84	1.82	0.54	0.0952	0.0112		0.37	114.7	16.510	35.25
1.07.92	547	1.0	0.20		1.00	0.13	23.83	2.58	2.37	0.60	0.0094	0.0050			112.5	17.140	35.34
26.08.92	603	1.3	1.56		4.84	0.36	8.04	0.84	0.64	0.33	0.0012	0.0129			143.3	17.700	35.24
10.09.92	618	3.5	0.75		3.93	0.32	10.64	1.49	2.40	0.50	0.0399	0.0088		0.15	99.9	16.150	35.13
24.09.92	632	5.0	0.97		4.53	0.36	8.40	1.09	1.02	0.71	0.0034	0.0064		0.15	97.0	15.800	35.04
8.10.92	646	7.4	1.90		6.72	0.45	9.13	1.00	0.66	0.50	0.0012	0.0059		0.15	100.5	14.100	34.43
22.10.92	660	6.0	0.73		17.17		7.44	0.77	0.79	0.00	0.0012	0.0046		0.15	142.0	13.050	34.10
23.11.92	692	15.0	1.50		17.17		5.95	0.52	0.34	0.73	0.0003	0.0013		0.15	99.5	11.700	33.50
15/02/93	776	49.4	0.65		18.42	0.55	17.56	1.45	1.14	0.74	0.0092	0.0083		0.15	102.2	9.853	32.59
3/03/93	792	30.7	0.65	0.19	6.68	0.45	9.61	0.98	0.61	0.31	0.0037	0.0011	0.0042	0.13	100.4	8.231	33.33
15/03/93	804	21.6	1.00	0.26	4.45	0.32	12.15	1.22	0.94	0.57	0.0132	0.0201	0.0100	0.16	106.8	10.134	33.72
29/03/93	818	10.3	0.55	0.77	1.92	0.26	12.08	1.23	0.91	0.25	0.0063	0.0052	0.0053	0.10	195.8	10.559	34.40
1/04/93	821	11.7	0.85	0.50	2.69	0.22	13.18	1.71	0.88	0.33	0.0202	0.0099	0.0099	0.12	108.6	10.559	34.27
5/04/93	825	10.1	0.45	1.19	2.61	0.17	10.40	1.37	0.65	0.33	0.0047	0.0048	0.0094	0.15	106.6	10.644	33.79
13/04/93	833	39.3	0.55	0.58	8.67	0.32	22.32	2.35	0.82	0.54	0.0116	0.0090	0.0104	0.27	105.3	11.764	31.84
15/04/93	835	24.9	0.35	0.72	6.29	0.20	22.87	2.86	1.54	0.46	0.0925	0.0124	0.0320	0.34	108.5	11.448	32.88
19/04/93	839	12.0	0.60	0.46	2.92	0.12	17.99	2.56	2.24	0.38	0.0985	0.0139	0.0051	0.64	109.3	11.900	34.02
27/04/93	847	25.3	0.10	0.53	0.00	0.02	25.53	2.44	6.70	0.80	0.1020	0.0010	0.0062	0.66	120.0	12.418	33.46
30/04/93	850	16.2	0.05	0.53	0.00	0.04	34.63	3.20	6.92	0.67	0.1130	0.0013	0.0038	0.28	121.7	12.899	33.18
3/05/93	853	6.0	0.35	0.53	0.00	0.02	31.65	3.11	7.03	1.55	0.0090	0.0066	0.0028	0.39	118.9	12.553	34.21
13/05/93	863	6.4	0.75	0.73	2.31	0.06	55.85	5.76	7.74	1.41	0.0896	0.0388	0.0047	0.11	119.1	13.897	34.03
18/05/93	868	1.9	0.35	0.85	1.86	0.00	29.61	3.48	1.10	2.96	0.0043	0.0037	0.0021	0.03	103.8	13.212	34.63
27/05/93	877	4.9	0.30	0.94	1.11	0.04	22.86	2.77	2.60	0.54	0.0324	0.0055	0.0064	0.44	106.8	14.182	34.42
14/06/93	895	6.4	0.25	0.68	0.85	0.03	22.96	2.84	3.47	0.74	0.0643	0.0086	0.0145	0.43		15.307	34.72
30/06/93	911	2.0	0.80	0.52	2.00		19.03	2.15	1.19	0.33	0.0702	0.0248	0.0200	0.12	108.4	16.398	34.96
13/07/93	924	0.7	0.22	0.43	1.15	0.05	17.46	2.11	1.62	0.52	0.0241	0.0060	0.0096	0.14	106.6	15.988	35.22
27/07/93	938	8.6	0.06	0.43	2.55	0.07	14.11	1.65	0.90	0.62	0.0257	0.0029	0.0114	0.20	109.0	16.244	35.24
12/08/93	954	2.3	0.34	0.44	2.29	0.09	16.79	2.14	1.78	0.84	0.0410	0.0101	0.0184	0.22	111.6	16.924	35.26
25/08/93	967	2.3	0.40	0.53	3.84	0.20	11.84	1.09	0.63	0.51	0.0294	0.0064	0.0072	0.08	103.4	16.051	35.34
09.09.93	982	0.0	0.65	0.49	2.32	0.17	14.35	1.57	0.96	0.40				0.12	107.9	16.210	35.36
23.09.93	996	9.7	0.96	0.55	10.08		16.35	2.11	0.77	0.47				0.32	100.3	15.859	34.12
07.10.93	1010	5.0	2.17	0.56	7.06		12.34	1.35	0.66	0.40				0.12	101.7	14.432	34.54
22.10.93	1025	25.7	1.36	0.59	12.12		14.95	1.79	0.47	0.55				0.09	102.3	12.729	33.36
18.11.93	1052	14.8	0.90	0.84	6.75		11.83	0.58	0.34	0.40				0.04	98.8	11.625	34.65
20.12.93	1084	13.8	1.03	1.01	6.53		11.91	0.76	0.28	0.35				0.02		10.321	34.49

## **Annexe 2**

**Tableau de données des paramètres chimiques, biologiques  
et de production mesurés dans la colonne d'eau à la station  
R3 en 1993**



	NO3 100% µM	NO3 25% µM	NO3 10% µM	NO3 1% µM	NO3 0% µM	NH4 100% µM	NH4 25% µM	NH4 10% µM	NH4 1% µM	NH4 0% µM	NOP 100% µmol/l	NOP 25% µmol/l	NOP 10% µmol/l	NOP 1% µmol/l	NOP fond µmol/l	V NO3 100% h-1	V NO3 25% h-1	V NO3 10% h-1	V NO3 1% h-1	V NO3 fond h-1	V NH4 100% h-1	V NH4 25% h-1	V NH4 10% h-1	V NH4 1% h-1	V NH4 fond h-1
15/fev/93	49.4	36.6	31.8	26.7	25.2	0.65	0.55	0.55	0.80	0.60	1.45					0.0063				0.0018	0.0057				0.0028
3/mar/93	30.7	30.8	24.4		22.5	0.65	0.70	0.75		0.70	0.98					0.0038				0.0011					
15/mar/93	21.6	19.8	18.1		18.1	1.00	0.45	0.50		0.60	1.22					0.0108				0.0007	0.0165				0.0008
29/mar/93	10.3	9.3	9.6		10.1	0.55	0.45	0.45		0.40	1.23	1.06				0.0051	0.0035			0.0006	0.0042	0.0066			0.0015
1/avr/93	11.7	9.5	10.1	12.6	14.2	0.85	0.55	0.60	0.80	0.45	1.71	3.56				0.0118	0.0063	0.0051	0.0006	0.0014	0.0058	0.0023	0.0039	0.0034	0.0031
5/avr/93	10.1	10.6	11.1	10.4	11.3	0.45	0.30	0.30	0.30	0.30	1.37					0.0034	0.0027	0.0018	0.0003	0.0003	0.0035	0.0012	0.0019	0.0007	0.0007
13/avr/93	39.3	15.9	13.6	14.2	11.7	0.55	0.40	0.30	0.30	0.30	2.35					0.0050	0.0039	0.0028	0.0006	0.0006	0.0038	0.0045	0.0031	0.0013	0.0011
15/avr/93	24.9	9.0	9.4		13.7	0.35	0.50	0.55		0.40	2.86	1.49				0.0323	0.0063	0.0007		0.0002	0.0043	0.0052	0.0043		0.0012
19/avr/93	12.0	7.6	9.4	8.1	9.9	0.60	0.60	0.50	0.45	0.50	2.56	1.74			2.71	0.0385	0.0334	0.0023	0.0004	0.0006	0.0054	0.0052	0.0036	0.0026	0.0042
27/avr/93	25.3	10.0	16.7	9.2	8.3	0.10	0.05	0.10	0.10	0.05	2.44	4.16		3.58	2.89	0.0418	0.0075	0.0208	0.0028	0.0020	0.0004	0.0006	0.0008	0.0005	0.0003
30/avr/93	16.2	17.5	11.2	8.7	11.5	0.05	0.05	0.05	0.05	0.10	3.20	4.59		3.47	0.00	0.0353	0.0111	0.0055	0.0030	0.0032	0.0004	0.0004	0.0002	0.0003	0.0002
3/mai/93	6.0	8.5	6.4	4.3	4.6	0.35	0.25	0.35	0.30	0.30	3.11	4.47		4.69	4.19	0.0029	0.0067	0.0041	0.0022	0.0013	0.0021	0.0013	0.0018	0.0014	0.0013
13/mai/93	6.4	3.5	2.2	1.4	1.2	0.75	0.25	0.25	0.25	0.30	5.76		7.05			0.0156	0.0109	0.0053	0.0008	0.0007	0.0067	0.0016	0.0018	0.0012	0.0010
18/mai/93	1.9	1.9	1.5	1.3	1.3	0.35	0.45	0.75	0.75	0.55	3.48	3.29	2.86		2.81	0.0012	0.0054	0.0010	0.0014	0.0014	0.0011	0.0022	0.0040	0.0052	0.0064
27/mai/93	4.9	25.4	6.0	11.8	10.7	0.30	0.16	0.27	0.34	0.24	2.77	4.10	2.98		1.72	0.0117		0.0132	0.0151	0.0087	0.0020	0.0014	0.0023	0.0015	0.0010
14/jun/93	6.4	1.8	1.7	2.1	2.2	0.25	0.20	0.39	0.44	0.52	2.84	4.05	2.94		3.15	0.0226	0.0040	0.0048	0.0003	0.0004	0.0030	0.0023	0.0043	0.0025	0.0030
30/jun/93	2.0	1.7	1.8	1.5	1.8	0.80	0.13	0.12	0.11	0.04	2.15	3.26	2.69	2.65	3.07	0.0326	0.0214	0.0231	0.0017	0.0051	0.0115	0.0024	0.0022	0.0021	0.0014
13/jul/93	0.7	0.6	1.8	0.8	1.2	0.22	0.25	0.20	0.19	0.18	2.11	2.65	2.85	1.93	2.87	0.0114	0.0087	0.0209	0.0013	0.0014	0.0028	0.0034	0.0027	0.0017	0.0015
27/jul/93	8.6	5.8	4.1		6.4	0.06	0.15	0.15		0.20	1.65		3.09		1.36	0.0156	0.0075	0.0035		0.0010	0.0018	0.0028	0.0026		0.0017
12/aout/93	2.3	3.0	2.9		1.4	0.34	0.35	0.41		0.60	2.14	2.95	2.66			0.0191	0.0254	0.0178		0.0009	0.0047	0.0059	0.0071		0.0024
25/aout/93	2.3	4.4	2.2		4.9	0.40	0.17	0.21		0.14	1.09	1.97	1.98		1.80	0.0270	0.0156	0.0044		0.0023	0.0059	0.0027	0.0033		0.0020

	o NO3 100% µmol/l/h	o NO3 25% µmol/l/h	o NO3 10% µmol/l/h	o NO3 1% µmol/l/h	o NO3 fond µmol/l/h	oNH4 100% µmol/l/h	oNH4 25% µmol/l/h	oNH4 10% µmol/l/h	oNH4 1% µmol/l/h	oNH4 fond µmol/l/h	oC Total µmol/l/h	oC 0.25 µmol/l/h	oC 0.10 µmol/l/h	oC 0.01 µmol/l/h	oC Fond µmol/l/h
15/fev/93	0.0092					0.0083					3.65		0.92		0.04
3/mar/93	0.0037					0.0011					3.19	1.93		0.03	0.02
15/mar/93	0.0132					0.0201					3.76	0.81	0.51		0.04
29/mar/93	0.0063	0.0037				0.0052	0.0069				2.33	0.75	0.29		0.02
1/avr/93	0.0202	0.0224				0.0099	0.0083				2.84	0.83	0.47	0.04	0.05
5/avr/93	0.0047					0.0048					3.57	1.35	1.15	0.09	0.04
13/avr/93	0.0116					0.0090					6.42	1.28	0.99	0.05	0.02
15/avr/93	0.0925	0.0093				0.0124	0.0077				8.06	1.59	0.73		0.07
19/avr/93	0.0985	0.0580			0.0016	0.0139	0.0090			0.0113	15.47	9.46	6.31	0.29	0.05
27/avr/93	0.1020	0.0313		0.0101	0.0057	0.0010	0.0025		0.0017	0.0009	15.90	11.48	9.35	0.20	0.05
30/avr/93	0.1130	0.0510		0.0104		0.0013	0.0017		0.0009		6.62				0.07
3/mai/93	0.0090	0.0301		0.0102	0.0056	0.0066	0.0058		0.0065	0.0053	9.36		0.32		0.11
13/mai/93	0.0896		0.0372			0.0388		0.0128			2.67	3.30		0.16	0.06
18/mai/93	0.0043	0.0178	0.0029		0.0039	0.0037	0.0073	0.0113		0.0179	0.82	0.66	0.84	0.13	0.09
27/mai/93	0.0324		0.0395		0.0151	0.0055	0.0056	0.0069		0.0018	10.54	6.62	3.86	0.09	0.05
14/jun/93	0.0643	0.0163	0.0140		0.0013	0.0086	0.0093	0.0125		0.0095	10.31	5.70	4.01	0.10	0.06
30/jun/93	0.0702	0.0698	0.0623	0.0044	0.0156	0.0248	0.0078	0.0060	0.0057	0.0044	2.86	1.15	1.13	0.08	0.07
13/jul/93	0.0241	0.0229	0.0594	0.0025	0.0040	0.0060	0.0090	0.0078	0.0033	0.0044	3.24	1.12	0.86	0.05	0.03
27/jul/93	0.0257		0.0109		0.0014	0.0029		0.0081		0.0023	4.75	1.87	1.06		0.03
12/aou/93	0.0410	0.0749	0.0474			0.0101	0.0173	0.0189			5.18	3.70	3.75	0.09	0.04
25/aou/93	0.0294	0.0307	0.0088		0.0041	0.0064	0.0053	0.0065		0.0035	1.95	1.00	0.68		0.03

## **Annexe 3**

**Tableau de données des paramètres biologiques et de production mesurés pour chaque classe de taille en surface à la station R3 en 1993**

	NO3 μM	NH4 μM	NOP 0.6-2 μm μmol/l	NOP 2-10 μm μmol/l	NOP >10 μm μmol/l	COP 0.6-2 μm μmol/l	COP 2-10 μm μmol/l	COP >10 μm μmol/l	COP total μmol/l	V NO3 0.6-2 μm h-1	V NO3 2-10 μm h-1	V NO3 >10 μm h-1	V NO3 total h-1	V NH4 0.6-2 μm h-1	V NH4 2-10 μm h-1	V NH4 >10 μm h-1	oNO3 0.6-2 μm μmol/h	oNO3 2-10 μm μmol/h	oNO3 >10 μm μmol/h	oNO3 total μmol/h
15/fev/93	49.4	0.65			0.10	1.45		5.31	17.56				0.063			0.0057				0.0092
3/mar/93	30.7	0.65			0.04	0.98		1.92	9.61				0.0038			0.0019				0.0037
15/mar/93	21.6	1.00	0.59	0.27	0.36	1.22		3.22	12.15	0.0069			0.0108	0.0028		0.0099	0.0037	0.0014	0.0080	0.0132
29/mar/93	10.3	0.55	0.54	0.35	0.34	1.23		2.07	12.08				0.0051	0.0060		0.0072			0.0037	0.0063
1/avr/93	11.7	0.85	1.06	0.20	0.45	1.71		5.35	13.18	0.0055	0.0093		0.0118	0.0089		0.0055	0.0036	0.0082	0.0084	0.0202
5/avr/93	10.1	0.45	0.66	0.28	0.43	1.37		6.01	10.40	0.0034	0.0032		0.0034	0.0047		0.0045	0.0010	0.0020	0.0017	0.0047
13/avr/93	39.3	0.55	0.28	0.69	1.38	2.35		10.29	22.32				0.0050	0.0044		0.0044			0.0063	0.0116
15/avr/93	24.9	0.35	1.40	0.66	0.80	2.86		10.81	22.87	0.0211	0.0286		0.0323	0.0051		0.0045	0.0074	0.0514	0.0337	0.0925
19/avr/93	12.0	0.60	0.35	0.14	2.07	2.56		5.44	17.99		0.0140		0.0385	0.0080		0.0080		0.0916	0.0985	
27/avr/93	25.3	0.10	0.81		1.63	2.44		6.44	25.53	0.0154	0.0369		0.0418	0.0010		0.0013	0.0180	0.0119	0.0721	0.1020
30/avr/93	16.2	0.05	1.17	0.29	1.74	3.20		13.00	34.63	0.0360	0.0070		0.0353	0.0005		0.0006	0.0339	-0.0236	0.1028	0.1130
3/mai/93	6.0	0.35	0.94		2.17	3.11		7.91	31.65	0.0031	0.0030		0.0029	0.0072		0.0028	0.0051	-0.0023	0.0062	0.0090
13/mai/93	6.4	0.75	1.62	0.64	3.50	5.76		12.22	55.85	0.0058	0.0038		0.0156	0.0089		0.0083	0.0082	0.0003	0.0811	0.0896
18/mai/93	1.9	0.35	1.43	0.22	1.83	3.48		11.72	29.61	0.0010	0.0011		0.0012	0.0015		0.0011	0.0004	0.0014	0.0026	0.0043
27/mai/93	4.9	0.30	0.37	1.41	0.99	2.77		4.40	22.86		0.0082		0.0117			0.0031			0.0178	0.0324
14/jun/93	6.4	0.25	0.92	0.67	1.25	2.84		7.95	22.96	0.0181	0.0208		0.0226	0.0029		0.0030	0.0167	0.0163	0.0313	0.0643
30/jun/93	2.0	0.80	0.58	0.49	1.08	2.15		7.87	19.03	0.0206	0.0303		0.0326	0.0141		0.0140	0.0120	0.0205	0.0377	0.0702
13/jul/93	0.7	0.22	0.89	-0.21	1.43	2.11		7.52	17.46	0.0081	0.0127		0.0114	0.0031		0.0033	0.0072	0.0014	0.0155	0.0241
27/jul/93	8.6	0.05	0.36	0.67	0.62	1.65		7.45	14.11	0.0157	0.0163		0.0156	0.0018		0.0019	0.0057	0.0112	0.0089	0.0257
12/aot/93	2.3	0.34	0.53	0.39	1.22	2.14		5.79	16.79	0.0198	0.0219		0.0191	0.0064		0.0053	0.0105	0.0096	0.0209	0.0410
25/aot/93	2.3	0.40	0.55	0.42	0.12	1.09		6.94	11.84	0.0251	0.0144		0.0270			0.0075	0.0138	0.0002	0.0154	0.0294

	oNH4 0.6-2 µm µmol/l/h	oNH4 2-10 µm µmol/l/h	oNH4 >10 µm µmol/l/h	oNH4 total µmol/l/h	oN 0.6-2 µm µmol/l/h	oN 2-10 µm µmol/l/h	oN >10 µm µmol/l/h	oN total µmol/l/h	oC 0.6-2 µm µmol/l/h	oC 2-10 µm µmol/l/h	oC >10 µm µmol/l/h	oC total µmol/l/h	chlro 0.6-2 µm µg/l	chlro 2-10 µm µg/l	chlro >10 µm µg/l	chlro total µg/l	phéo 0.6-2 µm µg/l	phéo 2-10 µm µg/l	phéo >10 µm µg/l	phéo total µg/l
15/feb/93				0.0083				0.0175				3.65			0.36	1.14			0.12	0.74
3/mar/93				0.0011				0.0048				3.19			0.16	0.61			0.07	0.31
15/mar/93	0.0017	0.0068	0.0116	0.0201	0.0054	0.0082		0.0333	1.09	2.09		3.76	0.14	0.30	0.34	0.94	0.15	0.23	0.08	0.57
29/mar/93	0.0032	0.0032	-0.0012	0.0052	0.0032			0.0115	0.22	0.46		2.33	0.12	0.17	0.38	0.91	0.06	0.08	0.10	0.25
1/avr/93	0.0094	-0.0025	0.0030	0.0099	0.0131	0.0056		0.0301	0.37	0.62		2.84	0.23	0.31	0.48	0.88	0.11	0.15	0.17	0.33
5/avr/93	0.0031	0.0012	0.0006	0.0048	0.0040	0.0032		0.0095	0.64	0.44		3.57	0.10	0.13	0.34	0.65	0.17	0.23	0.19	0.33
13/avr/93	0.0012	0.0031	0.0047	0.0090	0.0012			0.0206	0.61	1.30		6.42	0.12	0.48	0.43	0.82	0.08	0.22	0.12	0.54
15/avr/93	0.0072	0.0022	0.0031	0.0124	0.0146	0.0536		0.1049	0.83	2.52		8.06	0.23	0.42	0.47	1.54	0.14	0.20	0.29	0.46
19/avr/93			0.0100	0.0139	0.0000			0.1124	0.35	0.78		15.47	0.07	0.01	1.85	2.24	0.07	0.25	0.22	0.38
27/avr/93	0.0008	0.0002	0.0000	0.0010	0.0188	0.0121		0.1030	0.79	0.69		15.90	0.12	0.19	6.19	6.70	0.06	0.09	0.73	0.80
30/avr/93	0.0006	0.0002	0.0005	0.0013	0.0344	-0.0234		0.1143	0.21	0.37		7.76	0.25	0.29	5.29	6.92	0.06	0.21	0.51	0.67
3/mai/93	0.0068	-0.0042	0.0040	0.0066	0.0119	-0.0065		0.0156	0.30	0.34		9.36	0.12	0.30	6.30	7.03	0.07	0.19	1.00	1.55
13/mai/93	0.0143	0.0044	0.0200	0.0388	0.0226	0.0047		0.1284	0.34	0.24		2.67	0.12	0.23	6.42	7.74	0.05	0.11	0.95	1.41
18/mai/93	0.0021	-0.0002	0.0018	0.0037	0.0025	0.0011		0.0080	0.12	0.19		0.82	0.02	0.11	0.85	1.10	0.05	0.23	2.61	2.96
27/mai/93			0.0000	0.0055				0.0378				10.54	0.08	0.28	1.74	2.60	0.04	0.12	0.54	0.54
14/jun/93	0.0027	0.0020	0.0039	0.0086	0.0194	0.0184		0.0729	0.23	0.51		10.31	0.19	0.53	3.02	3.47	0.08	0.17	0.53	0.74
30/jun/93	0.0082	0.0068	0.0098	0.0248	0.0201	0.0273		0.0950	0.18	0.33		2.86	0.04	0.11		1.19	0.05	0.08		0.33
13/jul/93	0.0027	-0.0005	0.0038	0.0060	0.0100	0.0009		0.0301	0.23	0.31		3.24	0.07	0.14	1.12	1.62	0.07	0.11	0.37	0.52
27/jul/93	0.0007	0.0013	0.0010	0.0029	0.0063	0.0124		0.0286	0.59	0.70		4.75	0.12	0.21	0.53	0.90	0.13	0.21	0.23	0.62
12/aoû/93	0.0034	0.0015	0.0053	0.0101	0.0139	0.0111		0.0511	0.57	1.01		5.18	0.10	0.25	1.07	1.78	0.07	0.13	0.44	0.84
25/aoû/93			-0.0008	0.0064	0.0138			0.0358	0.55	0.75		1.95	0.18	0.24	0.40	0.63	0.15	0.16	0.12	0.51