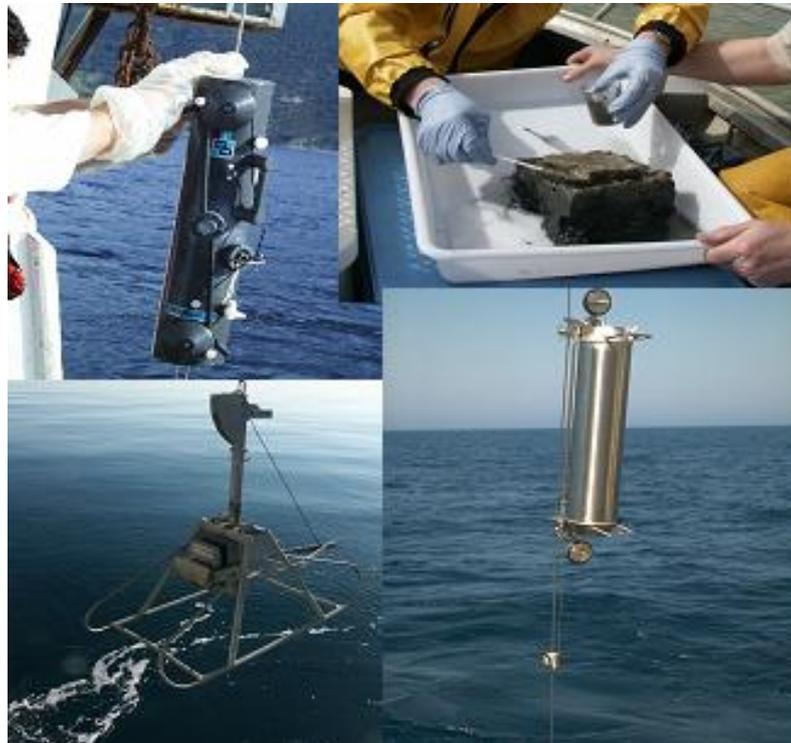


Surveillance chimique :

Guide de prélèvement d'échantillons marins pour l'analyse des contaminants chimiques



Direction Centre de Nantes
Département Biogéochimie et Ecotoxicologie
Coordination : Didier Claisse

Août 2007 – R.INT.DCN-BE/2007.05/ Nantes

Surveillance chimique :

**Guide de prélèvement d'échantillons marins
pour l'analyse des contaminants chimiques**



Sommaire

Introduction	5
<u>Prélèvement d'eau</u>	7
1. Prélèvement destiné à la mesure des métaux	9
1.1. traitement du matériel	9
Flaconnage	9
Matériel à prélèvement	9
Matériel de filtration	9
Réactifs	10
Locaux	10
1.2. Le prélèvement	10
Prélèvement à la main	10
Prélèvement à la bouteille	11
Prélèvement à la pompe	11
1.3. Filtration de l'échantillon	12
2. Prélèvement destiné à la mesure des contaminants organiques	12
2.1. Préparation du matériel	12
2.2. Technique d'échantillonnage	13
Prélèvement à la pompe	13
Prélèvement à la bouteille	13
2.3. Volume de l'échantillon	13
2.4. Filtration	14
<u>Prélèvement de sédiment</u>	15
1. Traitement du matériel et du flaconnage	17
2. Prélèvement	17
<u>Prélèvement d'organismes marins</u>	19
1. Prélèvement	21
2. Epuration des coquillages	21
3. Décoquillage des bivalves	21
4. Conditionnement de la chair	22
5. Traitement du matériel	22
Piluliers	22
Calcination des feuilles d'aluminium	22
Bacs d'épuration neufs	22
Entretien des bacs d'épuration	23





Introduction

Dans le cadre de la mise en place de Directive Cadre européenne sur l'Eau (DCE) des programmes de surveillance doivent être élaborés et appliqués dès 2007. La Circulaire 2007/20 du ministère chargé de l'environnement (MEDAD) ¹ fixe les conditions dans lesquelles cette surveillance doit être menée. Trois matrices marines sont concernées, l'eau, le sédiment et le biote (mollusques bivalves).

Dans la plupart des pays industrialisés, la surveillance du milieu marin a plus de 30 ans d'expérience. Le niveau de qualité auquel sont parvenus nombre de programmes nationaux ou internationaux est le fruit de cette expérience et des erreurs commises dans la période initiale. Il va de soi que la surveillance DCE doit profiter de ces acquis afin de donner dès les premières mesures des résultats fiables et exploitables. Ces deux qualités dépendent, d'une part des stratégies de surveillance mises en jeu, d'autre part de la qualité de l'échantillonnage et de l'analyse. Les stratégies ont été fixées par le MEDAD dans la circulaire précitée. La qualité de l'échantillonnage fait l'objet du présent document. Les techniques analytiques ne sont pas abordées ici et relèvent des compétences du laboratoire de référence AQUAREF ².

Sont exposées ici les techniques de prélèvement propres à chaque matrice afin de garantir la collecte et le conditionnement d'échantillons marins à fin de dosage de contaminants chimiques souvent présents à l'état de traces.

Les techniques exposées ici sont en conformité avec le document guide européen du groupe CMA³ (*Chemical Monitoring Activity*) et les lignes directrices de la Convention OSPAR. Celles concernant les prélèvements d'eau sont extraites des fascicules méthodologiques publiés par le RNO ⁴ à la demande du MEDAD. Celles concernant le sédiment et les organismes proviennent des protocoles du RNO.

¹ Circulaire DCE 2007/20 du 5 mars 2007 relative à la constitution et la mise en œuvre du programme de surveillance pour les eaux littorales en application de la directive 2000/60/CE.

² AQUAREF : http://www.ineris.fr/index.php?module=cms&action=getContent&id_heading_object=1185

³ Guidance on surface water chemical monitoring under the Water Framework Directive. Mai 2007.

⁴ CHIFFOLEAU J.F. *et al.*, 2002. Dosage de certains métaux traces dissous dans l'eau de mer par absorption atomique après extraction liquide-liquide. *Editions de l'Ifremer*. 39 p. ISBN 2-84433-104-1.

COSSA D. *et al.*, 2003. Spéciation du mercure dissous dans les eaux marines. Dosage du mercure total, gazeux, réactif, mono et diméthylmercure. *Editions de l'Ifremer*. 27 p. ISBN 2-84433-125-4.

TRONCZYNSKI J. *et al.*, 2005. Analyse de contaminants organiques (herbicides, PCB, OCP, HAP) dans les eaux estuariennes et marines côtières. *Editions de l'Ifremer*. 52 p. ISBN 2-84433-148-3.

RNO : <http://www.ifremer.fr/envlit/surveillance/rno.htm>





PRELEVEMENT D'EAU





Les contaminants chimiques, dissous ou particulaires, sont le plus souvent présents dans les eaux marines à l'état de traces. La difficulté est donc de prélever et conditionner des échantillons d'eau indemnes de toute contamination additionnelle. Les sources de contamination peuvent être multiples, depuis les moyens de prélèvement eux-mêmes (navire, matériel, flaconnage) jusqu'aux poussières atmosphériques. Le prélèvement d'eau de mer en vue de l'analyse chimique requiert donc la mise en œuvre de protocoles et de techniques spécifiques.

De plus, ces protocoles et précautions sont différents selon que les échantillons sont destinés au dosage des métaux ou des contaminants organiques. Toute manipulation est délicate et requiert un maximum d'attention afin d'éviter toute fausse manœuvre compromettant le résultat final (contact entre le flaconnage et des surfaces ou une atmosphère contaminées, chute à terre d'un bouchon, non-fermeture d'un sac, mauvais rinçage).

1. Prélèvement destiné à la mesure des métaux

Les opérateurs devant manipuler le flaconnage doivent porter systématiquement des gants de polyéthylène ou nitrile. Le matériel, en contact avec l'échantillon, doit être exempt de métaux. On le décontamine par des solutions acides concentrées, à chaud, ce qui lui impose d'être en matière plastique résistant à ce traitement. Le **polyéthylène, le polypropylène et le Téflon** répondent à cet impératif. Cependant, les échantillons destinés au dosage du mercure ne peuvent être conditionnés que dans des flacons en **Téflon PFA ou FEP** (sauf pour des concentrations supérieures à 5 ng.l^{-1} , pour lesquelles il est possible d'utiliser du verre ou du quartz, tel qu'indiqué dans le document guide du groupe CMA déjà cité). Les échantillons destinés au dosage du **TBT** doivent, quant à eux, être conditionnés dans des flacons en **polycarbonate**. Ce matériau ne supportant pas le traitement acide à chaud, il devra être traité différemment (cf. § 1.1).

S'il est nécessaire d'appréhender les teneurs en métaux dissous, il conviendra de filtrer les échantillons. Cette opération délicate est également décrite ici, de même que le traitement du matériel nécessaire.

1.1. traitement du matériel

Flaconnage

Le flaconnage destiné aux analyses **du mercure** et des **autres métaux** doit être nettoyé par immersion prolongée dans une solution acide : immersion pendant 3 jours dans l'acide nitrique à 50% et à 40°C, rinçage à l'eau désionisée, immersion 3 jours dans l'acide nitrique à 10%, rinçage à l'eau désionisée en salle blanche. Les flacons sont ensuite remplis d'eau acidulée (0,1% d'acide chlorhydrique ou nitrique), et emballés dans 2 sacs polyéthylène superposés et clos individuellement. Habituellement, on utilise des flacons d'une contenance de 500 ml.

Les flacons en polycarbonate destinés à l'analyse du **TBT** doivent être traités par une solution à 10% d'acide chlorhydrique, à froid et pendant 5 jours. Ils sont ensuite rincés abondamment à l'eau désionisée, puis emballés vides dans 2 sacs polyéthylène superposés et clos individuellement. La contenance de ces flacons doit être d'au moins 250 ml.

Dans tous les cas, le flaconnage devrait être fourni par le laboratoire d'analyse.

Matériel à prélèvement

Le matériel à prélèvement (bouteille, pompe et tuyaux) est en général de grande taille et ne peut être immergé dans des bacs d'acide. Les bouteilles Niskin ou Go-Flo sont remplies d'acide nitrique dilué à 10 % pendant 1 à 2 semaines, puis rincées à l'eau désionisée. Dans le système complet de pompage, faire circuler de l'eau acidulée pendant plusieurs jours, puis rincer longuement à l'eau désionisée. Ces matériels sont conservés humide dans un sac de plastique épais (ne risquant pas d'être déchiré).

Matériel de filtration

Les **ampoules à décanter** en Téflon sont lavées selon la même procédure que le flaconnage, puis emballées humides, mais vides, dans 2 sacs plastique fermés individuellement. Les **porte-filtres** qui



supportent beaucoup moins bien les acides concentrés sont immergés pendant une semaine dans un bac d'acide à 10%, puis rincés à l'eau désionisée, séchés à l'étuve et emballés dans 2 sacs plastique fermés individuellement. Les **membranes filtrantes** sont immergées pendant 2 semaines dans de l'acide nitrique à 10%, puis rincées abondamment jusqu'à pH neutre, séchées (pesées le cas échéant), puis conservées individuellement dans des boîtes de Pétri propres elles-mêmes emballées dans un sac plastique.

Réactifs

Les réactifs utilisés pour le nettoyage du matériel sont de qualité analytique. Les réactifs utilisés pour le conditionnement des flacons et l'acidification des échantillons sont de haute pureté. L'eau utilisée doit être fraîchement désionisée.

Locaux

A la suite du prélèvement, toutes les manipulations et filtrations ont lieu sous une atmosphère exempte de poussières, soit sous hotte à flux laminaire équipée d'un filtre à particules (classe 100), soit en salle blanche. Celle-ci est constituée d'une pièce dont toutes les surfaces (sol, plafond, murs, paillasse) sont en matière plastique et sans recoin où pourrait s'accumuler la poussière. Elle est alimentée en air filtré avec un taux de renouvellement important, surpressée par rapport à l'extérieur et reliée à l'extérieur par un sas dans lequel l'opérateur revêt la tenue requise (blouse, charlotte, couvre-chaussures spécialement conçues pour ce type de local).

La salle blanche doit faire l'objet de nettoyages et de contrôles du taux d'empoussièrement très fréquents. Il ne doit pas y pénétrer de matières risquant de la contaminer : solutions concentrées, échantillons pulvérulents, papier.... Les échantillons doivent conserver un emballage plastique durant tout leur séjour.

1.2. Le prélèvement

Suivant le type d'eau à échantillonner (estuaire, milieu côtier, mer du large), la logistique requise n'est pas la même. Dans tous les cas, l'objectif est de ne pas contaminer l'eau à échantillonner (i) avant le prélèvement par contact avec la logistique déployée par le préleveur, en particulier, la surface extérieure du système de prélèvement ou la coque du navire support en contact avec l'eau, (ii) pendant le prélèvement par contact avec les parois internes du système de prélèvement ou avec l'atmosphère (contaminée par la présence du navire). Il est à rappeler qu'un prélèvement est toujours effectué à au moins quelques dizaines de centimètres sous la surface pour ne pas échantillonner le film lipidique à l'interface eau-atmosphère, enrichi en contaminants atmosphériques et peu représentatif de la colonne d'eau sous-jacente.

Prélèvement à la main

Il s'agit de prélèvements depuis une embarcation légère ou pneumatique (au large) ou depuis un ponton (sur la berge d'une rivière, dans un port, sur la côte). Ce type de prélèvement a l'avantage de mettre en œuvre peu de matériel. De plus le prélèvement s'effectue directement avec le flacon destiné à l'analyse, évitant ainsi les manipulations intermédiaires. Dans tous les cas, les bras de l'agent préleveur sont protégés par des gants manchettes en polyéthylène, et le prélèvement s'effectue en plongeant le flacon sous la surface, le plus loin possible du support nautique ou du ponton. Depuis une embarcation légère, on prélève "au vent" à l'avant du bateau, celui-ci étant si possible orienté à contre-courant et moteur arrêté.

A l'état initial, le flacon de prélèvement est rempli d'eau acidulée. Vider le flacon dans un endroit assez éloigné du lieu de prélèvement pour ne pas souiller l'eau à prélever, puis le refermer. Plonger le flacon sous la surface, puis l'ouvrir. Le refermer sous la surface, le sortir de l'eau, l'agiter et le vider comme précédemment. Recommencer cette procédure de rinçage deux fois. Remplir le flacon complètement (sans bulle d'air), le refermer, puis l'emballer dès sa sortie de l'eau dans 2 sacs de polyéthylène (ou polypropylène) fermés individuellement. Conserver le flacon ainsi conditionné à



l'obscurité et à faible température pour éviter la prolifération d'espèces indésirables, bactériennes ou planctoniques, ou les réactions chimiques pouvant modifier la composition de l'échantillon.

Prélèvement à la bouteille

Il est effectué depuis un pont ou depuis une embarcation sur laquelle il est impossible de prélever à la main. Cette technique est la seule utilisable pour échantillonner à des profondeurs supérieures au domaine d'action des pompes (en général plus de 200 m).

Il existe plusieurs types de bouteille à prélèvement, parmi lesquelles les bouteilles **Niskin** ou **Go-Flo** (fig. 1). Ce sont des tubes en PVC dont la surface intérieure est recouverte de Téflon, et qui s'ouvrent aux 2 extrémités. La bouteille Niskin n'est pas souhaitable pour la mesure de métaux-traces, car son système de fermeture comporte un élastique interne en caoutchouc, qui ne supporte pas le traitement acide nécessaire à sa décontamination. De plus, cette bouteille ne peut être envoyée qu'ouverte, avec risque de récupérer sur ses parois internes un peu de la couche lipidique de surface.

La bouteille Go-Flo est idéale pour les prélèvements en profondeur. Son élastique de fermeture est externe. Tout l'intérieur est constitué de matière plastique et recouvert de Téflon. Elle est prévue pour être envoyée fermée et s'ouvrir à une profondeur de l'ordre de 10 m sous la pression de la colonne d'eau, à partir de laquelle elle est toujours remplie. Elle peut donc échantillonner à toutes profondeurs sans risquer de s'écraser sous la pression. Elle se ferme à la profondeur souhaitée par l'intermédiaire d'un **messager** (en acier INOX + Téflon) envoyé depuis la surface. Le câble support peut-être en Kevlar ou en acier INOX. Par contre, pour les prélèvements de surface, la bouteille Go-flo a pour inconvénient d'être très haute (de 0,80 m à 1 m) et donc un prélèvement intègre une hauteur de colonne d'eau du même ordre, ce qui nuit à la résolution d'un profil vertical peu profond. Il existe des bouteilles de petit volume (de type **Merkos**, fig. 2), élaborées entièrement en Téflon. Elles sont envoyées vides et fermées, et ne s'ouvrent à l'extrémité supérieure qu'à la profondeur du prélèvement, par le déclenchement d'un messager. Elles sont donc intéressantes pour les faibles profondeurs mais ne peuvent être utilisées pour les prélèvements profonds du fait de l'écrasement sous la pression.

Toutes les manipulations ont lieu avec des gants en polyéthylène. La bouteille à prélèvement et le messager sont conservés dans des sacs de polyéthylène. Sortir la bouteille de son sac pour la fixer au câble. Eloigner ensuite le câble de la coque du bateau puis filer le câble jusqu'à la profondeur désirée. Sortir le messager de son sac, le fixer sur le câble et l'envoyer. Virer alors le câble, puis décrocher la bouteille et la remettre dans son sac en polyéthylène. Récupérer le messager et le conserver dans son sac jusqu'au prélèvement suivant. Des sous-échantillons sont soutirés des bouteilles à prélèvement dans les flacons de stockage après au moins trois rinçages avec l'eau échantillonnée.



Figure 1 : Bouteille à prélèvement Go-Flo (General Oceanics, USA).



Figure 2 : Bouteille à prélèvement Merkos (Hydro-bios, Allemagne).



Figure 3 : Pompe à piston en téflon (Asti, France).

Prélèvement à la pompe

Ce type de prélèvement nécessite plus de matériel, mais permet le prélèvement de grands volumes et, surtout, une meilleure maîtrise de la contamination. Le système (pompe et tuyaux) est entièrement en Téflon. On utilise une pompe pneumatique (ASTI, fig. 3) actionnée par une pression de gaz extérieure

à son corps. L'extrémité amont de la pompe est plongée sous la surface de l'eau alors que l'extrémité aval est située sous hotte à flux laminaire ou mieux dans une salle blanche. Ainsi, l'échantillon d'eau n'est à aucun moment en contact avec l'atmosphère contaminée du navire. De grandes quantités d'eau peuvent être prélevées en un temps assez bref (une dizaine de litres en quelques minutes), suivant le débit de la pompe et la perte de charge dans les tuyaux.

1.3. Filtration de l'échantillon

La filtration d'un échantillon d'eau est nécessaire à chaque fois qu'une distinction doit être faite entre métaux totaux et métaux dissous et que la teneur en matières en suspension risque de fausser les résultats. Rappelons par exemple que les concentrations en plomb dissous en milieu marin sont souvent inférieures, voire très inférieures, à 10 ng/l et qu'une charge en matières en suspension de 0,5 mg/l (invisible à l'œil nu) contenant 20 µg/g de plomb apporte à l'échantillon 10 ng/l.

La filtration a lieu par passage de l'échantillon à travers une membrane sous une faible pression. Par convention, on considère que la phase particulaire correspond aux matières solides retenues sur une membrane de porosité nominale de 0,45 µm.

Le matériel de filtration et les membranes sont nettoyés suivant le protocole décrit plus haut. Le gaz vecteur est en général de l'azote de pureté convenable. Ce gaz est filtré sur filtre sec pré-nettoyé de 0,45 µm avant son entrée dans l'ampoule contenant l'échantillon.

La pression de filtration peut être de l'ordre de 1 bar si les particules à filtrer sont inertes. S'il s'agit de phytoplancton, une pression trop importante risque de faire éclater les cellules et donc d'introduire dans l'échantillon filtré du cytosol (liquide intracellulaire) de concentration en métaux parfois beaucoup plus importante que l'eau qui les environne. Dans ce cas, une pression maximale de 0,4 bar sera appliquée.

Positionner la membrane sur le porte-filtre en aspirant à sa sortie avec une pompe à main. Rincer la membrane avec de l'eau désionisée, puis fermer le porte filtre. Rincer l'ampoule avec de l'eau désionisée, puis lui adjoindre le porte-filtre chargé. Vider le flacon récupérateur et le positionner sous le système. Remplir l'ampoule avec un peu de l'échantillon, et le filtrer pour rincer la membrane. Cette eau constitue un premier rinçage du flacon récupérateur. Renouveler 2 fois l'opération, et vider ainsi l'ampoule. Remplir l'ampoule avec l'échantillon, puis filtrer en remplissant le flacon récupérateur.

L'échantillon filtré est acidifié par ajout de 0,15% (v/v) d'acide nitrique concentré de haute pureté pour les échantillons destinés aux dosages des métaux (sauf le mercure) ou par 0,4 % d'acide chlorhydrique concentré de haute pureté pour les flacons Téflon destinés à recevoir les échantillons pour le dosage du mercure. Les flacons sont fermés (hermétiquement pour éviter les échanges gazeux), agités et emballés à nouveau dans ses 2 sacs en polyéthylène.

N.B. Dans le cas où l'on souhaite évaluer la charge en particules de l'échantillon, peser la membrane avant filtration après séchage à l'étuve. La quantité d'eau filtrée correspond aux eaux de rinçage du filtre et du flacon plus l'échantillon et plus éventuellement le reliquat de l'ampoule que l'on filtre également. Rincer la membrane avec de l'eau désionisée (ou une solution isotonique à l'eau de mer si les particules sont riches en phytoplancton, par exemple une solution de formiate d'ammonium qui présente l'avantage d'être volatile et donc d'être éliminée complètement au séchage), la sécher à l'étuve et la peser à nouveau.

2. Prélèvement destiné à la mesure des contaminants organiques

2.1. Préparation du matériel

La préparation et le stockage de tout le matériel entrant en contact avec les échantillons font l'objet d'une attention particulière. Ainsi, dans le cas des contaminants organiques, tout le matériel de prélèvement, de traitement et de manipulation est en Téflon, en acier inoxydable ou en verre. Le



nettoyage du matériel est effectué en utilisant de l'eau et du détergent, puis en rinçant abondamment avec de l'eau de qualité MilliQ-UV, des alcools ou d'autres solvants organiques.

La verrerie est passée au four à 450°C pendant une nuit (sauf la verrerie volumétrique). Pour la verrerie volumétrique, le passage au four est remplacé par un trempage dans un mélange acide (200 g de persulfate d'ammonium dans 20 litres d'acide sulfurique) pendant 24 heures puis rinçage plusieurs fois à l'eau MilliQ-UV, suivi de plusieurs rinçages au méthanol (qualité Atrasol) puis séchage à l'étuve à 80°C. Le matériel est ensuite conservé bouché par du papier aluminium, passé également au four à 450°C.

Des gants en coton sont utilisés pour toutes les manipulations, afin d'éviter le contact direct avec le matériel utilisé. Dans la mesure du possible, les manipulations sont réalisées sous hotte aspirante. Cette précaution permet de protéger l'échantillon des contaminations extérieures, et de protéger l'utilisateur des vapeurs de solvants organiques.

Le matériel de prélèvement et de filtration inclut : une pompe et des tuyaux de prélèvement en Téflon (ASTI, France), une bouteille d'air comprimé, un manomètre, des tuyaux pour la connexion manomètre/pompe, un support de filtre en acier inoxydable (pour des filtres de 293 mm), et des filtres en fibres de verre GF/F Whatman de 0.7 µm de porosité nominale. La pompe et les tuyaux en Téflon sont nettoyés en faisant circuler successivement de l'eau Milli-Ro, une solution d'acide chlorhydrique (10 %), de l'eau MilliQ-UV, de l'alcool (méthanol, éthanol) et encore une fois de l'eau MilliQ-UV. Le support de filtre en acier inoxydable est lavé à l'eau avec un détergent, abondamment rincé avec de l'eau courante puis de l'eau MilliQ-UV. Après le branchement du support (sans filtre) avec la pompe, le système en circuit fermé est rincé, successivement avec de l'eau MilliQ-UV, du méthanol (pendant 20 min.) et de l'eau MilliQ-UV à la fin. Les filtres en fibre de verre (GF/F, Whatman) de 293 mm de diamètre sont emballés individuellement dans du papier d'aluminium et passés au four à 450°C pendant 8 h. Ces filtres sont utilisés pour récolter les matières en suspensions pour les analyses des contaminants organiques particulières.

2.2. Technique d'échantillonnage

L'équipement utilisé pour le prélèvement d'échantillons d'eau de mer pour les analyses des contaminants organiques doit être constitué de matériaux appropriés et doit permettre la collecte de grands volumes. Selon les besoins, l'échantillonnage peut être réalisé par pompage ou à l'aide d'une bouteille à prélèvement en inox. Les échantillons sont collectés dans des récipients en inox ou dans des bonbonnes en verre d'environ 25 litres.

Prélèvement à la pompe

Les prélèvements de sub-surface, et jusqu'à une profondeur d'environ 140 m, sont effectués par pompage au moyen de pompes en Téflon (ASTI, France) fonctionnant à l'air comprimé. Pour bien équilibrer le système avec l'eau de l'échantillon, le pompage est effectué pendant une dizaine de minutes avant le prélèvement effectif. Les récipients sont ensuite abondamment rincés (au moins 3 fois) avec l'échantillon avant de commencer le prélèvement proprement dit. Pendant les étapes de rinçage du système et pendant le prélèvement des échantillons de sub-surface, le tuyau est tenu éloigné de la coque du bateau.

Prélèvement à la bouteille

Les prélèvements d'échantillons plus profonds sont réalisés à l'aide de bouteilles inox d'un volume d'environ 30 litres (fig. 4).



Figure 4 : Bouteille de prélèvement en acier inoxydable.

2.3. Volume de l'échantillon

Il s'agit de choisir le volume d'eau permettant la détection et la quantification des composés recherchés avec les techniques analytiques disponibles. Le volume de l'échantillon varie donc en fonction du domaine marin étudié, des contaminants recherchés et de la technique analytique utilisée. Les volumes d'eau extraite pour les analyses des contaminants dissous varient entre environ 15 litres (domaine estuarien amont) et plus de 200 litres (domaine marin). Le mode opératoire est adapté pour mener à bien la filtration et l'extraction de ces grands volumes d'eau.

2.4. Filtration

Comme pour les métaux, la filtration d'un échantillon d'eau est nécessaire à chaque fois qu'une distinction doit être faite entre contaminants dissous, totaux, ou particulaires.

Les échantillons sont filtrés à bord du navire océanographique, le plus rapidement possible après leur prélèvement. On utilise des filtres en fibre de verre (Whatman GF/F) d'une porosité nominale de 0,7 μm et d'un diamètre de 293 mm. La filtration est effectuée par pompage avec une pompe (ASTI) et un support de filtre en acier inoxydable (Millipore). Le système de filtration propre, déjà muni d'un filtre en fibre de verre, est rincé avec l'eau de l'échantillon avant la collecte effective du filtrat. L'eau filtrée est utilisée aussi pour rincer le récipient (2 à 3 fois) dans lequel l'échantillon filtré est récupéré. Pendant la filtration, on doit agiter souvent l'échantillon pour éviter le dépôt des particules sur les parois du récipient, et s'assurer à la fin de récupérer la totalité de l'échantillon. Pour les échantillons fortement chargés en matières en suspension (MES), il faut éviter le colmatage des filtres. En règle générale, on peut filtrer environ 20 litres d'eau avec un seul filtre de 293 mm si la charge en MES est égale ou inférieure à 250 mg/L. Les échantillons plus chargés sont filtrés avec plusieurs filtres. Le colmatage d'un filtre se manifeste par la diminution du débit de filtration. Par contre, lorsque la charge en MES est assez faible, la filtration des échantillons peut s'effectuer directement en ligne avec le prélèvement (le système de prélèvement est alors connecté directement au support de filtre). Le support de filtre est rincé à l'eau Milli-Q-UV avant de placer un nouveau filtre.

PRELEVEMENT DE SEDIMENT





La capacité des sédiments à adsorber les contaminants présents dans le milieu dépend de certaines caractéristiques dont les principales sont la finesse des particules (exprimée par la granulométrie), la teneur en carbone organique, en carbonates, en aluminium, etc. On recherche donc en priorité des sédiments fins (vase ou vase sableuse). Il convient également de prélever sur chaque façade maritime quelques échantillons à granulométrie grossière (sable) à fins de normalisation des résultats.

En matière de surveillance, l'échantillonnage concerne la couche sédimentaire superficielle, généralement le premier centimètre. Il convient d'utiliser un engin de prélèvement qui préserve la structure sédimentaire, sans mélanger les couches. Il existe de nombreux matériels répondant à cette exigence, en particulier les carottiers-boîtes ou tubes. L'usage de bennes (par exemple de type Schipek) est à proscrire car ce matériel mélange irrémédiablement les couches sédimentaires. Selon le contexte du prélèvement, en particulier la profondeur, différents engins pourront être utilisés. Par contre, le flaconnage et le matériel de sous-échantillonnage sera toujours le même.

1. Traitement du matériel et du flaconnage

Type	destination	Traitement
Piluliers en polystyrène cristal Spatules en polyéthylène ou Téflon	Métaux	Lavage au Teepol, rinçage. Immersion 3 jours dans HNO ₃ pour analyse à 10% (à 40°C ou 5 jours à froid) Rinçage à l'eau Milli-Q. Mise en sacs polyéthylène, par petites quantités. Ranger les spatules individuellement en sac polyéthylène.
Autres piluliers en polystyrène cristal	Granulométrie	Aucun traitement spécial. Les piluliers sont neufs et ne servent qu'une fois. Pour éviter les confusions sur le terrain, les bouchons de ces piluliers sont d'une couleur différente de ceux des métaux.
Piluliers en polystyrène cristal 40 ml	% H ₂ O densité	Tarage au 1/10ème de milligramme. Ils doivent être tarés SANS les bouchons, étiquette collée. La tare doit être inscrite sur l'étiquette.
bocaux en verre spatules inox feuilles d'aluminium	Contaminants organiques carbonates carbone organique	Calcination au four à 450°C pendant 8 heures. Fermeture des bocaux avec une feuille d'aluminium calcinée. Travailler avec les gants en coton et sur une feuille d'aluminium calcinée. Stockage des bocaux enveloppés dans une grande feuille d'aluminium calcinée par petites quantités. Lavage en machine des couvercles des bocaux, rinçage, séchage. Emballage par petites quantités dans une grande feuille d'aluminium non calcinée. Emballer les spatules calcinées dans une feuille d'aluminium calcinée, individuellement.

2. Prélèvement

Sur **zone découvrante**, les prélèvements pourront être faits à marée basse, à pied sur l'estran et directement avec les spatules.

Par des **fonds inférieurs à 3 mètres**, on peut utiliser une benne de type Eckman (qui est en fait un carottier boîte) avec son manche et une embarcation légère (fig. 5). Dans ce cas le moteur devra être arrêté lors des opérations de prélèvement et de conditionnement. De plus, la proximité des nourrices de carburant ou autre source de contamination oblige à prendre certaines précautions : Entre chaque



utilisation la benne devra être enfilée dans un grand sac en polyéthylène et le bac contenant le flaconnage refermé.

Par **fonds de plus de 3 mètres** il est nécessaire d'utiliser un navire hauturier capable de mettre à l'eau un carottier-boîte (par exemple de type Reineck, fig. 6). Les machines ne pouvant être stoppées sur station, prendre soin à ce que les échappements ne soient pas rabattus sur les lieux de travail.

Le port des gants en polyéthylène ou nitrile est obligatoire lors des opérations de manipulation des échantillons. Ne pas manipuler la benne ou le carottier avec les gants qui serviront à manipuler le flaconnage. Les gants doivent être changés pour chaque prélèvement.



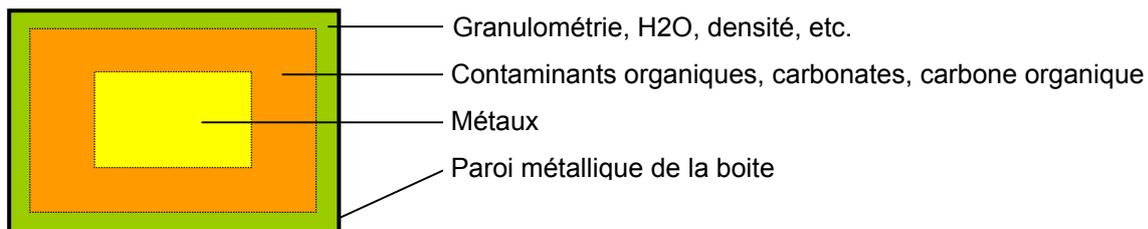
Figure 5 : Prélèvement du premier centimètre superficiel d'une carotte obtenue à l'aide d'une benne de type Eckman sur embarcation légère.



Figure 6 : Mise à l'eau d'un carottier-boîte de type Micro-Reineck sur navire hauturier.

Dans tous les cas le prélèvement est effectué dans la couche superficielle du sédiment, généralement le premier centimètre. Le sédiment destiné à la mesure de la granulométrie et de la teneur en eau doit être prélevé dans la partie la plus périphérique de la carotte, qui a été en contact avec les parois de la boîte. Le matériel destiné à l'analyse des métaux doit être prélevé dans la partie centrale. Enfin, la partie intermédiaire doit être prélevée pour l'analyse des contaminants organiques (figure ci-dessous).

Carotte vue du dessus



Pour les **contaminants organiques**, la couche superficielle est prélevée à l'aide d'une spatule en acier inoxydable calcinée. L'échantillon est conditionné en bouchons de verre calcinés (cf. § 1.). Après chaque prélèvement, la spatule est rincée avec du méthanol et enveloppée dans une feuille d'aluminium calcinée.

Pour les **métaux**, la couche superficielle est prélevée à l'aide d'une spatule en polyéthylène, polypropylène, ou Téflon (fig. 5), et conditionnée dans un pilulier en polystyrène cristal traité comme indiqué au paragraphe 1. Le pilulier est emballé individuellement dans un sac polyéthylène fermé par un lien ou un noeud. Après chaque prélèvement, la spatule est rincée avec de l'eau milli-Q et rangée individuellement dans un sachet en polyéthylène neuf. Les spatules ne doivent jamais être manipulées sans gant.

Les piluliers et bouchons destinés à l'analyse des métaux et contaminants organiques sont congelés immédiatement à -20°C . Les autres piluliers sont conservés au réfrigérateur.

PRELEVEMENT D'ORGANISMES MARINS





1. Prélèvement

Le protocole décrit ci-dessous est applicable aux deux espèces utilisées par le RNO, moules et huîtres. Il est adaptable aux autres bivalves (palourdes, coques, etc.).

Les prélèvements sont effectués en dehors de la période de reproduction des espèces cibles (lignes directrices OSPAR). Pour les moules et les huîtres, sur le littoral français métropolitain, le mois de novembre représente un bon compromis.

Pour un point de prélèvement donné, les coquillages sont chaque fois collectés au même endroit, à un niveau moyen entre ceux des hautes et des basses mers pour la façade Manche-Atlantique, au même niveau bathymétrique pour la Méditerranée et les Antilles. Cette position dans la zone intertidale (ou ce niveau bathymétrique) ne doit pas varier pendant la durée du programme de surveillance.

Pour chaque point, les individus prélevés doivent constituer un lot homogène en taille et reproductible d'un prélèvement à l'autre. Pour les moules, la taille doit être comprise entre 35 et 65 mm. Les huîtres doivent avoir entre 2 et 3 ans (être dans leur 3^{ème} année).

Le nombre d'individus collectés dépend des contaminants à mesurer et de la quantité de chair fournie par les mollusques. Dans tous les cas, pour être représentatif, un échantillon doit comprendre un minimum de 50 moules ou 10 huîtres (lignes directrices OSPAR). Cependant, pour garantir la possibilité d'analyser de nombreux contaminants organiques, les échantillons devront en général être composés d'un nombre d'individus très supérieur à ces minima.

Sur les points où sont prélevés des animaux de culture (parc à huîtres, filière à moule, etc.), il faut impérativement **s'assurer que les coquillages ont au moins six mois de présence sur le site**.

Les moules sont détachées de leur support une à une, en prenant soin de ne pas arracher le byssus car ceci compromettrait leur survie lors du transport et de l'épuration. Les coquillages sont rincés extérieurement à l'eau de mer sur les lieux du prélèvement. Au cours de la collecte, on veillera à ce que les animaux ne soient pas immergés dans le fond du récipient utilisé.

Le délai entre le prélèvement et l'épuration doit être le plus court possible. Le transport des bivalves vivants se fait en caisse isotherme. Si on utilise des accumulateurs de froid, ceux-ci ne doivent pas être en contact direct avec les mollusques et le froid à l'intérieur de la glacière ne doit pas être excessif afin de ne pas provoquer la mort des bivalves. En règle générale, les chocs thermiques doivent être évités entre le prélèvement et la fin de l'épuration.

2. Epuration des coquillages

Afin d'éliminer les fèces et pseudo-fèces, les coquillages vivants sont épurés le plus rapidement possible après le prélèvement. Pour cela ils sont placés pendant environ 24 heures dans de l'eau de mer provenant de la région de prélèvement et préalablement décantée. La couche d'eau recouvrant les coquillages doit être d'au moins 10 cm. Les individus doivent être isolés du fond du récipient utilisé par une grille ou un portoir non métalliques. Il est recommandé de ne pas utiliser de système de bullage pouvant introduire des contaminants dans l'eau.

Cette opération peut être réalisée dans une claire ou un bassin de professionnel, ou dans des bacs dédiés à cet usage, en plastique non coloré, et traités comme indiqué au § 5.

3. Décoquillage des bivalves

Ce paragraphe s'applique dans le cas où les bivalves doivent être fournis décoquillés au laboratoire d'analyse.

Le décoquillage est la phase du traitement la plus délicate car les mollusques ne sont plus protégés par leur coquille et peuvent être contaminés par l'atmosphère du laboratoire ou des projections diverses. Il est donc nécessaire de procéder au décoquillage et à l'égouttage dans un laboratoire où n'est menée aucune activité contaminante. Le port de gants en polyéthylène ou nitrile jetables est impératif lors du



décoquillage. En cas d'utilisation de gants de protection (pour les huîtres par exemple), ceux-ci doivent être recouverts d'un gant jetable en polyéthylène ou nitrile.

Le décoquillage doit se faire avec un couteau à huître ou un scalpel en acier inoxydable propre. Procéder avec précaution en évitant d'endommager le mollusque avec la lame. Pour les moules il est indispensable d'éliminer le byssus.

La chair est mise à égoutter sur un entonnoir de Buchner en porcelaine. Le temps d'égouttage est de 30 minutes. L'idéal est de laisser égoutter les coquillages sous une hotte à flux laminaire si le laboratoire en est muni, et, dans tous les cas, de protéger le Buchner avec une feuille d'aluminium calcinée.

Lorsqu'il n'est pas possible de décoquiller les échantillons immédiatement après la phase d'épuration, il est possible de conserver les coquillages entiers et vivants pendant 24 heures maximum. La méthode de stockage doit garantir la survie des animaux et ne pas introduire de risque de contamination. Les mollusques ne doivent pas stagner dans leur eau d'égouttage. Dans ces conditions, un réfrigérateur, une glacière ou tout endroit frais peut être utilisé.

Après chaque usage, les entonnoirs et couteaux utilisés sont rincés à l'eau courante puis à l'eau désionisée. Ils sont ensuite placés individuellement dans un sac en polyéthylène fermé, jusqu'à leur utilisation suivante.

L'expérience montre que l'indice de condition des moules prélevées peut avoir une incidence forte sur leur teneur en contaminants. Ceci est particulièrement important dans le cas d'utilisation de moules en cage implantées sur des sites trophiquement pauvres ("monitoring actif"). Dans le but de calculer l'indice de condition moyen des moules, il convient de **réserver les coquilles des individus entrant effectivement** dans l'échantillon. Ces coquilles sont débarrassées des épibiontes (tels que les balanes) et rincées rapidement à l'eau douce. Elles sont ensuite séchées à 110° C pendant deux heures et pesées ensemble après refroidissement. La chair correspondante doit également être pesée.

4. Conditionnement de la chair

Si l'on a procédé au décoquillage des bivalves, la chair égouttée doit être placée dans des piluliers de verre préalablement traités comme indiqué au paragraphe suivant. Les piluliers ne doivent être remplis qu'au 3/4 et fermés par une feuille d'aluminium calcinée avant la pose du bouchon.

5. Traitement du matériel

Piluliers

Les piluliers neufs sont d'abord lavés avec un détergent sans phosphate. On effectue ensuite un nouveau lavage sans détergent suivi d'un rinçage à l'eau milli-RO. Les piluliers sont alors passés au moins 8 heures à 450°C dans un four. On les laisse refroidir dans le four. Ils sont ensuite fermés avec une feuille de papier aluminium calcinée et leur couvercle plastique puis stockés.

Les couvercles en plastique neufs sont rincés à l'eau courante puis à l'eau Milli-Q. Ils sont alors séchés à l'étuve dans des sachets plastiques ouverts. Les sachets sont ensuite fermés et réservés en attendant que les piluliers soient disponibles.

Calcination des feuilles d'aluminium

Tout l'aluminium en feuille utilisé lors des diverses manipulations et conditionnements des échantillons doit être calciné. Cette opération est réalisée dans un four, à 450°C pendant 8 heures. Les feuilles calcinées peuvent être conservées enveloppées dans une feuille plus grande, également calcinée. Les manipulations après calcination et jusqu'au stockage doivent être effectuées avec des gants de coton.

Bacs d'épuration neufs

Si l'épuration des bivalves est pratiquée dans des bacs dédiés à cet usage, ceux-ci doivent avoir une capacité suffisante pour admettre un volume d'eau garantissant la survie des coquillages. Ils doivent



être en matière plastique non colorée et pouvoir être fermés par un couvercle. Un portoir perforé, de même composition, est introduit à l'intérieur de chaque bac, permettant d'isoler le mollusque du fond de celui-ci. Le traitement ci-dessous a pour but d'éliminer les agents de fabrication et de démoulage. Il est fait une fois pour toutes sous réserve d'une utilisation exclusive. L'opération se compose successivement de :

- lavage au détergent habituel avec une éponge douce ne rayant pas la surface.
- rinçage à l'eau courante.
- trempage intérieur dans HNO₃ à 2% pendant 4 jours, portoirs inclus.
- rinçage à l'eau désionisée. Egoutter sans essuyer.
- stockage fermé.

Les récipients servant à la manipulation de l'eau d'épuration sont traités de la même façon (par exemple des jerricans en plastique).

Entretien des bacs d'épuration

Avant chaque utilisation les récipients servant à la manipulation de l'eau doivent être rincés une fois avec un peu d'eau de mer avant remplissage.

A la fin de la phase d'épuration, les bacs sont vidés, rincés sommairement si nécessaire avec un peu d'eau de mer. Ils doivent être égouttés rapidement et stockés fermés.

Ces récipients ne doivent **jamais être lavés avec un détergent ou tout autre produit**. L'eau de mer utilisée pour l'épuration suffit à en assurer la propreté, sans risque de contamination. Ces bacs ne doivent jamais être utilisés pour autre chose que l'épuration des coquillages. Entre deux utilisations ils doivent être gardés fermés.