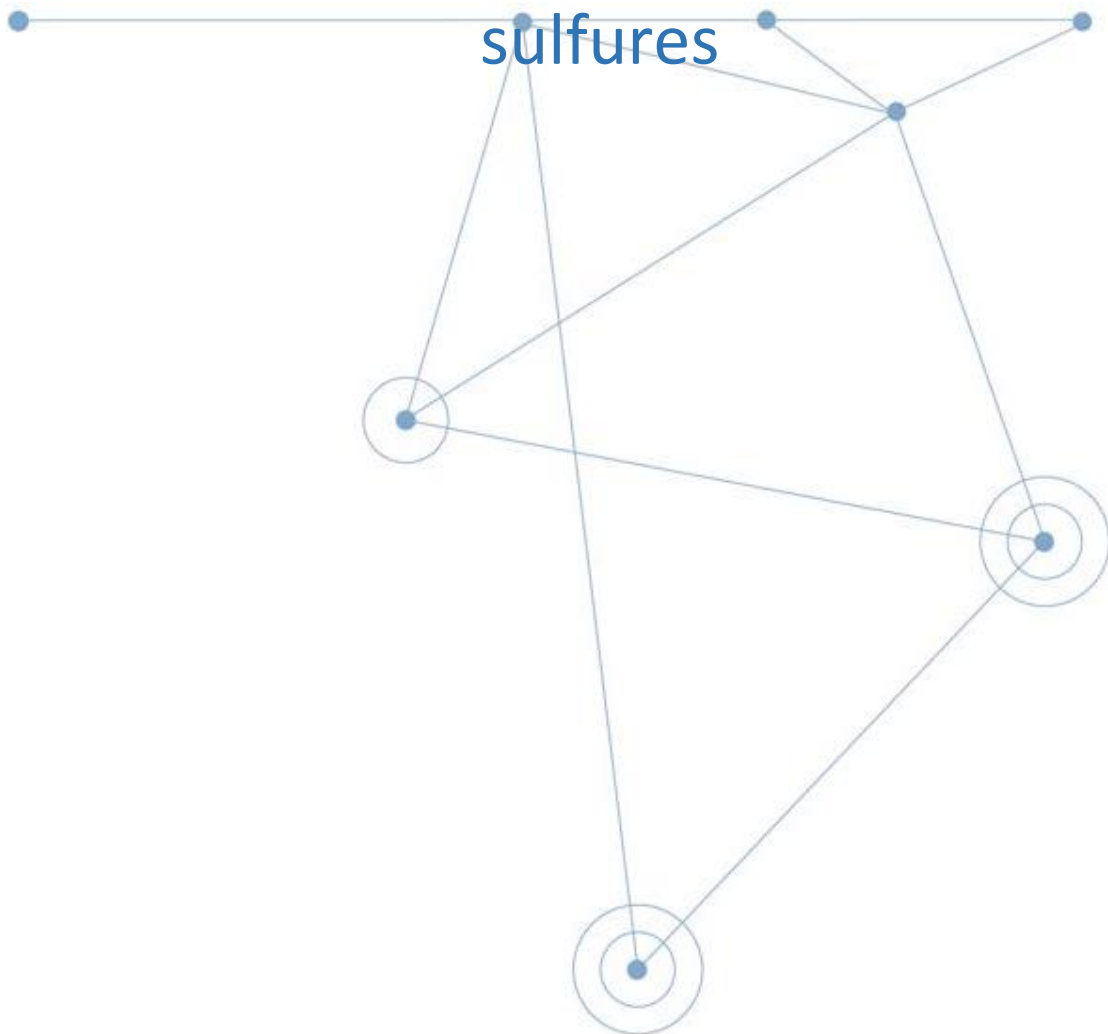


Analyse de l'ammonium et interférences liées à la présence de sulfures



Fiche documentaire

Titre du rapport : Analyse de l'ammonium et interférences liées à la présence de sulfures	
Référence interne : REM/EEP/ELP 20-04 Diffusion : <input checked="" type="checkbox"/> libre (internet) <input type="checkbox"/> restreinte (intranet) – date de levée d’embargo : AAA/MM/JJ <input type="checkbox"/> interdite (confidentielle) – date de levée de confidentialité : AAA/MM/JJ	Date de publication : 2020/07/28 Version : 1.0.0 Référence de l’illustration de couverture Langue(s) : Français
Résumé/ Abstract : <p>Dans le cadre de l’adaptation du protocole d’analyse de l’ammonium par fluorimétrie manuelle, aux besoins du laboratoire (environnements réduits notamment), plusieurs points d’améliorations ont été étudiés. Notamment, pour contourner les interférences provoquées par la présence de sulfures.</p>	
Mots-clés/ Key words :	
Comment citer ce document :	
Disponibilité des données de la recherche :	
DOI :	

Commanditaire du rapport :	
Nom / référence du contrat :	
<input type="checkbox"/> Rapport intermédiaire (réf. bibliographique : XXX) <input type="checkbox"/> Rapport définitif (réf. interne du rapport intermédiaire : R.DEP/UNIT/LABO AN- NUM/ID ARCHIMER)	
Projets dans lesquels ce rapport s'inscrit (programme européen, campagne, etc.) :	
Auteur(s) / adresse mail	Affiliation / Direction / Service, laboratoire
auteur 1	
auteur 2	
auteur 3	
auteur 4	
Encadrement(s) :	
Destinataire :	
Validé par :	

Table des matières

1	Introduction	6
2	Matériel et Méthode	7
2.1	Rappel du protocole employé au laboratoire	7
2.2	Tests ratio échantillon / réactif	7
2.3	Effet des sulfures et expérimentation visant à s'en affranchir	8
2.3.1	Mise en évidence des interférences.....	8
2.3.2	Tests avec des paillettes de cuivre	8
2.3.3	Tests par acidification et bullage des échantillons à l'azote	9
2.3.4	Piégeage des sulfures avec le du chlorure de Zinc	10
2.3.5	Analyse par chromatographie ionique	10
2.3.6	Récapitulatif des principales expérimentations	10
3	Résultats et discussion	11
3.1	Tests ratio échantillon / réactif	11
3.2	Effet des sulfures sur l'analyse de l'ammonium.....	12
3.3	Elimination des sulfures et analyse de l'ammonium.....	15
3.3.1	Test avec le cuivre	15
3.3.2	Tests de l'acidification/bullage (AB1 et AB2) et traitement au chlorure de zinc ..	16
4	Conclusion.....	21
4.1	Elimination des sulfures	21
4.2	Méthode analytique	21
4.3	Méthodologie retenue	22
5	Perspectives	23
5.1	Effet de sel.....	23
5.2	Congélation et dilution des échantillons.....	23
5.3	Autres méthodes analytiques.....	23

1 Introduction

Dans le cadre de l'adaptation du protocole d'analyse de l'ammonium par fluorimétrie manuelle aux besoins du laboratoire (environnements réduits notamment), plusieurs points d'améliorations ont été étudiés.

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier le ratio entre le volume d'échantillon et le volume de réactif proposé par J.C Caprais et J. Le Bruchec et utilisé au LEP de 1 (échantillon) pour 4 (réactif). Ce rapport varie selon les protocoles provenant de la littérature, ainsi que les volumes utilisés. Par exemple, selon Aminot et Kerouel, 1996, il faut utiliser un rapport 4 pour 1, avec 40 mL d'échantillon et 10 mL de réactif. Il est possible de récolter un tel volume d'échantillon pour les eaux de fonds mais pas pour les eaux interstitielles obtenues à partir des carottes sédimentaires via les dispositifs d'extraction Rhizon®, ou par le biais de la centrifugation. C'est pourquoi dans les protocoles utilisés au LEP, le volume d'échantillon utilisé pour réaliser ce dosage est de 1 mL pour 4 mL de réactif. Des tests ont donc été réalisés afin d'étudier les effets de ces proportions entre le volume d'échantillon et le volume de réactif.

Dans un second temps, nous avons voulu supprimer l'interaction des sulfures avec ce dosage. En effet, les échantillons analysés au LEP présentent parfois des concentrations fortes en sulfures, notamment dans les eaux interstitielles des carottes sédimentaires qui peuvent atteindre plusieurs mM de sulfures. Les ions S^{2-} interfèrent avec le dosage de l'ammonium au-delà de 2 mg/l (Koroleff, 1969), ce qui correspond à une concentration de seulement 62 μ M. Selon des études antérieures internes (Caprais, 2013), il avait été montré une diminution des teneurs mesurées en ammonium d'environ 10% pour les concentrations en $[NH_4^+]$ VS $[H_2S]$ suivantes : 10 μ M / 25 μ M, 25 μ M / 200 μ M, 50 μ M / 300 μ M. Le signal mesuré diminue de presque 100% pour n'importe quelle concentration de la gamme NH_4^+ lorsque la concentration en sulfure est supérieure à 15 mM.

Nous allons donc nous concentrer ici sur des méthodes simples à mettre en place pour s'affranchir de ces effets, soit par la suppression des sulfures, soit par une modification de la méthode.

2 Matériel et Méthode

2.1 Rappel du protocole employé au laboratoire

Le protocole d'analyse de l'ammonium par fluorimétrie manuelle employé au laboratoire se base sur la méthode décrite par Holmes (1999). Cette technique utilise un réactif appelé WR qui est un mélange de 2L de solution tampon borate à 40 g.L^{-1} , 10 mL de sulfite de sodium à $0,040 \text{ g.L}^{-1}$ dans le réactif et 100 mL OPA (orthophthaldialdéhyde) à 2 g.L^{-1} . Lorsqu'on met le réactif en présence de l'échantillon ou du standard, la réaction est totale au bout de 6h à l'obscurité et à température ambiante.

Excepté pour l'expérimentation visant à utiliser le cuivre pour piéger les sulfures (à partir des tests acidification bullage) pour laquelle nous avons utilisé de l'eau milliQ, la matrice utilisée était de l'eau de mer artificielle à 35‰ réalisée comme suit :

- 52,4 g NaCl + 20 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + 1,4 g KCl + 3 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ QSP 1L eau milliQ

Une variante permet une certaine souplesse au niveau de l'organisation dans l'application du protocole. Les échantillons après avoir été mélangés au réactif sont mis 4h à l'obscurité puis placés au réfrigérateur à 4°C pour une mesure par fluorimétrie le lendemain. Dans ce cas, il convient de sortir les échantillons de l'obscurité pendant 1h avant la mesure afin de permettre un retour à température ambiante.

Le fluorimètre utilisé est un appareil Jasco 920 dont le gain est fixé à 1, l'atténuation de 16, la longueur d'onde d'excitation est de 365 nm et celle d'émission de 465 nm.

Afin d'analyser l'ammonium dans les meilleures conditions et d'éviter les pollutions, pour toutes les expérimentations, la verrerie et le flaconnage utilisés ont été lavés à l'HCl 10% et rincés à l'eau milliQ.

2.2 Tests ratio échantillon / réactif

Dans le but de confirmer le ratio optimal pour nos échantillons, nous avons réalisé une gamme d'étalonnage contenant des standards à 0 / 0,1 / 0,5 / 3 / 15 / 30 / 70 / 150 μM d'ammonium (sous forme de sulfates d'ammonium $\text{NH}_4^+\text{SO}_4^{2-}$).

Avec les mêmes standards, des calibrations ont été réalisées et des droites d'étalonnage ont été calculées pour des ratios de standard/réactif de 20/5 mL ; 4/1 mL ; 1/0,250 mL et 1/4 mL.

Un même « échantillon » fabriqué à une concentration théorique de 4 μM d'ammonium a été aliquoté pour être mis à réagir suivant les mêmes ratios testés pour réaliser les étalonnages. La concentration finale a été calculée avec la droite d'étalonnage correspondant au ratio échantillon/réactif utilisé. L'analyse de cet échantillon permettra de comparer la justesse de la mesure entre les différents ratios.

2.3 Effet des sulfures et expérimentation visant à s'en affranchir

2.3.1 Mise en évidence des interférences

Afin de quantifier l'effet de la présence de sulfures sur le dosage de l'ammonium par fluorimétrie, nous avons réalisé des tests d'interférence en fabriquant des solutions contenant de l'ammonium (sous forme de sulfates d'ammonium) et des sulfures (sous forme de Na_2S) à des concentrations caractéristiques des milieux marins fréquemment étudiés. Ces solutions ont été aliquotées afin de doser les composés $[\text{NH}_4^+]$ et $[\text{H}_2\text{S}]$ selon les protocoles habituellement appliqués au laboratoire.

Lors des premiers tests, des standards de sulfures ont été fabriqués à différentes concentrations de $100 \mu\text{M}$ / $1000 \mu\text{M}$ et $10\,000 \mu\text{M}$. Ces solutions ont été utilisées comme matrice pour fabriquer des standards à différentes concentrations d'ammonium. Les sulfures étant sensibles à l'oxydation, les concentrations initiales théoriques étaient souvent diminuées par la manipulation et le mélange car ces derniers induisent de l'oxygène dans le milieu.

L'ammonium étant une molécule plus stable, nous avons fait l'inverse sur les tests suivant, utilisant les standards d'ammonium à des concentrations connues comme matrice pour fabriquer les standards de sulfure. La dilution de l'ammonium engendrée était facilement anticipée par le calcul.

Au fur et à mesure des différents tests, plusieurs concentrations croisées, allant de 0 à 20 mM de sulfure et de 0 à $90 \mu\text{M}$ d'ammonium, ont été testées pour constater les effets des sulfures sur le dosage de l'ammonium par fluorimétrie.

Le dosage systématique des sulfures présents avant et après traitement a été réalisé par la méthode colorimétrique de Cline (1969), et les diverses adaptations de cette méthode ((Grasshoff, 1999 ; Le Bruchec et Caprais 2002).

2.3.2 Tests avec des paillettes de cuivre

Connaissant l'effet des sulfures sur le dosage de l'ammonium, plusieurs techniques d'élimination des sulfures ont été étudiées.

Les ions sulfures sont connus pour réagir et complexer certains métaux dont notamment le cuivre en formant de la Covellite CuS et de la Chalcocite Cu_2S (DT Rickard, 1973). Des tests ont donc été effectués pour éliminer les sulfures des échantillons via un traitement avec des copeaux ou paillettes de cuivre. Plusieurs pré-manips ont été réalisées afin de connaître la quantité de cuivre à utiliser en fonction du volume de solution, la concentration en sulfures et la durée de mise en contact. A l'issue de ces tests, nous avons réalisé l'expérimentation suivante :

Des mélanges de solutions ont été préparées dans de l'eau milliQ, à des concentrations théoriques en ammonium comprises entre $0,5$ et $70 \mu\text{M}$ et à des concentrations en sulfures, comprises entre 2 et 20 mM (-> 40 solutions en tout). Ces solutions ont été aliquotées en tripliquats et mises à réagir pendant 2h avec 200 mg de Cu en paillettes avec agitation. A l'issue de cette réaction, le surnageant a été analysé par fluorimétrie manuelle.

2.3.3 Tests par acidification et bullage des échantillons à l'azote

Les sulfures sont très volatils sous forme H_2S . Cette propriété a donc été utilisée pour tenter d'éliminer en totalité les sulfures présents en solution en acidifiant et en faisant buller les échantillons avec de l'azote. Des tests préliminaires ont été réalisés afin de déterminer la quantité d'acide à utiliser en fonction du volume d'échantillon, ainsi que la durée de réaction.

A la suite des tests préliminaires, deux expérimentations mettant en œuvre l'acidification et le bullage des échantillons ont été réalisées suivant le même procédé.

Chaque solution a donc été aliquotée en triplicats, 10 μ L d'HCl 10% pour la première expérimentation puis 30 μ L d'HCl 10% (pH final d'environ 2) ont été ajoutés, puis les solutions ont été bullées 30 minutes avec de l'azote (voir figure 1).

Contrairement au premier test où les standards étaient fabriqués le premier jour et conservés pour l'ensemble des manips de la semaine, nous avons choisi pour la seconde, de fabriquer et réaliser les tests sur les différentes concentrations de sulfures de manière journalière : un jour pour une concentration donnée de sulfures.

L'étendue des concentrations croisées théoriques en ammonium et en sulfures était de : En ammonium, 0,1 à 70 μ M lors de la première expérimentation visant à mettre en œuvre l'acidification/bullage et de 3 à 90 μ M pour la seconde. En sulfures, 0,5 à 10 000 μ M pour la première et 10 à 10 000 pour la seconde.

Enfin, lors de ce deuxième test, un aliquote de 0 μ M et 10 000 μ M de sulfures sur toute la gamme d'ammonium a été mis de côté et congelé, en vue d'une analyse avec un auto-analyseur en flux Technicon (au laboratoire DYNECO par Florian Caradec). Cette technique de référence pour l'analyse de l'ammonium, se base également sur le principe de la fluorimétrie. Ces analyses en flux ont été faites sans répliques.



Figure 1 : Montage du bullage des solutions étalon

2.3.4 Piégeage des sulfures avec le du chlorure de Zinc

Lors de la deuxième expérimentation « acidification/bullage », un aliquote a été mis en contact avec du chlorure de zinc ($ZnCl_2$) : 150 μ l de $ZnCl_2$ 1M pour 3 mL d'échantillon afin de tenter un piégeage des sulfures et voir la compatibilité avec le dosage manuel de l'ammonium par la suite. En effet, le $ZnCl_2$ est une molécule connue pour piéger les sulfures en solution en précipitant ces derniers sous forme de ZnS. Cet aliquote a donc été centrifugé et le surnageant récupéré pour doser les sulfures potentiellement encore présents et l'ammonium, avec les mêmes protocoles d'analyse par colorimétrie et fluorimétrie.

2.3.5 Analyse par chromatographie ionique

Il est possible de doser l'ammonium par chromatographie ionique. Ce procédé permet de faire migrer les différentes molécules sur une colonne. Un détecteur à conductivité détecte les variations au fur et à mesure que la colonne libère les composés et restitue un signal sinusoïdal, donc le pic est proportionnel à la concentration de la molécule dans l'échantillon. L'ammonium forme un pic dans la pente descendante du pic de sodium.

Selon ce principe, la présence de sulfures ne devrait pas interférer sur le dosage de l'ammonium avec cette méthode.

Les échantillons préparés lors des expérimentations d'acidification /bullage, ont donc été analysés par chromatographie ionique avant et après traitement, afin de comparer les résultats obtenus par fluorimétrie et de constater s'il y a une interférence par les sulfures.

2.3.6 Récapitulatif des principales expérimentations

Tableau 1 : Récapitulatif des conditions des principales expérimentations présentées dans ce rapport

Expérimentations mettant en œuvre différents moyens d'éliminations ou de piégeage des sulfures	Méthode d'analyse			Concentrations théoriques croisées (μ M) dans les étalons	
	Fluorimétrie manuelle	Chromatographie	Fluorimétrie en flux	ammonium	sulfures
Cuivre	X			0,5/3/10/30/70	2/6/20/50/80/1000/10 000/20 000
Acidification bullage 1 (« AB1 »)	X	X (pas après traitement)		0,1/3/15/30/70	0,5/10/50/100/1000/5000/10 000
Acidification bullage 2 (« AB2 »)	X	X	X	3/15/30/70/90	10/ 10 000
ZnCl ₂	X	X	X	3/15/30/70/90	10/ 10 000

3 Résultats et discussion

3.1 Tests ratio échantillon / réactif

Plusieurs ratios échantillon/réactif ont donc été testés pour une gamme de concentration en ammonium allant de 0 à 150 μM . La figure 2 montre que pour des ratios 4/1 (rapports de 20/5 mL, 4/1 mL et 1/0,250 mL), la corrélation est linéaire jusque 30 μM tandis qu'elle l'est jusque 70 μM pour le rapport 1/4. Les pentes, ordonnées à l'origine, coefficients de corrélation de l'échantillon à 4 μM en NH_4^+ théorique, sont calculées sur les points dont le rapport est linéaire (Tableau 1). Donc c'est-à-dire jusqu'à 30 μM pour le rapport 4/1 et 70 μM pour le rapport 1/4.

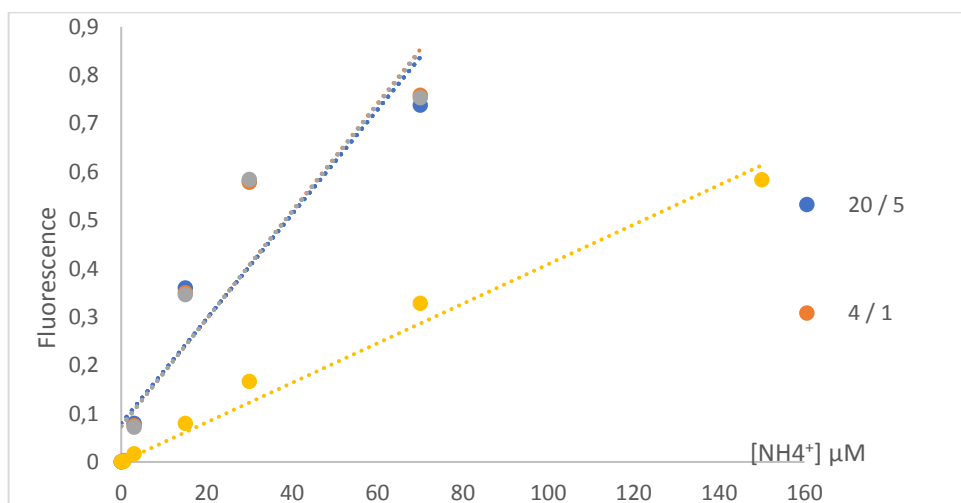


Figure 2 : Etalonnages avec les différentes proportions d'échantillon et de réactif

Tableau 2 Caractéristiques des étalonnages et résultats de l'analyse de « l'échantillon à 4 μM »

Vol (mL) Sample/réactif	a	b	Coefficient corrélation	Concentration "échantillon 4 μM "
20 / 5	0,02003	0,0072	0,993	5,74
4 / 1	0,01997	0,0037	0,994	5,57
1 / 0,250	0,02004	0,0041	0,996	5,60
1 / 4	0,00477	0,0034	0,997	3,80

D'après la figure 2 et le tableau 1, les résultats obtenus pour un ratio échantillon/réactif de 4/1 sont constants, il n'y a pas d'effet du volume pour un même ratio. En revanche lorsque ce ratio est inversé 1/4, la pente est atténuée de 25%. Ce qui est logique puisque, l'échantillon est dilué par 4 par le réactif. On constate qu'avec un ratio 1/4, on peut perdre de la sensibilité sur les points bas de la gamme mais gagner en linéarité dans les points hauts.

Par ailleurs, on observe que « l'échantillon » à 4 μM d'ammonium en théorie semble être plus justement quantifié avec la gamme d'étalonnage réalisée avec le rapport 1/4. La méthode d'analyse utilisée avec le ratio de 1/4 est moins sensible mais permet d'avoir des résultats plus justes. C'est cette méthode qui est à privilégier.

3.2 Effet des sulfures sur l'analyse de l'ammonium

Avant chaque test visant à éliminer les sulfures, un test témoin sans élimination est effectué afin de quantifier l'impact seul des sulfures sur le dosage de l'ammonium. Les résultats de recouvrement sont calculés par rapport à une concentration en ammonium mesurée sans présence de sulfure. La figure 3 présente l'évolution des % de recouvrement en NH_4^+ en fonction de l'évolution des teneurs en sulfures dans le milieu. Pour des concentrations inférieures à 700 μM de sulfures, et pour de faibles concentrations d'ammonium de 3,2 μM , le % de recouvrement n'est pas élevé et reste en moyenne inférieur à 20%. Pour des concentrations proches de 11 μM en ammonium, ce recouvrement augmente à 60%. A partir d'environ 27 μM d'ammonium, il est proche de 90%. Un effet combiné de la concentration en sulfures et en ammonium est observé. Plus la concentration en ammonium est élevée et plus il faut une concentration forte en sulfures pour observer une diminution du recouvrement. Autour de 700 μM de sulfure, les concentrations en ammonium sont diminuées de 80% à 3,2 μM d'ammonium, 50% à 10,6 μM d'ammonium, 20% à 26,5 μM d'ammonium. A environ 17 mM de sulfures, il n'est plus possible de détecter la présence d'ammonium.

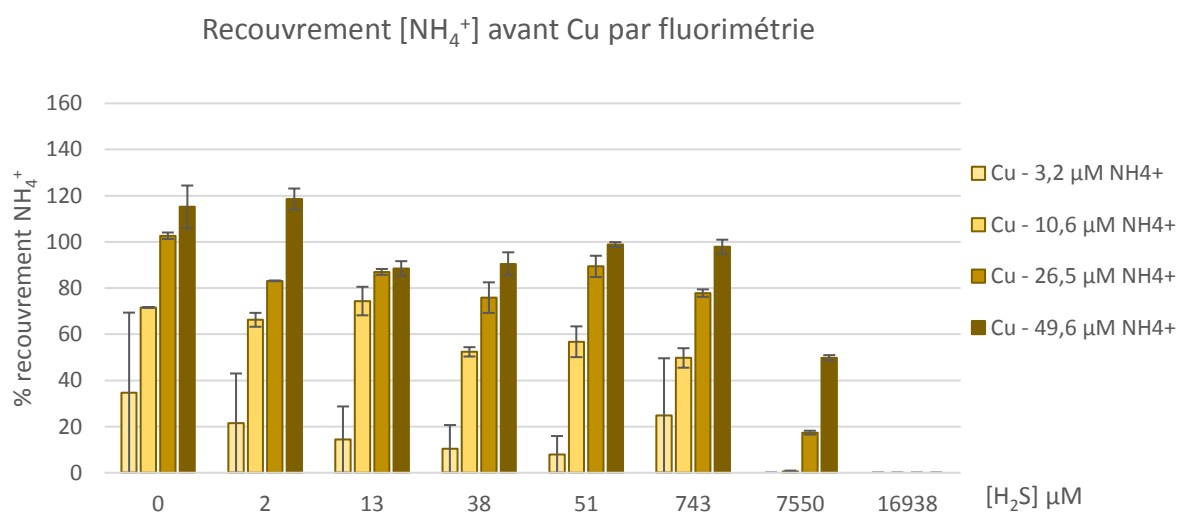


Figure 3 : Recouvrement de l'ammonium en présence de sulfure : Témoin de l'expérimentation « cuivre »

Ces premiers constats d'atténuation sont confirmés par les deux expérimentations suivantes visant à éliminer les sulfures par acidification et bullage à l'azote. La figure 5 présente ces deux expérimentations. AB1 regroupant les concentrations testées lors de la première expérimentation et AB2 celles de la seconde.

Recouvrement $[\text{NH}_4^+]$ avant acidification bullage par fluorimétrie

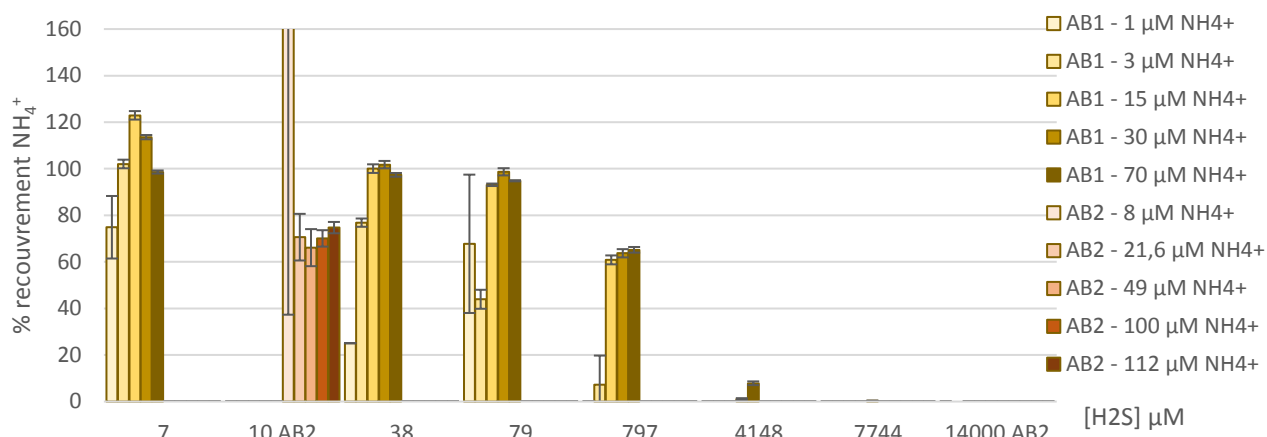
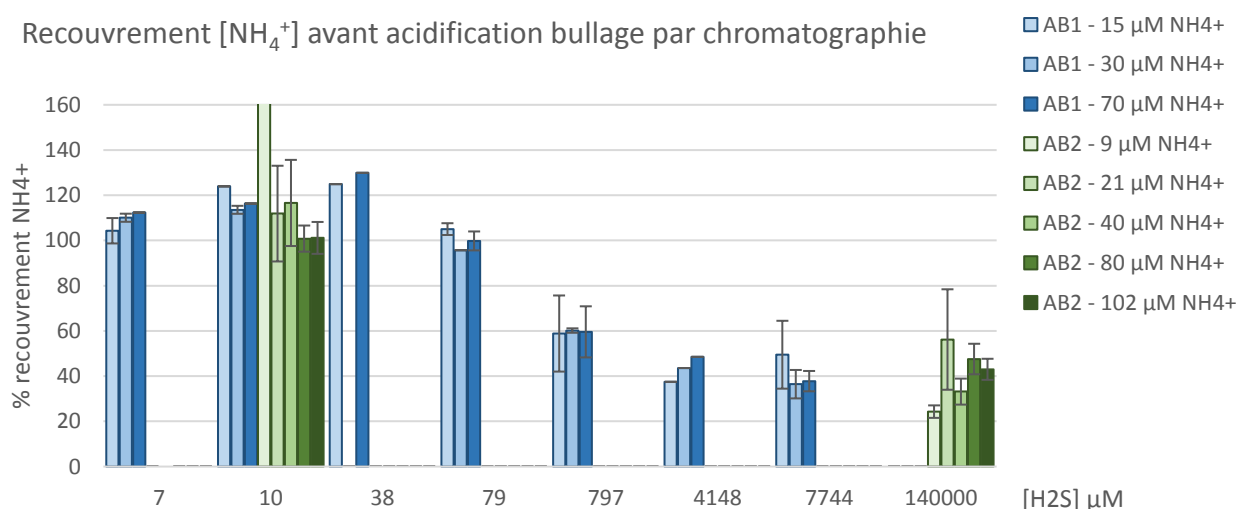


Figure 4 : Recouvrement de l'ammonium en présence de sulfures : Témoin des expérimentations AB1 et AB2

D'après la figure 5, les dosages des solutions à 1 μM d'ammonium présentent des variations de moyennes et d'écart-types importantes. Cela s'explique par une éventuelle pollution du milieu environnant et parce que ce niveau de concentration est proche de la limite de quantification qu'on estime être peu en dessous de 1 μM (cela restera à déterminer avec des tests selon le protocole final retenu). De plus pour des concentrations de 1 et 3 μM, le % de recouvrement en NH_4^+ diminue dès qu'il y a présence de sulfures. A partir d'une concentration en ammonium de 15 μM, l'interférence provoquée par les sulfures est visible à partir de 80 μM en H_2S . A partir de 5 mM en H_2S , l'ammonium n'est quasiment plus détecté. Les recouvrements des concentrations obtenus lors de la seconde expérimentation AB2 sont légèrement en dessous de 80% pour toutes les concentrations en ammonium. A l'exception d'un recouvrement de 188% pour 8 μM d'ammonium, qu'on suppose être dû à une pollution. Ce rendement inférieur à la première expérimentation peut être expliqué par un problème non expliqué lors de la manipulation puisqu'il est présent pour toutes les concentrations. Pour l'expérimentation AB2, plus aucune trace d'ammonium n'est détectable en fluorimétrie à 14 mM de sulfures.

Recouvrement $[\text{NH}_4^+]$ avant acidification bullage par chromatographie



Les résultats obtenus pour les échantillons dont la concentration en ammonium était de 1 μM et 3 μM initialement n'ont pas été intégrés à la figure 6 en raison de valeurs aberrantes. Cependant, à partir d'une concentration en NH_4^+ de 15 μM et de sulfures à 797 μM , une très nette baisse du recouvrement est observée puisque seulement 40% d'ammonium est retrouvé

Les rendements obtenus par chromatographie ionique lors de l'expérimentation AB2 sont meilleurs qu'en fluorimétrie. En effet, la figure 6 montre que le rendement est d'environ 100 % à 10 μM de sulfures et autour de 40% à 14 mM de sulfures, quand il est de 80 % et 0% en fluorimétrie pour des concentrations respectives en sulfures. Les rendements sont également meilleurs pour l'expérimentation AB1 car le rendement est de 40% à environ 4 mM et 8 mM de sulfures, alors qu'ils sont proches de 0 par fluorimétrie.

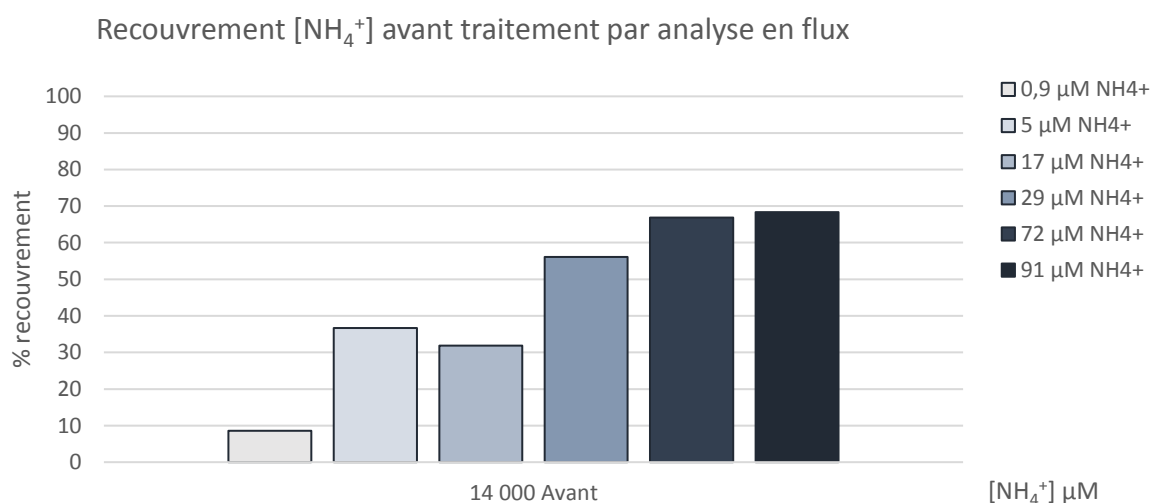


Figure 6 : Recouvrement de l'ammonium avant traitement analysé par un auto analyseur en flux

La figure7 montre qu'en analyse en flux, une concentration de 14 mM d' H_2S limite le recouvrement d'ammonium d'environ 60% à 5 μM d' NH_4^+ et jusqu'à 30% pour 90 μM d' NH_4^+ . Plus la concentration en ammonium est élevée est mieux il est préservé sans toutefois parvenir à dépasser 70% de recouvrement.

Il y a un effet significatif de la présence de sulfures sur le dosage de l'ammonium et ce, avec les trois méthodes d'analyses testées ici. Il y a donc un effet croisé de la concentration en ammonium et sulfures. En effet, plus les concentrations en ammonium sont élevées et moins le recouvrement de ce composé en est impacté.

Avec les analyses par fluorimétrie et en dessous d'une concentration en ammonium de 15 μM , il y a un impact des sulfures à des concentrations proche de 40 μM . Pour toutes les méthodes d'analyses, au-dessus de 15 μM d'ammonium, il semblerait qu'il faille une concentration en sulfures d'environ entre 80 et 700 μM pour impacter toutes les concentrations en ammonium testées. Cette concentration charnière reste à déterminer.

Enfin, des trois techniques d'analyse utilisées ici, la méthode en flux semble être celle présentant le moins d'interférences liées à la présence de sulfures. En effet, à une concentration de 14 mM de sulfures, presque 10% d'ammonium est retrouvé pour une concentration théorique de 1 μM et jusqu'à 70% d'ammonium pour 90 μM .

3.3 Elimination des sulfures et analyse de l'ammonium

3.3.1 Test avec le cuivre

L'expérimentation réalisée avec les paillettes de cuivre a permis de piéger 100% des sulfures présents dans les standards allant de 0 à environ 17 mM de sulfure.

Après traitement, le recouvrement (%) des concentrations en ammonium en fonction des différentes concentrations en sulfure est présenté dans la figure 8 ci-dessous :

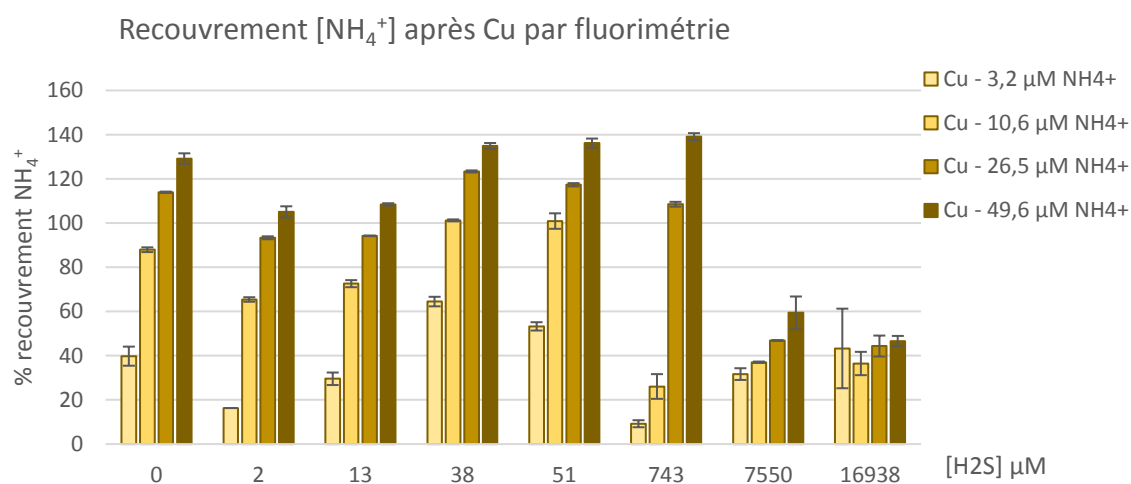


Figure 7 : Recouvrement de l'ammonium en présence de sulfure après incubation avec du cuivre

Pour une concentration d'environ 3 μM d'ammonium, le recouvrement atteint rarement les 50%. A partir de 10 μM en NH_4^+ , le recouvrement est meilleur, mais n'atteint jamais 100%.

La figure 8 montre également qu'à 743 μM de sulfures, le recouvrement est autour de 100% à partir d'une concentration en ammonium de 26 μM. Mais encore faible en dessous de cette concentration en ammonium

Entre 743 μM et 7 mM d' H_2S , le recouvrement diminue allant de 30% à 60% maximum sur les concentrations en ammonium les plus élevées.

Il semble donc que bien que les sulfures aient été piégés, ceux-ci ont une influence sur le dosage de l'ammonium à des concentrations supérieures à 743 μM. En effet le recouvrement des teneurs en ammonium n'est pas optimum.

3.3.2 Tests de l'acidification/bullage (AB1 et AB2) et traitement au chlorure de zinc

Avant de réaliser les expérimentations visant à mettre en œuvre une acidification/bullage ou un traitement au chlorure de zinc nous avons vérifié que ces traitements n'ont pas un impact significatif sur l'étalonnage de la méthode. Les résultats des étalonnages dont les étalons ont été acidifiés sont présentés ci-dessous.

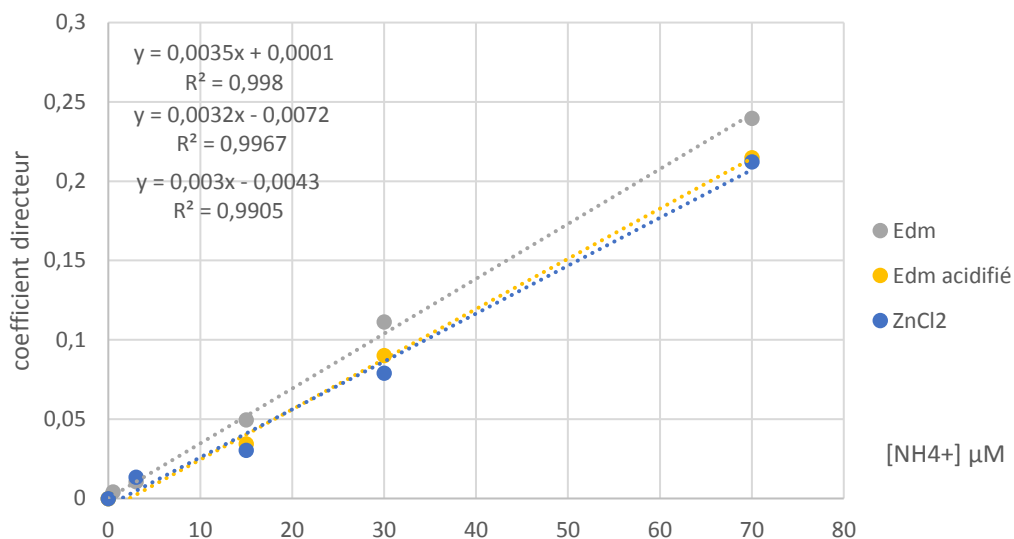


Figure 8 : Droite d'étalonnage du NH_4^+ en fonction des différents traitements

Les pentes des étalons acidifiés/bullés et de ceux en présence de ZnCl_2 ne présentent pas de différence significative mais sont bien distinctes de celle dont les étalons n'ont subi aucun traitement. Il y a donc un léger effet des traitements sur l'étalonnage. Pour la suite des expérimentations, les étalons ont donc été traités de la même façon que les échantillons.

Tableau 3: Concentrations en sulfures dans les standards pour AB2 et l'expérimentation avec le zinc

	moyenne [H ₂ S] µM	écart- type	CV	% d'élimination des sulfures
S10	9,6	0,7	7,2	
S10-acidifié/bullé	0,3	0,2	46,7	96,5
S10-ZnCl ₂	1,8	0,3	18,9	81,1
S10 000	13754	316,6	2,3	
S10 000-acidifié/bullé	23,4	8,2	35,1	99,8
S10 000-ZnCl ₂	18,0	6,9	38,2	99,9

Pour la seconde expérimentation acidification/bullage, la concentration mesurée en sulfures pour tous les standards confondus est d'environ 10 µM dans les standards S10 et environ 14 mM dans les standards S10 000.

Tous les traitements par acidification et bullage ont permis d'éliminer la quasi-totalité des sulfures présents dans les standards, même jusque 14 mM de sulfures comme le montre le tableau 2. La première expérimentation mettant en œuvre l'acidification/bullage présentait elle un taux d'élimination des sulfures de 99,97%.

Cependant, le traitement par $ZnCl_2$ n'a a priori pas fonctionné totalement pour les standards contenant $10 \mu M$ de sulfures puisqu'il en restait environ 20%.

Le tableau 2 montre également que quel que soit le traitement utilisé pour éliminer les sulfures, les résultats obtenus présentent une augmentation de la variabilité des concentrations d' H_2S mesurées.

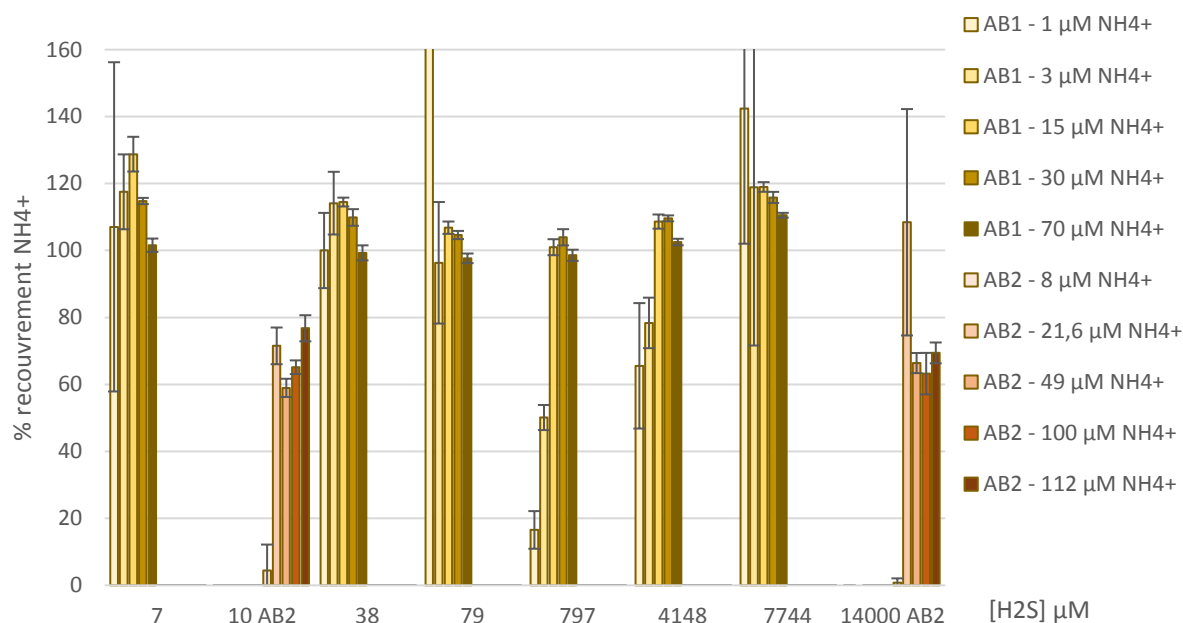


Figure 9 : Recouvrement de l'ammonium en présence de sulfure après acidification et bullage (analyse par fluorimétrie manuelle)

D'après la figure 11, le recouvrement en ammonium après les traitements par acidification/bullage est plutôt satisfaisant. Cependant pour les faibles concentrations en ammonium de 1 et 3 μM , le recouvrement n'est pas total entre 80 et environ 4 mM de sulfures. Le fait de retrouver un rendement plus élevé à ces concentrations d'ammonium à environ 8 mM de sulfures peut provenir d'une pollution.

La figure 11 montre également qu'après élimination de presque la totalité des sulfures par acidification et bullage lors de l'expérimentation AB2, l'analyse fluorimétrique manuelle révèle qu'on ne parvient à quantifier qu'entre 60 à 80% de l'ammonium d'origine pour les standards à $10 \mu M$ et à 14 mM de sulfures. De plus, pour les standards à $10 \mu M$, les recouvrements étaient les mêmes avant leur acidification.

Il est à noter qu'un précipité blanc s'est formé lors de la réalisation des standards à 14 mM d' H_2S dès l'introduction de la solution mère dans les standards d'ammonium. Nous avons donc du bien agiter pour aliquoter ensuite. Mais il est difficile d'homogénéiser un précipité, cela a donc pu engendrer un biais dans les résultats.

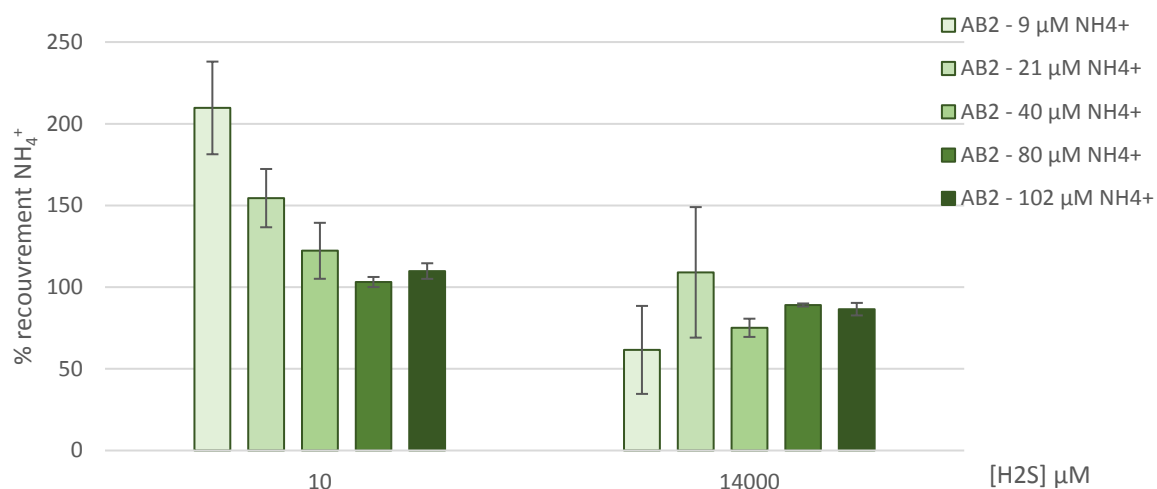


Figure 10 : Recouvrement de l'ammonium après acidification et bullage lors de l'expérimentation AB2 (analyse par chromatographie ionique)

L'analyse de l'ammonium après acidification et bullage de l'expérimentation AB1 n'a pas pu être réalisée (problème de matrices incompatibles entre les étalons et les échantillons). Cependant, les résultats de l'expérimentation AB2 sont présentés sur la figure 11. Le recouvrement est total pour les échantillons contenant à l'origine 10 μM de sulfures. Les plus faibles concentrations en ammonium présentent même des rendements bien au-delà de 100%, ce qui peut traduire une pollution. Les standards qui contenaient à l'origine 14 mM de sulfures présentent après traitement un rendement moyen de 80% lorsqu'il était d'environ 50% avant (Figure 6). Cela est très légèrement au-dessus de ce qu'on obtient en fluorimétrie manuelle ou on obtenait en moyenne 70% (figure 10).

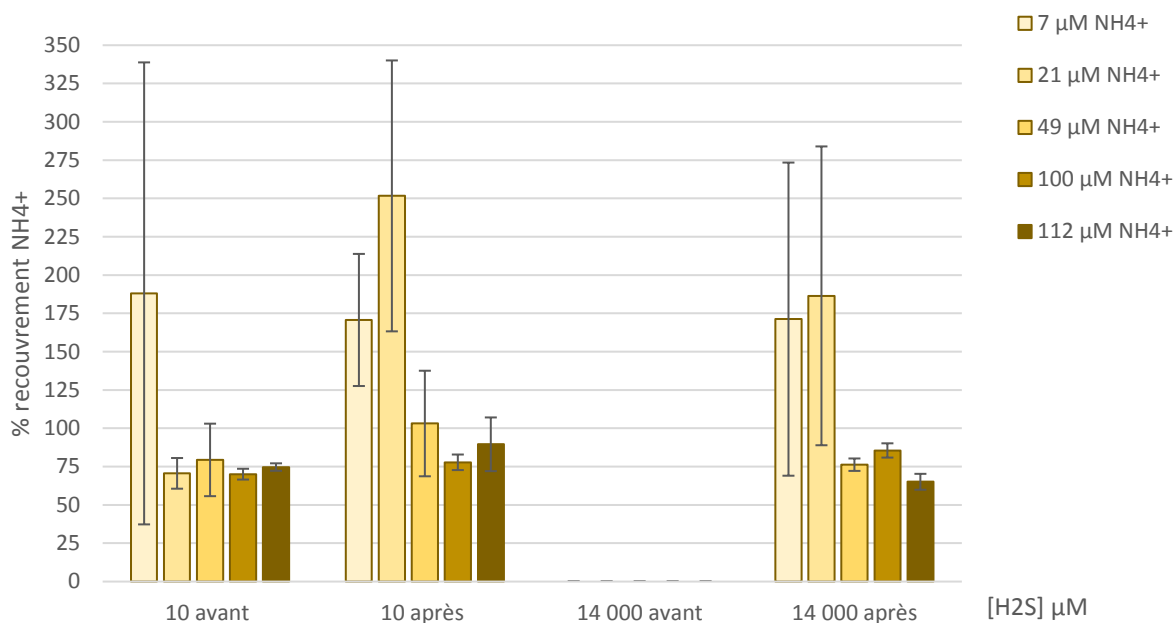


Figure 11 : Recouvrement en ammonium après traitement par chlorure de zinc (mesures par fluorimétrie manuelle)

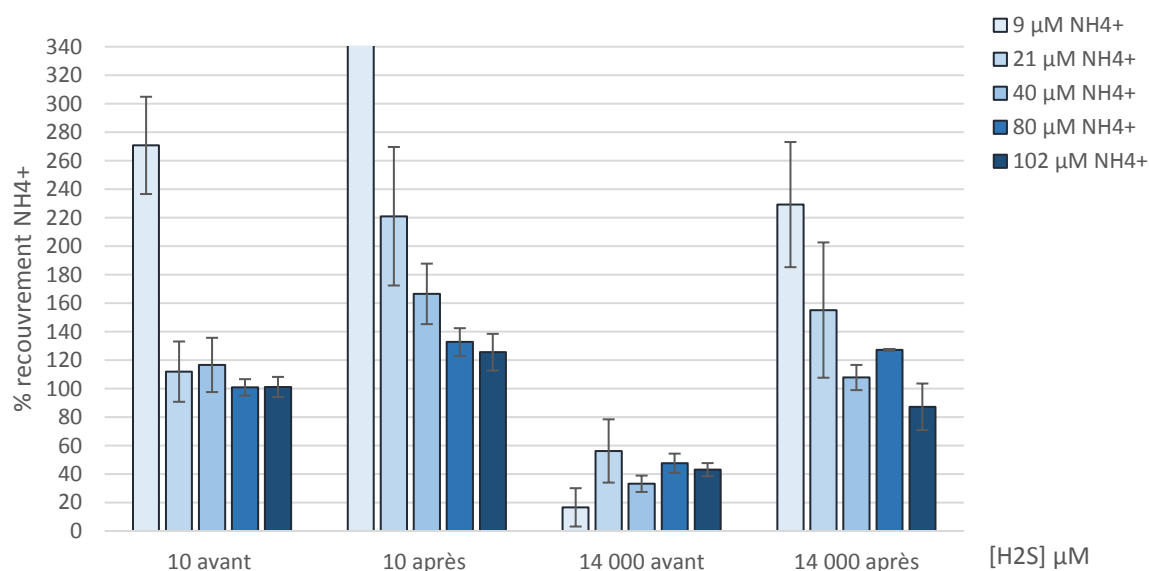


Figure 12 : Recouvrement en ammonium après traitement par chlorure de zinc (mesure par chromatographie ionique)

Les figures 12 et 13 présentent les résultats obtenus après traitement des sulfures par le chlorure de zinc puis analysés respectivement par fluorimétrie et chromatographie. Les concentrations inférieures à 40 μM d'ammonium sont très élevées car les rendements sont très supérieurs à 100% : Jusqu'à 500% pour les standards à 10 μM de sulfures et 9 μM d'ammonium.

Cette remarque est corrélée avec une barre d'erreur importante pour les deux premières concentrations en ammonium testées par les deux méthodes d'analyse.

Pour les standards ayant à l'origine 10 μM de sulfures, à partir de 40 μM d'ammonium, les recouvrements se situent entre 80% et 100% du NH_4^+ en analyse par fluorimétrie et autour de 120% par chromatographie ionique. Pour les standards ayant à l'origine 14 mM de sulfures, le rendement est d'environ 100% à partir d'une concentration en ammonium de 50 μM et varie entre 90 % et 130 % à partir d'une concentration en ammonium de 40 μM .

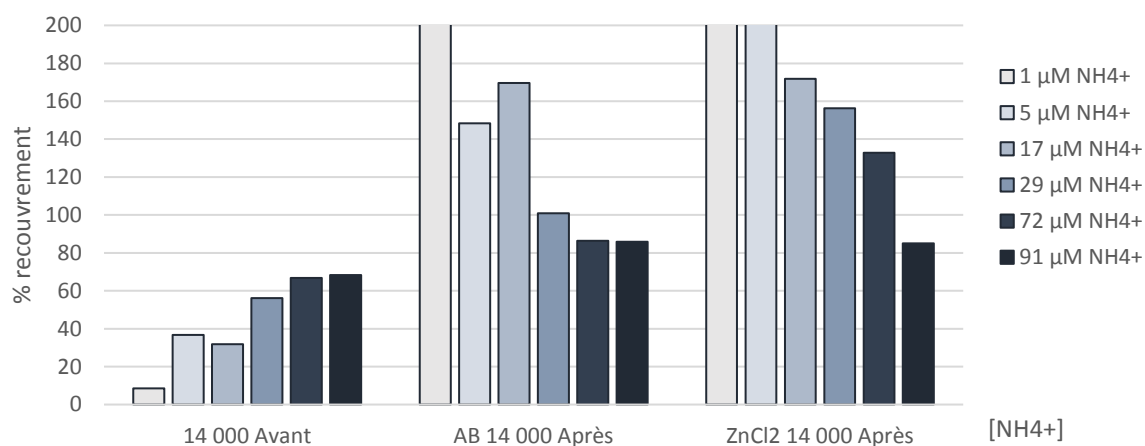


Figure 13 : Recouvrement en ammonium avant et après traitement par acidification / bullage et par chlorure de zinc (analyse par fluorimétrie en flux)

Il est à rappeler que seuls les standards contenant à l'origine 14 mM de sulfures ont été analysés par fluorimétrie en flux et sans reliquats.

La figure 14 présente les recouvrements après traitement par acidification / bullage (AB) ou par ZnCl_2 . Les rendements sont souvent supérieurs à 100 %. Il y a donc sûrement eu des contaminations liées aux traitements.

Après traitement par acidification et bullage des standards qui contenaient 14 mM de sulfures, les recouvrements sont entre 80% et 100% à partir de 29 μM d'ammonium. Après traitement au chlorure de zinc, le rendement est autour de 80 % pour une concentration de 91 μM d'ammonium et dépasse les 120 % entre les concentrations en ammonium de 1 μM à 72 μM .

4 Conclusion

4.1 Elimination des sulfures

L'élimination des sulfures avec du cuivre pour le dosage de l'ammonium, est une méthode longue à mettre en place en raison des 2h d'incubation. De plus, les recouvrements obtenus ne sont pas satisfaisants (diminution du recouvrement à des valeurs comprises entre 30% et 60% au-delà d'une concentration en sulfures de 750 μM). Cette méthode n'a donc pas été retenue.

En raison de la formation de précipité entraînant des manipulations délicates (centrifugation, dosage du surnageant) et potentiellement une variabilité difficilement maîtrisable, le traitement au ZnCl_2 est à priori à exclure pour répondre à cette problématique, et ce, en utilisant n'importe quelle méthode analytique.

L'acidification accompagnée d'un bullage des solutions semble permettre une bonne élimination des sulfures et potentiellement, un dosage de l'ammonium à suivre. Cependant, cette technique est sensible selon la méthode d'analyse utilisée pour quantifier l'ammonium et peut amener un biais aléatoire liés à des pollutions, surtout sur les faibles concentrations en ammonium.

4.2 Méthode analytique

D'une manière générale, on observe que l'analyse de l'ammonium est une méthode sensible aux pollutions en dessous de 10 à 15 μM d'ammonium.

La méthode fluorimétrique manuelle (cuve avec spectrofluorimètre LEP) ne permet pas de travailler sur une étendue de gamme importante et les limites de détection et la linéarité de la méthode utilisée ici restent à être déterminer de manière stricte. Cependant, au vu des différents résultats et même si la robustesse de la méthode reste à montrer en dessous de 3 μM , on peut à priori travailler sur une gamme s'étendant de 1 à 90 μM avec un ratio échantillon/réactif de 1/4.

Mais si la méthode d'analyse en fluorimétrie manuelle présente l'avantage d'être simple à mettre en place car il s'agit d'une réaction et d'une lecture au fluorimètre, il semble difficile de la combiner avec un traitement des échantillons en vue de s'affranchir de l'effet d'interférence de leur mesure que provoquent les sulfures.

La chromatographie est une méthode à priori plus répétable, même lorsqu'il y a eu acidification et bullage des échantillons.

Au regard des différents traitements et des différentes méthodes d'analyses, les mesures par flux semblent être plus robustes. Sa répétabilité n'a pas été testée lors de cette étude mais étant une méthode de référence, cela a été largement fait par ailleurs. C'est une méthode analytique qui est cependant plus lourde à mettre en place ou à déplacer pour des missions de terrain par exemple.

Si nous ne parvenons pas à nous affranchir d'un traitement « intrusif » pour éliminer l'effet des sulfures, la méthode analytique la plus fiable semble donc être la chromatographie ionique. Cette méthode a pour avantage de bénéficier d'un grand passeur et donc de permettre l'analyse d'une grande quantité d'échantillons (donc de répliquats) sans monopoliser un opérateur. Mais c'est à contrario une méthode d'analyse complexe car elle nécessite une maintenance importante des appareils et des compétences particulières pour sa mise en œuvre.

4.3 Méthodologie retenue

Au vu des résultats de cette étude, on pourrait appliquer une méthodologie selon différents cas de figures :

- En absence d' H_2S , le protocole d'analyse de l'ammonium de base sans prétraitement est appliqué (fluorimétrie manuelle ou chromatographie de préférence si possible)
- Lorsque la concentration en H_2S dans les échantillons atteint $50 \mu M$ et que la concentration en ammonium est inconnue, un protocole d'acidification-bullage pourrait être réalisé
- Si les concentrations en ammonium et en sulfure sont présumées fortes (centaine de μM d'ammonium et à partir de $50 \mu M$ de sulfures) dans les échantillons, ces derniers peuvent simplement être dilués avec de l'eau de mer artificielle. Les dilutions doivent permettre d'avoir une concentration en H_2S inférieure donc à $50 \mu M$ et une concentration en NH_4^+ dans la gamme de mesure comprise entre 1 et $90 \mu M$.

Ensuite, la chromatographie est une bonne technique analytique garantissant une certaine robustesse des résultats. Cependant, c'est une technique difficilement transportable pour des missions par exemple. On peut donc conserver la méthode fluorimétrique manuelle si les échantillons ne peuvent pas être conservés pour une analyse postérieure.

Mais d'une manière générale, quel que soit le traitement ou la méthode analytique appliqués, les résultats de recouvrements présentés dans cette étude sont souvent inférieurs à 100%. Cela pourrait supposer qu'il se produit une complexation ou réaction rendant l'ammonium « indisponible » au dosage. Cela est confirmé par les faibles recouvrements en chromatographie avant ou après traitement. En effet, ce dosage se basant sur la rétention et restitution des molécules ciblées, la présence de sulfure ne devrait pas être problématique car ils ne se situent pas sur le même pic que l'ammonium. Cette hypothèse est également confortée par l'observation de la formation d'un précipité blanc créé lors de la fabrication des standards 10 000 S dès l'ajout de l'ammonium dans ceux-ci. On peut supposer que ce précipité est du sulfure d'ammonium.

5 Perspectives

5.1 Effet de sel

D'après Amino et Kérouel (2010), la mesure de l'ammonium est sujette à un effet de sel. En effet, ce dernier peut avoir des effets sur la coloration obtenue du fait que le pH de la réaction se trouve modifié par l'effet tampon de l'eau de mer. De plus, l'ion ammonium a tendance à s'adsorber sur les parois du récipient lorsque l'étalon est préparé dans de l'eau déminéralisé.

Il est donc recommandé d'une part, soit de calculer un facteur correctif, soit d'utiliser strictement la même matrice, en évitant l'eau déminéralisée, pour l'étalonnage de la méthode et pour diluer les échantillons. Ainsi, il est préférable d'utiliser au mieux de l'eau de mer appauvrie en nutriments ou à défaut de l'eau de mer artificielle comme nous l'avons fait ici.

Il serait intéressant pour aller au bout de la démarche de réaliser des tests analytiques par fluorimétrie manuelle et chromatographie ionique pour comparer l'emploi de l'eau de mer appauvrie ou de l'eau de mer artificielle.

5.2 Congélation et dilution des échantillons

Les standards qui ont été analysés par flux au laboratoire Pelagos (Dyneo) avaient été congelés avant d'être analysés. Cela pourrait peut-être expliquer une dégradation intermédiaire des sulfures et donc de meilleurs recouvrements obtenus pour les standards contenant 14 mM de sulfures et n'ayant subis aucun traitement.

De plus, les eaux riches en sulfures le sont généralement aussi en ammonium et elles peuvent donc être diluées. En raison de l'effet de sel, il conviendrait de réaliser cette dilution avec de l'eau de mer artificielle ou appauvrie.

La congélation des échantillons, avec un délai d'attente suffisant avant l'analyse, combiné à une dilution permettant de rester dans les gammes de concentration de nos méthodes, sont des pistes à explorer pour éliminer les sulfures de manière passive et sans ajouter de potentiel biais.

5.3 Autres méthodes analytiques

Les échantillons environnementaux associés aux eaux interstitielles des sédiments contiennent des valeurs en ammonium de l'ordre de plusieurs μM à plusieurs centaines de μM .

Il serait donc intéressant de tester la méthode colorimétrique de Solorzano (1969) dont la gamme s'étend de 50 à 3000 μM d'ammonium sur des échantillons contenant également des sulfures.