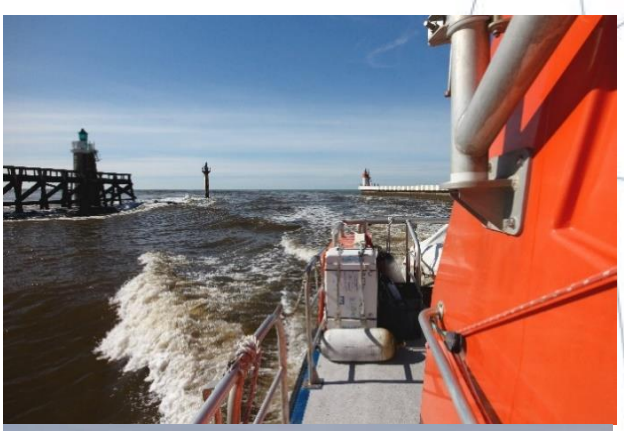
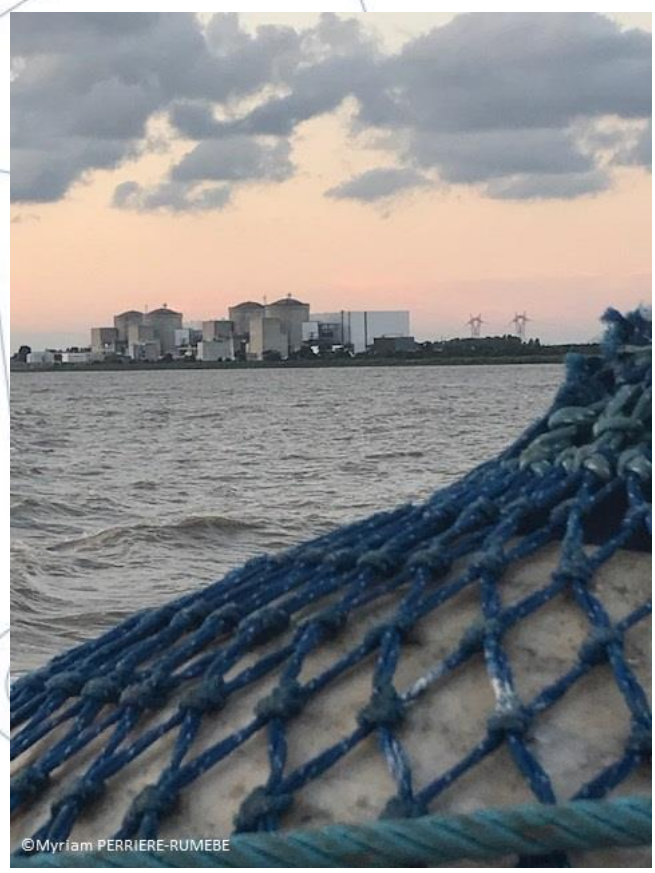
Ifremer – Département Océanographie et Dynamique des Écosystèmes
Laboratoire Environnement Ressources d'Arcachon
Laure GOURIOU, Claire METEIGNER, Florence D'AMICO, Marie-Pierre TOURNAIRE, Matthieu LONGO, Gaël AUGEAU

Février 2022 - ODE/LITTORAL/LERAR/22.003

Etude de stabilité des échantillons nutriments avant analyse

Eaux salines et estuariennes





Fiche documentaire

<table>
<tr><td colspan="2">Titre du rapport : Etude de stabilité des échantillons nutriments avant analyse - Eaux salines et estuariennes</td></tr>
<tr><td>Référence interne :
ODE/LITTORAL/LERAR/22.003

Diffusion :
☒ libre (internet)

☐ restreinte (intranet)

☐ interdite (confidentielle)</td><td>Date de publication : Février 2022

Langue(s) : Français</td></tr>
<tr><td colspan="2">Résumé/ Abstract :
Après un rappel du contexte de l'étude, le document présente la stratégie et les outils méthodologiques mis en œuvre par le laboratoire pour évaluer la stabilité des échantillons d'eau destinés à l'analyse des nutriments (ammonium, nitrate + nitrite, nitrite, phosphate et silicate) dans les eaux estuariennes et marines.
Ce document donne des éléments qui permettent de statuer sur le délai de conservation des échantillons avant leur mise en analyse.</td></tr>
<tr><td colspan="2">Mots-clés/ Keywords :
Etudes de stabilité, nutriments, conservation des échantillons, eaux marines et eaux estuariennes.</td></tr>
<tr><td colspan="2">Comment citer ce document :
Laure GOURIOU, Claire METEIGNER, Florence D'AMICO, Marie-Pierre TOURNAIRE, Matthieu LONGO, Gaël AUGEAU (2022). Etude de stabilité des échantillons nutriments avant analyse - Eaux salines et eaux estuariennes. ODE/LITTORAL/LERAR/22.003</td></tr>
<tr><td colspan="2">Disponibilité des données de la recherche : Oui</td></tr>
<tr><td colspan="2">DOI :</td></tr>
</table>

Commanditaire du rapport :	
Nom / référence du contrat : ☒ Rapport définitif	
Projets dans lesquels ce rapport s'inscrit : AEAG REPHY ARCHYD-HM (P305-0008) – ARCHYD BM (P305-0049)	
Auteur(s) / adresse mail	**Affiliation / Direction / Service, laboratoire**
Laure GOURIOU / laure.gouriou@ifremer.fr	PDG-ODE-LITTORAL-LERAR
Claire METEIGNER / claire.meteigner@ifremer.fr	PDG-ODE-LITTORAL-LERAR
Florence D'AMICO/ florence.d.amico@ifremer.fr	PDG-ODE-LITTORAL-LERAR
Marie-Pierre TOURNAIRE / marie.pierre.tournaire@ifremer.fr	PDG-ODE-LITTORAL-LERAR
Matthieu LONGO	PDG-ODE-LITTORAL-LERAR
Gaël AUGEAU	PDG-ODE-LITTORAL-LERAR
Encadrement(s) :	
Destinataire :	
Relu par : Isabelle Auby **Validé par :** Anne Daniel	

Table des matières

1 Objet et contexte 5
2 Conditionnement et stockage des nutriments avant analyse 6
3 Présentation de l'étude de stabilité 7
4 Mise en œuvre de l'étude de stabilité 9
4.1 Caractéristiques des lots d'échantillons 9
4.1.1 Lieux, conditions de marée et saisons de prélèvement 9
4.1.2 Echantillonnage et conditionnement des échantillons avant conservation 10
4.1.3 Concentrations et caractéristiques physico-chimiques des lots d'échantillons 10
4.2 Conditions de conservation 11
5 Assurance qualité/contrôle qualité 12
6 Résultats et discussions 13
6.1 Validation des lots à T0 13
6.2 Résultats de stabilité au cours du temps 14
6.2.1 Silicate 14
6.2.2 Ammonium 17
6.2.3 Nitrate + Nitrite 19
6.2.4 Phosphate 21
6.2.5 Nitrite 22
7 Conclusion 23
Bibliographie 24
Annexe 1 : Analyses statistiques des jeux de données Silicate 26
Annexe 2 : Analyses statistiques des jeux de données des échantillons Ammonium 29
Annexe 3 : Analyses statistiques des jeux de données des échantillons Nitrate+Nitrite 31
Annexe 4: Analyses statistiques des jeux de données des échantillons Phosphate 33
Annexe 5 : Analyses statistiques des jeux de données des échantillons Nitrite 35

1 Objet et contexte

Ce rapport présente les études de stabilité effectuées au sein du laboratoire pour évaluer l'effet des conditions de filtration et de stockage avant analyse des nutriments dans les échantillons d'eau marine et estuarienne.

Dans l'absolu, afin de déterminer précisément les concentrations en nutriments d'échantillons naturels, il est préconisé de réaliser les analyses le plus rapidement possible après l'échantillonnage afin d'éviter l'altération des concentrations sous l'effet de l'activité des organismes vivants présents dans l'échantillon. Cependant, pour des raisons pratiques et économiques, il est très souvent impossible de procéder aux analyses dans un délai de quelques heures. Dans ces conditions, les méthodes de préservation couramment utilisées sont la congélation et la réfrigération dans le cas particulier du silicate.

Le guide technique traitant de l'état de l'art de la conservation des échantillons de nutriments d'eau de mer (Daniel, 2020b) recense l'ensemble des avantages et inconvénients de chaque méthode de conservation proposée dans la littérature depuis plus de 70 ans. Ainsi, la conservation à très basse température est censée stopper toutes les activités biologiques susceptibles de modifier les concentrations en nutriments et de limiter les phénomènes d'adsorption et de désorption particulaire. De nombreuses études ont été conduites à ce sujet mais aucune conclusion univoque n'a pu être établie au regard de ces différents travaux (Strickland et Parsons, 1972 ; Riley, 1975 ; MacDonald et McLaughlin, 1982 ; Grasshoff *et al*., 1983 ; Chapman et Mostert, 1990 ; Clemenston et Wayte, 1992; Kirkwood, 1992 ; Avanzino et Kennedy, 1993 ; Dore *et al*., 1996 ; Horowitz *et al*., 1996 ; Grasshoff *et al*., 1999 ; Gardolinski *et al* 2001 ; Fellmana *et al*., 2008).

Les discordances observées entre les résultats de ces études tiennent principalement au fait que l'efficacité de la conservation dépend de nombreux facteurs tels que la composition de la matrice de l'échantillon (bactéries, phytoplancton, matières en suspension…), le type de filtration appliquée avant conservation, la composition et la taille du flaconnage utilisé, la température de stockage et les concentrations en nutriments des échantillons étudiés.

Le manuel de méthodes d'analyse en milieu marin d'Aminot et Kérouel (2004), ainsi que le document de méthode « hydrologie » donnant les consignes pour le prélèvement (Daniel et Lampert, 2016), préconisent de conserver les échantillons destinés à l'analyse des nutriments (ammonium, phosphate, nitrate et nitrite) à une température inférieure à -23°C (optimum -25°C) dans des flacons en polyéthylène de petit volume (60 à 125 ml) et à l'abri de la lumière. Il est par contre déconseillé de stocker au congélateur les échantillons destinés à l'analyse du silicate, la congélation étant à l'origine de la polymérisation de ce composé. Ces échantillons sont alors conservés au réfrigérateur à 4°C.

Une préfiltration sur filtres nylon est fortement recommandée avant stockage, pour éliminer une partie du matériel particulaire. La taille des pores de filtration peut être adaptée à la zone d'étude dans une fourchette comprise entre 10 et 200 µm (plus l'eau est chargée en particules, plus la taille des pores peut être grande). Dans le cas du silicate, une filtration supplémentaire est nécessaire afin d'éliminer d'une part le matériel détritique (silice biogénique) susceptible d'être dégradé par les bactéries et d'autre part les cellules de diatomées pouvant assimiler le silicate présent dans l'échantillon. Cette filtration peut être effectuée sur membrane d'acétate de cellulose à 0,45 µm. On notera que les auteurs déconseillent, pour les autres nutriments, une étape de filtration supplémentaire qui s'avère être une possible source de contamination. Cependant, dans les cas avérés d'interaction biologique ou physique avant l'analyse, une filtration sur 0,45 µm peut être effectuée. La centrifugation est préférée à la filtration lorsque les interactions se déroulent au cours de l'analyse.

Dans ces conditions de conservation et de traitement de l'échantillon, Aminot et Kérouel (2004) indiquent que les durées maximales de conservation avant analyse s'élèvent à deux mois pour le silicate (au réfrigérateur) et à 5 à 6 mois pour les autres nutriments (au congélateur).

Ces préconisations sur les conditions et les délais de conservations avant analyse différent de celles publiées dans la norme NF EN ISO 5667-3 sur la conservation et manipulation des échantillons d'eau. Dans ce document normatif, il est recommandé de filtrer systématiquement les échantillons sur 0,45 µm, et cela quel que soit le nutriment étudié. La température de congélation minimale pour la conservation des nutriments ammonium, phosphate, et nitrate+nitrite est plus élevée que celle prescrite par Aminot et Kérouel (2004) :-18°C *vs* - 23°C. Dans ces conditions, la durée de stockage des nutriments autres que le silicate n'est que de 1 mois. Pour le paramètre silicate, conservé dans les mêmes conditions que celles prescrites par Aminot et Kérouel (2004) (filtration appliquée avant conservation et température identique), le délai maximal recommandé avant analyse est de 1 mois contre 2 dans Aminot et Kérouel (2004). Dans la norme, les échantillons destinés à l'analyse du nitrite sont quant à eux conservés au réfrigérateur et non pas au congélateur. Dans ces conditions, le délai maximal de conservation avant leur analyse n'est que de quelques jours. Le guide technique « hydrologie » traitant des normes existantes pour la conservation et l'analyse des nutriments en milieu aquatique (Daniel, 2020a) souligne les incohérences de cette norme vis-à-vis des spécificités propres au milieu marin.

Pour valider sa méthode de conservation des échantillons, le laboratoire d'Arcachon a décidé de mener une étude de stabilité sur des échantillons représentatifs de ses séries d'analyse de routine.

2 Conditionnement et stockage des nutriments avant analyse

Les échantillons destinés à l'analyse des nutriments **ammonium**, **phosphate** et **nitrate + nitrite** sont **filtrés sur des membranes à nylon de porosité 40 µm,** conditionnés dans des flacons en polypropylène de 60 ml remplis au ¾, et conservés à l'abri de la lumière **à <-23°C pendant un délai maximal admissible avant analyse de 6 mois.**

Les échantillons destinés à l'analyse du nutriment **nitrite** sont **filtrés sur des membranes d'acétate de cellulose de porosité 0,45 µm,** conditionnés dans des flacons en polypropylène de 60 ml remplis au ¾, et conservés à l'abri de la lumière **à <-23°C pendant un délai maximal admissible avant analyse de 3 mois.**

Les échantillons destinés à l'analyse du nutriment **silicate** sont **filtrés sur des membranes d'acétate de cellulose de porosité 0,45 µm,** conditionnés dans des flacons en polypropylène de 60 ml remplis au ¾, et conservés à l'abri de la lumière **à 4°C pendant un délai maximal admissible avant analyse de 2 mois.**

3 Présentation de l'étude de stabilité

L'étude de stabilité mise en œuvre consiste à analyser à différents pas de temps (T0, T1, T2,….Tn) un même lot d'échantillons.

Pour ce faire, chaque lot d'échantillons est préparé par aliquotage d'un échantillon d'eau naturelle dans des flacons en polypropylène de 60 ml. Dans le cas où cette eau présente de trop faibles concentrations en nutriment, le prélèvement d'eau naturelle peut être dopé avec une solution mère de nutriment avant aliquotage (Figure 1). Les lots d'échantillons sont prélevés, sur plusieurs stations et à différentes saisons afin de prendre en compte la variabilité des matrices.

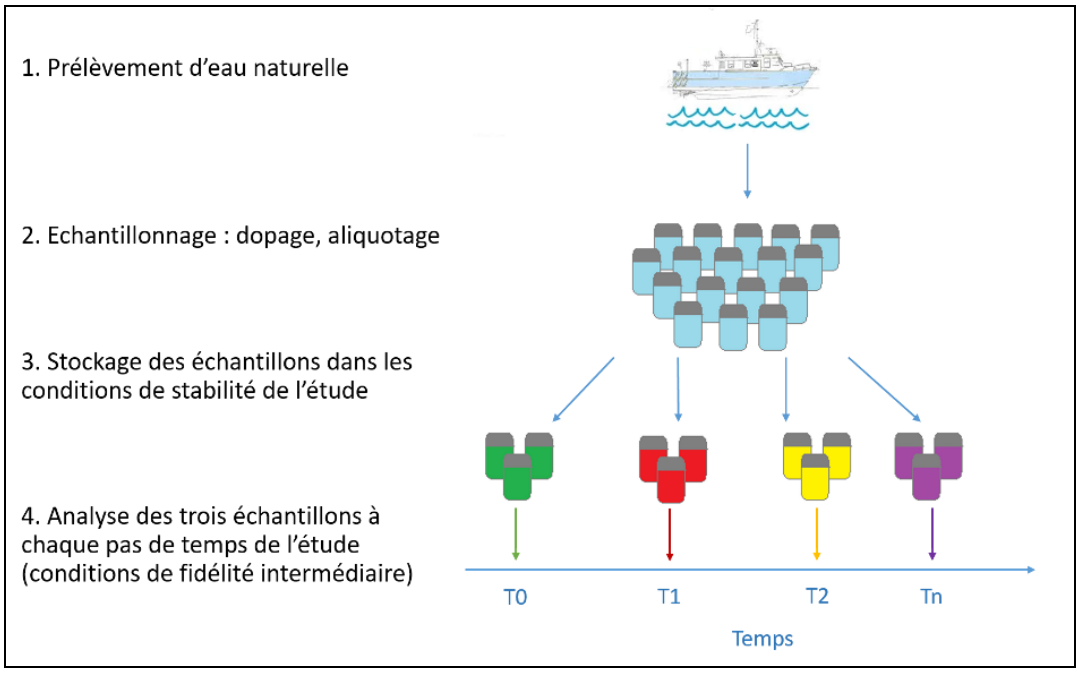


Figure 1 : Représentation de la stratégie mise en place pour les études de stabilité

Les flacons sont numérotés lors de leur remplissage afin de permettre un échantillonnage aléatoire à chaque série d'analyse.

Pour chaque lot d'échantillons, une concentration de référence à T0 est déterminée le jour du prélèvement avant la mise en stabilité des échantillons. La validation des données à T0 est une étape critique puisqu'elle conditionne l'ensemble de l'évaluation de la stabilité. Dans le cas de prélèvements non dopés, les échantillons sont considérés homogènes et la valeur à T0 est déterminée à partir de l'analyse de trois flacons. Dans le cas de prélèvements dopés, l'homogénéité du lot est supposée moins bonne. Pour cette raison, elle est vérifiée à partir de l'analyse de 10 flacons et la valeur du T0 déterminée à partir des résultats de ces 10 réplicats.

Pour l'ensemble des pas de temps suivants, trois échantillons sont analysés ; ils sont choisis aléatoirement afin de minimiser les effets liés à l'étape d'échantillonnage (non-homogénéité des concentrations lors de l'étape d'aliquotage des échantillons).

La validité des conditions de stockage est basée sur une exploitation graphique et statistique des jeux de données. Une **représentation graphique** consiste à tracer les concentrations moyennes et les écart-types associés obtenus à chaque pas de temps.

Un intervalle de stabilité a été déterminé pour chaque paramètre (tableau 1) comme étant égal à deux fois l'écart type de fidélité de la méthode analytique ($\mathbf{S_{Fi}}$).

Tableau 1 : Ecart type de fidélité de la méthode pour chaque paramètre

Nutriments	Niveaux de concentration (µmol/L)	Ecart type de fidélité de la méthode ($2*S_{Fi}$)
Silicate	0,4 - 1	25,6 %
	1-20	4,4 %
	20-40	3,1 %
	40-200	2,9%
Ammonium	0,5-1	20,6 %
	1-6	6,6 %
	6-10	4,8 %
Nitrate + Nitrite	0,2-1	42,6 %
	1-20	4,2 %
	20-400	2,6 %
Nitrite	0,03-0,16	22,5 %
	0,16-0,5	7,8 %
	0,5-2	1,9 %
Phosphate	0,04-0,15	33,1 %
	0,15-0,2	12,7 %
	0,2-0,5	5,5 %
	0,5-3	3,1 %

Les échantillons sont considérés stables lorsque toutes les moyennes sont comprises dans l'intervalle de stabilité (Figure 2, cas 1). Cette représentation graphique permet également de mettre en évidence une éventuelle évolution des concentrations en nutriments au cours du temps.

Si plusieurs concentrations moyennes sont en dehors de l'intervalle de stabilité et que plus de trois valeurs consécutives sont à la baisse (Figure 2, cas 2), on conclue que les échantillons ne sont pas stables et que les conditions de stockage appliquées ne permettent pas de maintenir l'intégrité de l'échantillon au cours du temps.

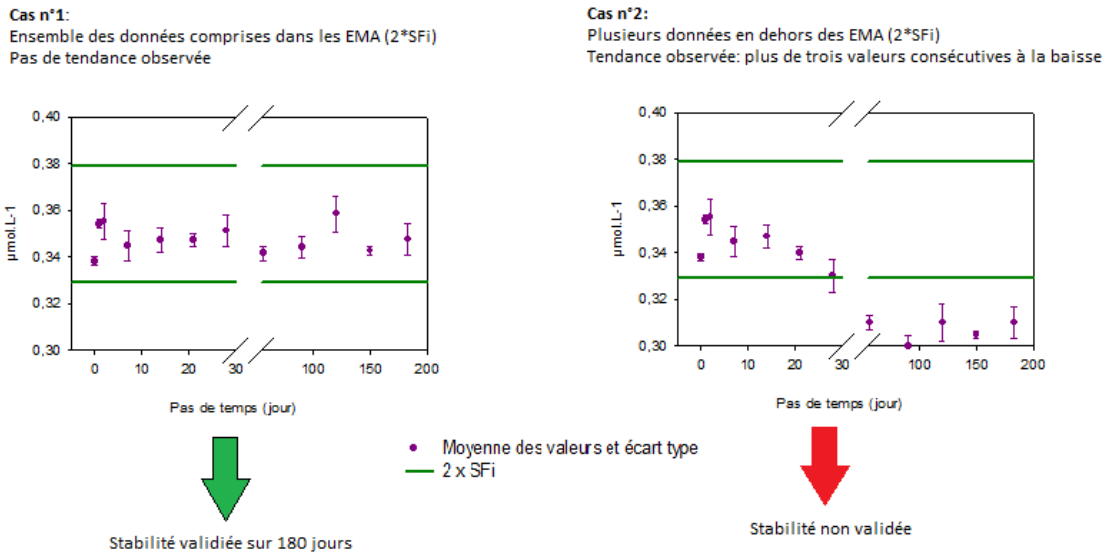


Figure 2 : Exemples de représentation graphique des résultats des études de stabilité

L'**analyse statistique** des données permet de mieux caractériser les jeux de données et est une aide à la décision pour statuer sur la stabilité des lots d'échantillons. Pour ce faire, lorsque la normalité et l'homogénéité des variances du jeu de données sont vérifiées, une ANOVA à un facteur a été utilisée. Dans le cas contraire, c'est le test non paramétrique de Kruskal-Wallis qui a été appliqué. Lorsque les résultats de ces tests mettent en évidence une différence significative des concentrations en fonction du temps, une comparaison des concentrations mesurées à partir de T1 avec celles obtenues à T0 a été effectuée selon les méthodes de Holm-Sidak et de Dunn's. La significativité de la corrélation entre les pas de temps et les concentrations a également été testée à l'aide du test de Spearman.

L'ensemble des résultats des tests statistiques est présenté dans les annexes 1 à 5.

4 Mise en œuvre de l'étude de stabilité

Les paramètres considérés pour cette étude de stabilité sont les nutriments dissous (ammonium, nitrate + nitrite, nitrite, phosphate et silicate). Leur matrice varie des eaux estuariennes aux eaux marines dont les caractéristiques (salinité, teneur en matière en suspension, abondance de phytoplancton) varient en fonction des lieux, des saisons et des conditions de marée. Le choix des échantillons utilisés pour cette étude de stabilité a été fait de manière à couvrir au mieux les particularités des échantillons habituellement analysés au sein de notre laboratoire (Tableau 2).

Tableau 2 : Concentrations mesurées et valeur médiane sur les 5 dernières années pour chaque paramètre

Nutriments	Eaux marines		Eaux estuariennes	
	Concentrations mesurés (µmol/L)	Valeur Médiane (µmol/L)	Concentrations mesurés (µmol/L)	Valeur Médiane (µmol/L)
Silicate	0,4 - 109	11	18 - 174	105
Ammonium	0,05 - 11,3	1,65	0,05 - 9,9	0,5
Nitrate + Nitrite	0,2 - 136	3,6	20 - 194	108
Phosphate	0,04 - 0,7	0,09	0,33 - 2,8	1,6
Nitrite			0,03 - 1,9	0,09

4.1 Caractéristiques des lots d'échantillons

4.1.1 Lieux, conditions de marée et saisons de prélèvement

Les lots d'échantillons ont été préparés à partir de prélèvements effectués sur les sites de suivi du laboratoire dans le cadre des réseaux de surveillance régionaux et nationaux (ARCHYD, REPHY, DCE, IGA) (Figure 3). Selon les cas, les échantillons ont été prélevés à pleine mer (PM) et/ou à basse mer (BM) et à des saisons différentes.

Deux sites sont localisés sur le bassin d'Arcachon : « Bouée 13 », sous influence océanique (prélevé uniquement à BM du fait que les concentrations en nutriments à PM sont trop proches de la limite de quantification), et « Comprian », sous influence de l'Eyre, qui apporte l'essentiel de l'eau douce et des nutriments dans le Bassin (prélevé dans les deux conditions de marée). Pour ces deux lieux, la stabilité des analytes a été étudiée à deux saisons (hiver et printemps).

Deux points estuariens ont été prélevés exclusivement au printemps : « Adour 2» sur l'estuaire de l'Adour, prélevé uniquement à PM, et l'autre sur dans le chenal médian de l'estuaire de la Gironde « IGA PK52 », échantillonné à BM et à PM.

Figure 3 : Localisation des sites de prélèvement

4.1.2 Echantillonnage et conditionnement des échantillons avant conservation

Sur chaque site de prélèvement, une bouteille Niskin d'une contenance de 5 litres est plongée à 1m de profondeur. L'échantillon ainsi récolté est conservé à l'abri de la lumière et au frais pour être aliquoté au laboratoire dans les 4 heures qui suivent le prélèvement. Dans le cas des échantillons destinés aux analyses du nitrite, un dopage est effectué au laboratoire avant aliquotage.

Conformément à ce qui est pratiqué en routine au laboratoire, une étape de **filtration** est effectuée avant l'aliquotage.

- Les prélèvements réalisés par le laboratoire sont effectués aussi bien à PM qu'à BM, les eaux étant plus ou moins chargées en particules : une filtration sur membrane à nylon de porosité 40 µm est appliquée sur les échantillons destinés aux analyses d'**ammonium**, **phosphate** et **nitrate + nitrite.**
- Pour les échantillons destinés aux analyses de **nitrite,** les échantillons sont filtrés sur des filtres d'acétate de cellulose de porosité 0,45 µm. Cette filtration est préconisée pour réduire l'absorbance « fictive » due à la composition de la matrice, interférence spécifique décrite dans le rapport d'évaluation des performances de la méthode de dosage de nitrite (Augeau *et al*., 2019).
- Dans le cadre des analyses de **silicate**, deux types de filtres d'acétate de cellulose, différant par leur porosité (0,8 µm et 0,45 µm) sont utilisés. Tous les lots d'échantillons (hiver et printemps) provenant du Bassin d'Arcachon ont été filtrés sur 0,8 µm. Seule une partie du lot d'échantillons prélevés au printemps sur ce site a également fait l'objet d'une filtration à 0,45 µm.

4.1.3 Concentrations et caractéristiques physico-chimiques des lots d'échantillons

La liste des lots échantillons est présentée dans le tableau 3, dans lequel sont également rapportées les teneurs en nutriments, les salinités et turbidités correspondantes.

- La stabilité des échantillons pour l'**ammonium**, le **nitrate + nitrite** et le **silicate** a été étudiée, à basse mer et à pleine mer, sur 7 lots d'échantillons provenant du bassin d'Arcachon et de l'estuaire de l'Adour. Les concentrations en nutriments de ces lots d'échantillons sont très contrastées.
- La stabilité du **phosphate** a été étudiée, à basse mer et à pleine mer, sur 3 prélèvements provenant du bassin d'Arcachon. Ces lots d'échantillons présentent des teneurs en phosphate du même ordre de grandeur.
- la stabilité du **nitrite** a été étudiée sur 2 prélèvements provenant d'un point de l'estuaire de la Gironde à basse mer et pleine mer. Ces lots d'échantillons présentent des teneurs en nitrite du même ordre de grandeur.

Les données de turbidité présentées dans le tableau 3 reflètent les teneurs en matière en suspension du prélèvement avant filtration. Comme déjà évoqué, les étapes de filtration n'éliminent que partiellement ces particules mais la conservation à très basse température est censée stopper toute activité biologique susceptible de modifier les concentrations en nutriments et réduire de façon drastique, pour le phosphate essentiellement, les phénomènes d'adsorption et de désorption particulaire.

Les turbidités observées pour les campagnes effectuées sur le Bassin d'Arcachon sont plus élevées au point « Comprian » qu'au point « Bouée 13 ». Les eaux de l'estuaire de la Gironde sont quant à elle très fortement chargées en matières en suspension. A contrario, les eaux estuariennes de l'Adour sont modérément chargées en particules.

Tableau 3 : Caractéristiques des lots d'échantillons étudiés

Nom des lots d'échantillons	Nutriments	Nombre d'échantillons	Concentration µmol/L	Salinité	Turbidité (NTU)
Hiver - Bouée 13 - BM	$Si(OH)_4$	33	9,00	33,32	6,4
Hiver - Comprian - BM		33	30,07	29,16	9,0
Hiver - Comprian - PM		33	8,57	33,33	11,7
Printemps - Bouée 13 - BM		33	5,35	33,5	3,6
Printemps - Comprian - BM		33	25,83	27,6	5,8
Printemps - Comprian - PM		33	5,82	33,3	4,7
Printemps - Adour - PM		33	4,52	34,97	2,2
Hiver - Bouée 13 - BM	NH_4	33	0,86	34,41	2,3
Hiver - Comprian - BM		33	2,64	30,99	3,7
Hiver - Comprian - PM		33	1,79	33,62	2,4
Printemps - Bouée 13 - BM		33	3,11	33,62	1,4
Printemps - Comprian - BM		33	7,91	27,70	4,6
Printemps - Comprian - PM		33	5,60	31,91	2,1
Printemps - Adour - PM		33	0,78	34,97	2,2
Hiver - Bouée 13 - BM	NOx	33	2,06	34,71	6,4
Hiver - Comprian - BM		33	6,33	31,78	6,9
Hiver - Comprian - PM		33	2,49	33,77	5,0
Printemps - Bouée 13 - BM		33	7,48	33,62	1,4
Printemps - Comprian - BM		33	29,79	27,70	4,6
Printemps - Comprian - PM		33	12,02	31,91	2,1
Printemps - Adour - PM		33	119,52	6,32	2,0
Printemps - Bouée 13 - BM	PO_4	33	0,08	33,62	1,4
Printemps - Comprian - BM		33	0,10	27,70	4,6
Printemps - Comprian - PM		33	0,12	31,91	2,1
Printemps - IGA - pk 52 - PM	NO_2	43	0,34*	2,13	285**
Printemps - IGA - pk 52 - BM		43	0,32*	5,75	852**

* concentration obtenue après dopage

**valeurs de turbidités très élevées : l'estuaire de la Gironde est connu pour être fortement chargé en matière en suspension

4.2 Conditions de conservation

Les échantillons sont analysés selon les pas de temps présentés dans les figures 4, 5 et 6 avec une durée maximale définie en fonction du paramètre étudié et de la durée recommandée par les documents de prescription Ifremer (cf. §2). Un pas de temps court en début d'étude a été choisi dans l'hypothèse d'une altération rapide de l'échantillon.

Les flacons utilisés pour l'analyse du T0 de certains lots d'échantillons sont stockés à température ambiante (20°C) et à l'abri de la lumière. Ils sont réanalysés au cours des premiers pas de temps de l'étude. Ce travail est effectué dans le but d'illustrer l'instabilité des échantillons à température ambiante et de démontrer par comparaison l'efficacité du stockage des nutriments à basse température.

En résumé, pour chaque lot d'échantillon, un minimum de 33 échantillons sont analysés dans des conditions de répétabilité. Hormis les échantillons destinés à mesurer la concentration à T0, analysés dans les quelques heures suivant le prélèvement, l'ensemble des échantillons est conservé au congélateur à < - 23°C pour les nutriments ammonium, nitrite, nitrate+nitrite et phosphate et au réfrigérateur à environ 4 ± 2°C pour le silicate.

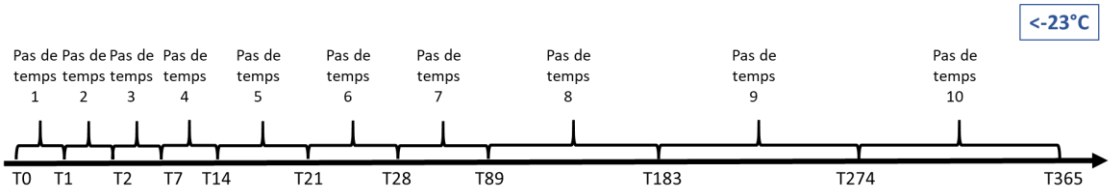


Figure 4 : Pas de temps défini pour l'étude de stabilité des paramètres : ammonium, phosphate et nitrate + nitrite

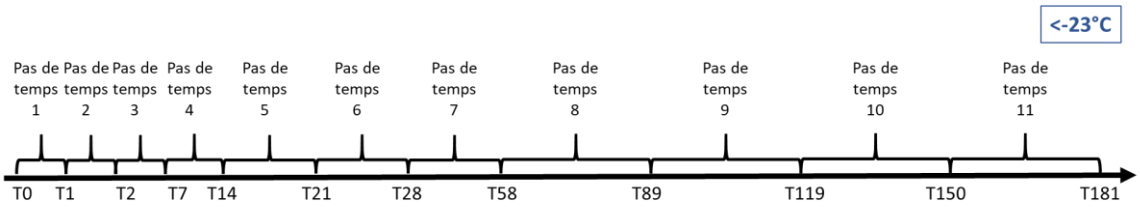


Figure 5 : Pas de temps défini pour l'étude de stabilité du paramètre : nitrite

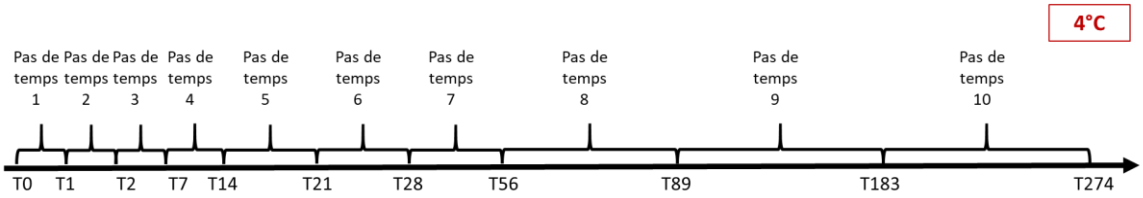


Figure 6 : Pas de temps défini pour l'étude de stabilité du paramètre : silicate

5 Assurance qualité/contrôle qualité

Le laboratoire est accrédité IS0 17025 pour l'analyse physico-chimiques des eaux (LAB GTA 05) ; les mesures sont réalisés pour les paramètres silicate, ammonium, phosphate, nitrate+nitrite et nitrite par flux continu selon la méthode Aminot et Kérouel (2007) (N° 1-2062 portée disponible sous https://www.cofrac.fr).

Dans chaque séquence analytique sont inclus trois contrôles qualité dont les concentrations en nutriment correspondent, pour le premier, à une valeur proche de la LQ et pour les deux autres au 1/3 et 2/3 de la gamme de travail. Ces contrôles qualité sont préparés à partir d'une solution commerciale certifiée différente de celle utilisée pour la gamme d'étalonnage, suivant les procédures mises en place au laboratoire.

Afin de se prémunir de toute contamination, les flacons et les filtres utilisés sont vérifiés avant utilisation, conformément aux préconisations d'Aminot et Kérouel (2007) et aux compléments au manuel de méthode d'analyses en milieu marin (Daniel *et al*., 2010).

6 Résultats et discussions

6.1 Validation des lots à T0

La valeur de la concentration déterminée à T0 est validée avant la phase de conservation des échantillons, en utilisant une démarche issue de la norme ISO 5725-6.

Dans le cas de prélèvement non dopé, la valeur du T0 est déterminée à partir de l'analyse de 3 flacons dans des conditions de répétabilité, et de 10 flacons dans le cas de prélèvement dopé, afin de s'assurer de l'homogénéité du lot.

La validation des concentrations à T0 est confirmée lorsque l'étendue de la dispersion des données (**Concentration X_{max} – Concentration X_{min}**) est inférieure à **CR $_{0,95\,(n)}$**, qui est le produit de l'écart type de la distribution (σ_r) par le facteur de l'étendue critique ($f_{(n)}$) pour un niveau de probabilité 0,95 pour un n donné.

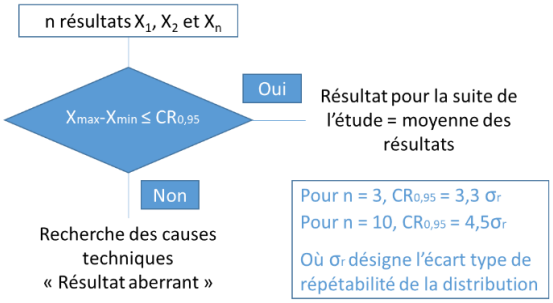


Figure 7 : Contrôle de l'acceptabilité des résultats d'essais

Les résultats obtenus pour la validation de la concentration à T0 sont présentés dans le tableau 4. Le contrôle de l'acceptabilité est conforme pour l'ensemble des lots étudiés par le laboratoire. La concentration moyenne obtenue à T0 peut donc être considérée comme la valeur cible établie pour la suite de l'étude. Les lots dopés pour le paramètre nitrite sont considérés comme homogènes.

Tableau 4 : Contrôle de l'acceptabilité des résultats d'essais

Nom des lots d'échantillons	Nutriments	n	Xmoy	σ_r	X_{max}-X_{min}	$CR_{0,95}$	Acceptabilité
			µmol/L				
Hiver - Bouée 13 - BM	$Si(OH)_4$	3	9,00	0,002	0,005	0,007	oui
Hiver - Comprian - BM		3	30,07	0,075	0,160	0,249	oui
Hiver - Comprian - PM		3	8,57	0,044	0,081	0,145	oui
Printemps - Bouée 13 - BM		3	5,35	0,151	0,321	0,501	oui
Printemps - Comprian - BM		3	25,83	0,167	0,329	0,554	oui
Printemps - Comprian - PM		3	5,82	0,066	0,115	0,219	oui
Printemps - Adour - PM		3	4,52	0,087	0,184	0,287	oui
Hiver - Bouée 13 - BM	NH_4	3	0,86	0,009	0,015	0,024	oui
Hiver - Comprian - BM		3	2,64	0,017	0,035	0,056	oui
Hiver - Comprian - PM		3	1,79	0,058	0,100	0,191	oui
Printemps - Bouée 13 - BM		3	3,11	0,059	0,114	0,197	oui
Printemps - Comprian - BM		3	7,91	0,127	0,241	0,420	oui
Printemps - Comprian - PM		3	5,60	0,058	0,108	0,191	oui
Printemps - Adour - PM		3	0,78	0,029	0,057	0,097	oui
Hiver - Bouée 13 - BM	NOx	3	2,06	0,042	0,086	0,138	oui
Hiver - Comprian - BM		3	6,33	0,020	0,040	0,066	oui
Hiver - Comprian - PM		3	2,49	0,015	0,028	0,048	oui
Printemps - Bouée 13 - BM		3	7,48	0,030	0,061	0,098	oui
Printemps - Comprian - BM		3	29,79	0,068	0,119	0,226	oui
Printemps - Comprian - PM		3	12,02	0,033	0,059	0,108	oui
Printemps - Adour - PM		3	119,52	3,374	6,798	11,167	oui
Printemps - Bouée 13 - BM	PO_4	3	0,08	0,005	0,015	0,016	oui
Printemps - Comprian - BM		3	0,10	0,005	0,014	0,017	oui
Printemps - Comprian - PM		3	0,12	0,007	0,017	0,021	oui
Printemps - IGA - pk 52 - PM	NO_2	10	0,34	0,059	0,186	0,194	oui
Printemps - IGA - pk 52 - BM		10	0,32	0,002	0,007	0,008	oui

6.2 Résultats de stabilité au cours du temps

6.2.1 Silicate

Les évolutions de la concentration en silicate sont présentées sur les figures 8 à 10.

Pour les **études hivernales dont les prélèvements ont été filtrés sur 0,8 µm et conservés à 4°C**, certains échantillons présentent de plus fortes concentrations en silicate, de manière aléatoire et indépendamment du pas de temps. Pour illustration, lors de l'étude « *Hiver-Comprian PM* », deux des trois flacons analysés à T14 jours présentent une concentration proche de celle obtenue à T0 et une bien plus élevée. Cette variabilité se traduit par de forts écart-types, comme observé sur les graphiques de la figure 8. On notera toutefois que pour les trois études, les médianes des concentrations mesurées au cours du temps ne sont pas statistiquement différentes (test de Kruskal-Wallis) et qu'aucune corrélation entre le temps et les concentrations n'est mise en évidence par le test de Spearman.

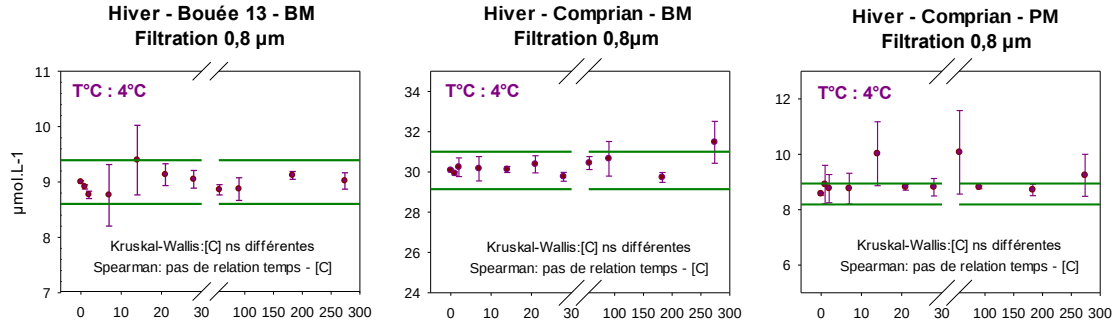


Figure 8 : Evolution des concentrations en silicate des lots d'échantillons hivernaux filtrés sur 0,8 µm et conservés à 4°C (n = 3 flacons à chaque pas de temps, ns : non significativement)

Lors des études printanières, pour chaque prélèvement, deux jeux d'échantillons ont été produits : un jeu d'échantillon filtré sur 0,45 µm et un jeu d'échantillon filtré sur 0,8 µm. Les résultats obtenus dans ces deux séries sont présentés dans les paragraphes suivants.

Pour les **prélèvements printaniers filtrés sur 0,8 µm et conservés à 4°C**, une forte dispersion des concentrations est observée (figure 9). Contrairement à ce qui est observé pour les prélèvements hivernaux, les concentrations en silicate semblent positivement corrélées avec la durée de stockage des échantillons. Le test de Spearman met en effet en évidence une relation positive entre le temps et les concentrations pour les études « *printemps Bouée 13 PM* » et « *printemps Comprian PM* ».

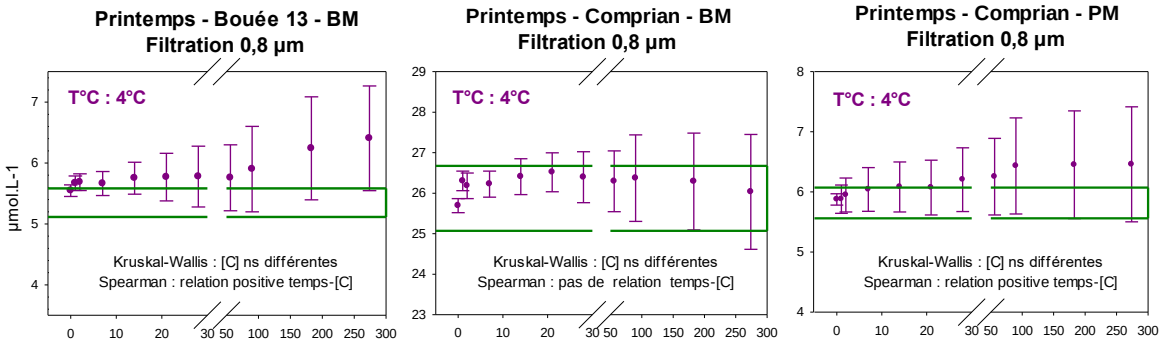


Figure 9 : Evolution des concentrations en silicate des lots d'échantillons printaniers filtrés sur 0,8 µm et conservés à 4°C (n = 3 flacons à chaque pas de temps, ns : non significativement)

Les **études à 4°C sur les prélèvements filtrés sur 0,45 µm** montrent quant à elles une bonne stabilité des concentrations dans le temps (figure 10). Les concentrations obtenues sont dans les limites de stabilité et les écarts types sur les moyennes sont faibles, à l'exception de l'étude « *printemps Bouée 13* ». Pour cette étude, une tendance à la hausse semble se dessiner à partir du T56. Les moyennes des concentrations à T90, T181 et T273 sont en dehors des limites de stabilité et le test de corrélation de Spearman est significatif. On notera néanmoins que les échantillons semblent stables jusqu'à 56 jours (2 mois) comme en témoigne le résultat de l'ANOVA sur les données de T0 à T56. Sur cette période de 56 jours, les moyennes des concentrations sur les différents pas de temps ne sont pas statistiquement différentes.

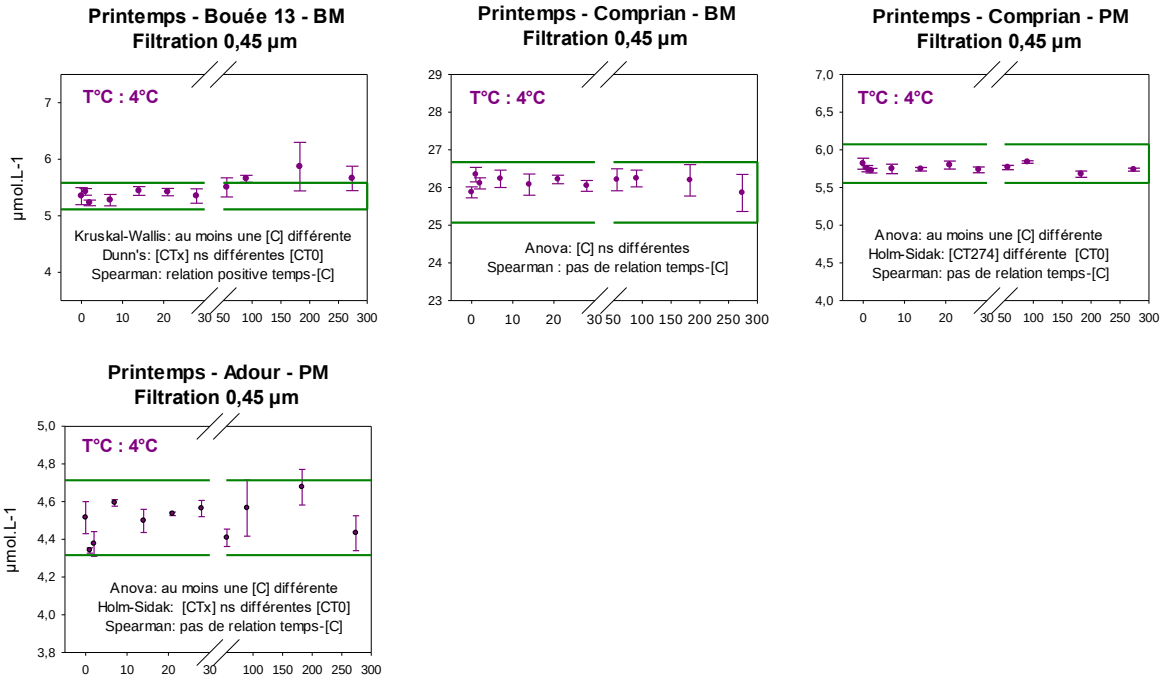


Figure 10 : Evolution des concentrations en silicate *des lots d'échantillons printaniers filtrés sur 0,45 µm et conservés à 4°C (n = 3 flacons à chaque pas de temps, ns : non significativement)*

Au vu de ces résultats, on peut supposer que les variations des concentrations observées sur les études printanières et hivernales après filtration à 0,8 µm sont dues à la redissolution de la silice biogénique présente dans les échantillons. En effet, sur une maille de filtration de 0,8 µm seules les chaines de diatomées sont éliminées, alors que la silice biogénique est totalement éliminée sur les mailles plus petites de 0,45 µm (Daniel, com. pers.).

Les **lots d'échantillons conservés à température ambiante sur la campagne printanière après filtration à 0,45 µm** montrent une plus forte dispersion des concentrations que celles des échantillons conservés à 4°C (figure 11). Dans trois cas sur quatre, le test de Spearman permet de mettre en évidence une relation positive entre les concentrations et le temps. Ce phénomène de dispersion est particulièrement marqué pour les études « Bouée 13 » et « Adour » pour lesquelles plusieurs concentrations sont en dehors des limites de stabilité. Il est ainsi démontré que la conservation des échantillons à température ambiante ne permet pas de garantir l'intégrité de l'échantillon au cours du temps.

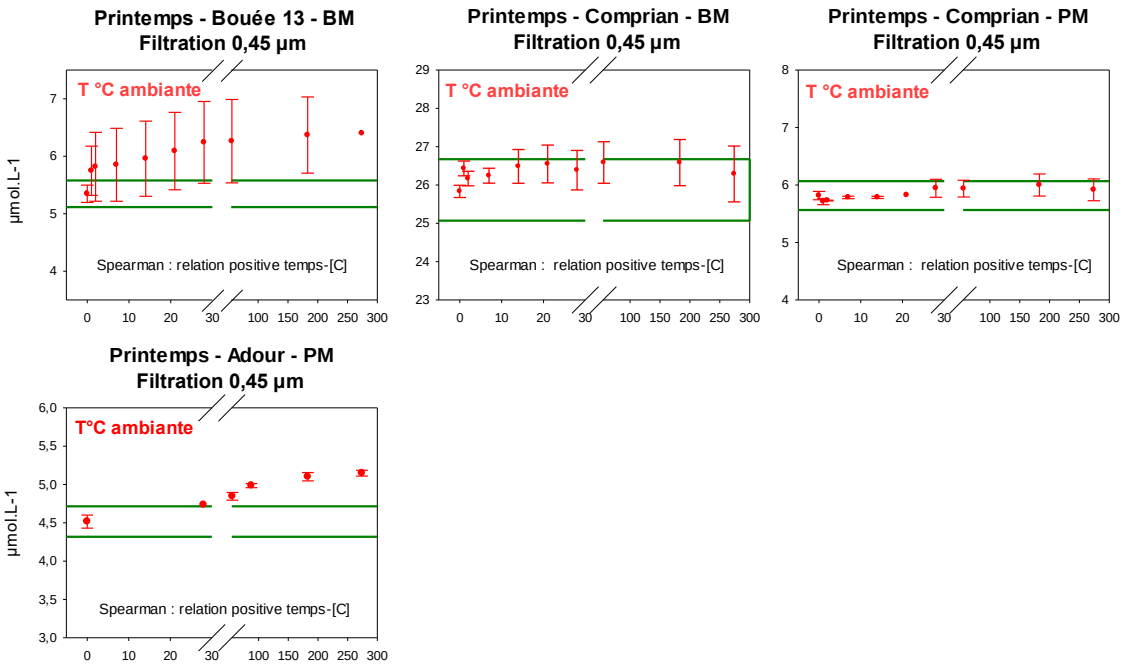


Figure 11 : Evolution des concentrations en silicate des lots d'échantillons printaniers filtrés sur 0,45 µm et conservés à T°C ambiante (n = 3 flacons à chaque pas de temps)

La méthode de conservation des échantillons de silicate à 4±2°C après filtration sur membranes d'acétate de cellulose de porosité 0,45 µm pour une durée de 2 mois est validée.

6.2.2 Ammonium

L'évolution de la concentration en ammonium des lots d'**échantillons hivernaux et printaniers filtrés sur 40 µm et stockés à <- 23°C** est présentée figure 12. Dans ces études, les concentrations mesurées se situent globalement dans les limites de stabilité établie et cela jusqu'à T364 jours. Aucune tendance n'est observée graphiquement et les moyennes ne sont pas statistiquement différentes de celles à T0. Le test de corrélation de Spearman ne montre pas de relation entre les concentrations et les temps de conservation.

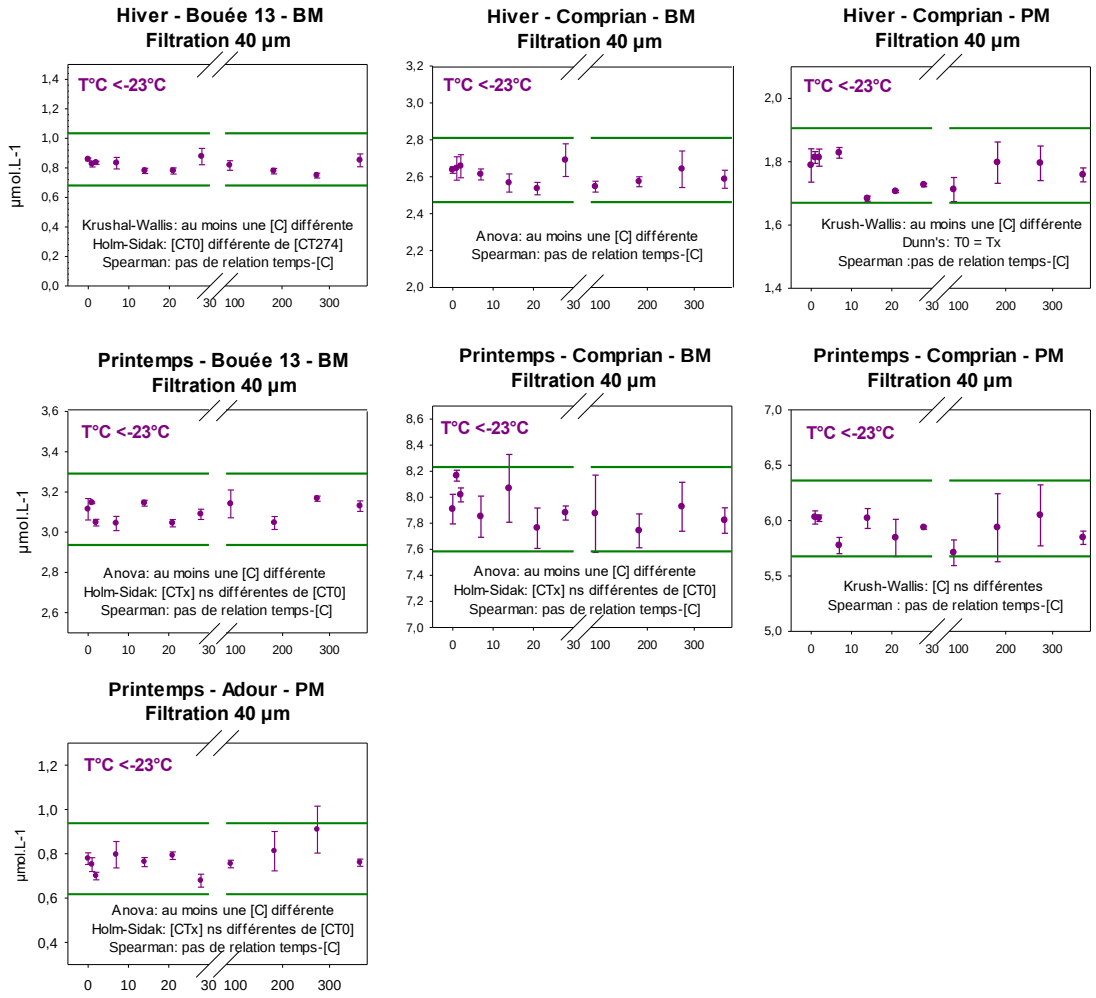


Figure 12 : Evolution des concentrations en ammonium des lots d'échantillons filtrés sur 40 µm et conservés à <-23°C (n = 3 flacons à chaque pas de temps, ns : non significativement)

En ce qui concerne l'effet de congélation/décongélation, les études menées sur les prélèvements ne montrent aucun effet. Il n'y a pas de différence significative entre les T0 analysés avant congélation et les T1 analysés après congélation (Anova, Dunn's et Holm-Sidak).

L'étude complémentaire de l'évolution des teneurs en ammonium des **échantillons filtrés sur 40 µm et conservés à température ambiante** (figure 13) montre une diminution rapide de la concentration en ammonium dans le temps. Après une semaine, les concentrations mesurées sont toutes en dessous des limites de stabilité. La conservation des échantillons à température ambiante ne permet pas de garantir l'intégrité de l'échantillon au cours du temps.

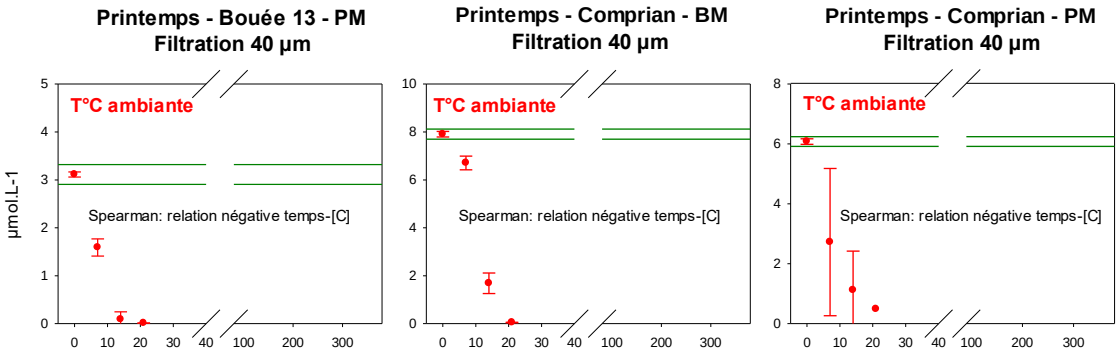


Figure 13 : Evolution des concentrations ammonium des lots d'échantillons filtrés sur 40 µm et conservés à T°C ambiante (n = 3 flacons à chaque pas de temps)

La méthode de conservation des échantillons ammonium à <- 23°C après filtration sur membrane en nylon d'une porosité maximale de 40 µm pour une durée de 6 mois est validée.

6.2.3 Nitrate + Nitrite

L'évolution de la concentration en nitrate+nitrite des lots d'**échantillons printaniers et hivernaux filtrés sur 40 µm et stockés à <- 23°C** est présentée figure 14.

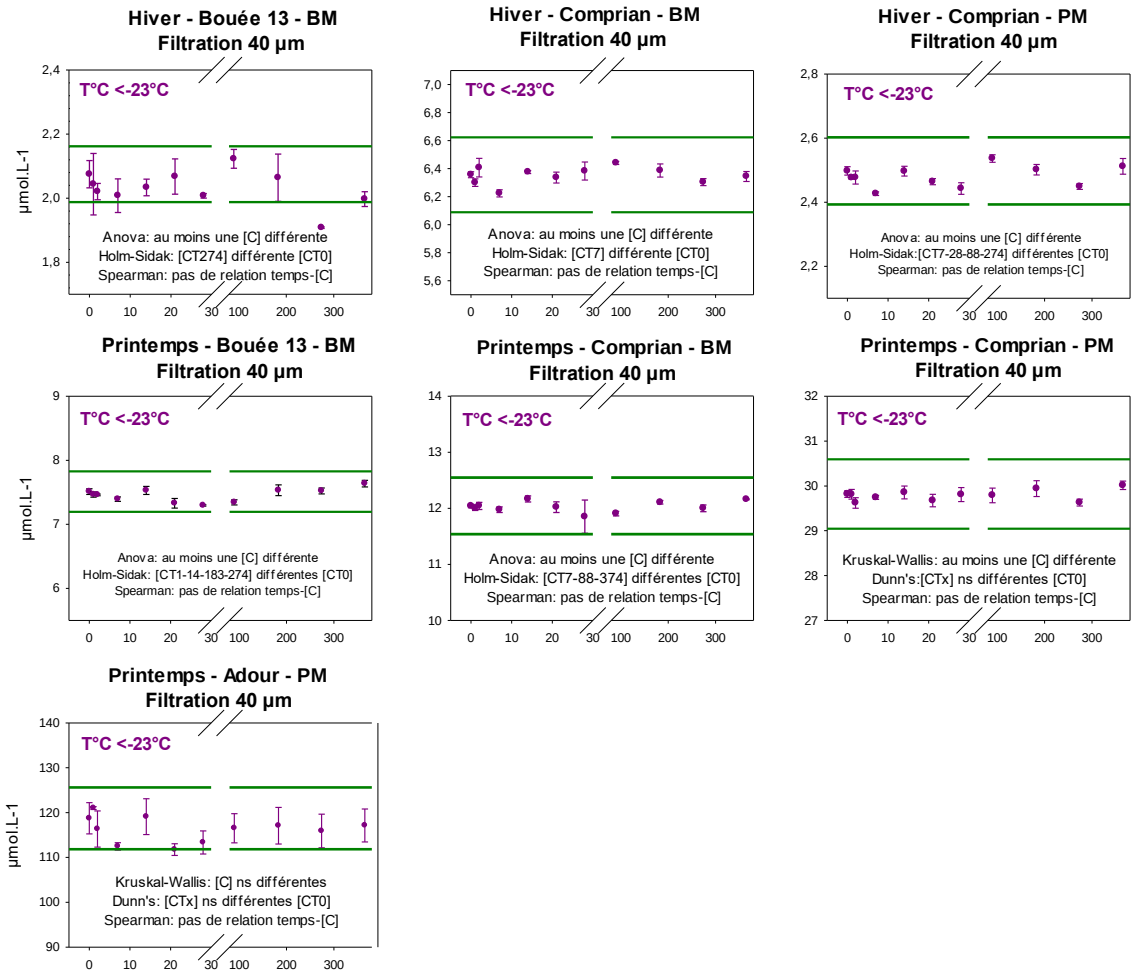


Figure 14 : Evolution des concentrations en nitrate+nitrite des lots d'échantillons prélèvements filtrés sur 40 µm et conservés à < -23°C (n = 3 flacons à chaque pas de temps, ns : non significativement)

Les concentrations mesurées au cours du temps dans ces sept études, à l'exception du point T274 de l'étude « *Hiver Bouée 13* », restent globalement dans les limites de stabilité établie et cela jusqu'à T364 jours. Aucune tendance n'est observée graphiquement et le test de Spearman ne montre pas de relation entre les temps de conservation et les concentrations.

On notera cependant que, dans un certain nombre de cas, les concentrations mesurées au cours du temps sont statistiquement différentes de celles du T0. On peut supposer que ces différences sont dues à un défaut d'homogénéité de remplissage des flacons lors de l'étape d'aliquotage.

En ce qui concerne l'effet de congélation/décongélation, les études menées sur les échantillons ne montrent aucun effet. Il n'y a pas de différence significative entre les T0 analysés avant congélation et les T1 analysés après congélation (Test Anova, Dunn's et Holm-Sidak).

L'étude complémentaire sur les échantillons **filtrés à 40 µm et conservés à température ambiante** montre une diminution rapide de la concentration en **nitrate+nitrite** dans le temps (Figure 15). Les concentrations mesurées sur les échantillons « Bassin d'Arcachon » sont en dessous des limites de

stabilité après 15 jours et moins d'une semaine pour l'étude « Adour ». La conservation des échantillons à température ambiante ne permet donc pas de garantir l'intégrité de l'échantillon, comme l'indiquent les quatre études menées.

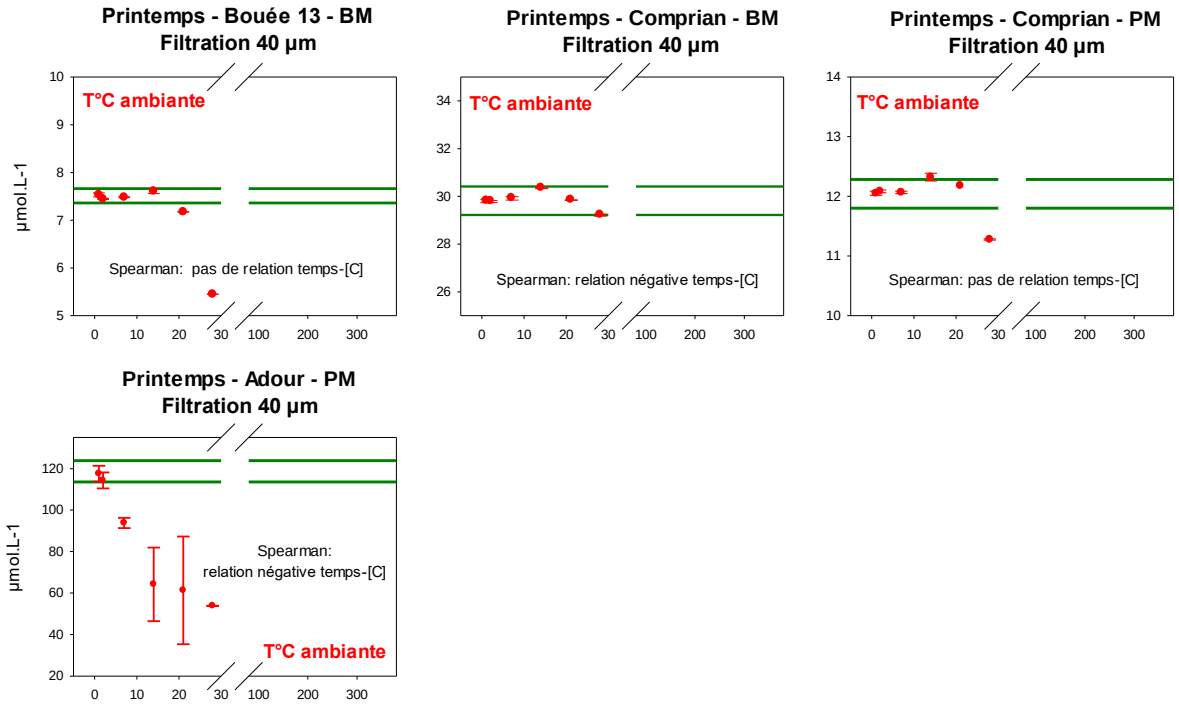


Figure 15 : Evolution des concentrations en nitrate+nitrite des lots d'échantillons filtrés sur 40 µm et conservés à T°C ambiante (n = 3 flacons à chaque pas de temps)

La méthode de conservation des échantillons nitrate+nitrite à <- 23°C après filtration sur membrane en nylon de porosité maximale de 40 µm pour une durée de 6 mois est validée.

6.2.4 Phosphate

L'évolution de la concentration en phosphate du lot d'**échantillons printaniers filtrés sur 40 µm et stockés à <- 23°C** est présentée figure 16.

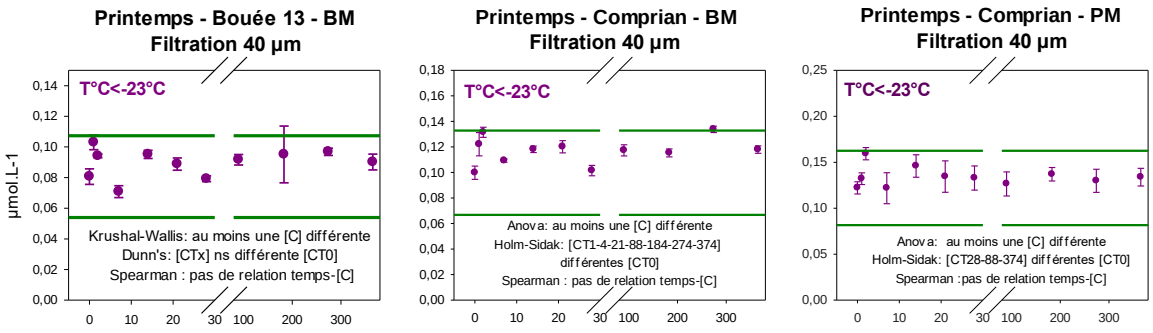


Figure 16 : Evolution des concentrations en phosphate des lots d'échantillons filtrés sur 40 µm et conservés à < -23°C (n = 3 flacons à chaque pas de temps)

A l'instar des résultats obtenus pour le nitrate+nitrite, les concentrations en phosphate mesurées au cours du temps se situent dans les limites de stabilité établies et cela jusqu'à T364 jours. Si les tests statistiques indiquent que les concentrations mesurées au cours du temps ne sont pas toutes équivalentes, les variations des concentrations observées sont vraisemblablement dues à un défaut d'homogénéité de remplissage des flacons lors de l'étape d'aliquotage que d'une évolution des concentrations au cours du temps. En effet, aucune tendance n'est observée graphiquement et le test de Spearman ne montre pas de relation entre le temps de conservation et la teneur en phosphate.

En ce qui concerne l'effet de la congélation/décongélation, seule une des trois études menées, « Printemps Comprian BM » montre une différence significative entre la concentration à T0 (avant congélation) et T1 (après congélation).

L'évolution des concentrations en phosphate des **échantillons printaniers filtrés sur 40 µm et stockés à température ambiante** est présentée figure 17 Dans les trois cas on observe une diminution rapide de la concentration en phosphate dans le temps (figure 17).

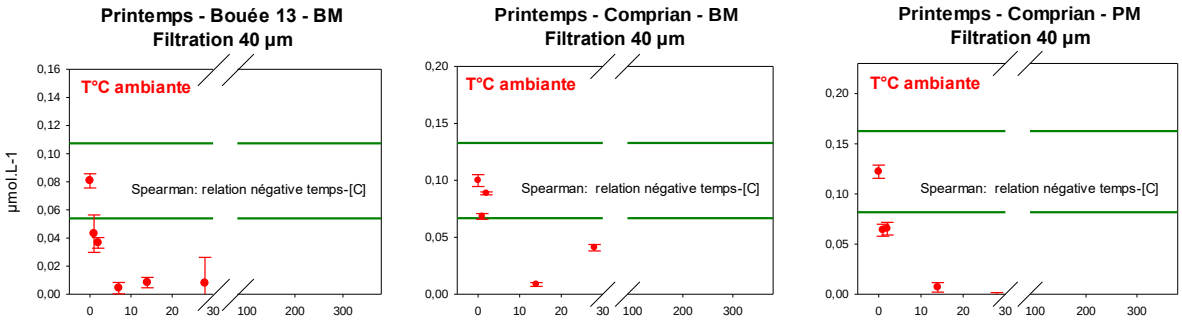


Figure 17 : Evolution des concentrations en phosphate des lots d'échantillons filtrés sur 40 µm et conservés à T°C ambiante (n = 3 flacons à chaque pas de temps)

La méthode de conservation des échantillons de phosphate à <- 23°C après filtration sur membrane en nylon de porosité maximale de 40 µm pour une durée de 6 mois est validée.

6.2.5 Nitrite

L'évolution de la concentration en nitrite dans les lots d'**échantillons printaniers filtrés sur 0,45 µm et stockés à <- 23°C** est présentée figure 18. Pour ce paramètre, aucune étude à température ambiante n'a été menée.

Les concentrations mesurées pour les études à **<- 23°C** sont dans les limites de stabilité établies et cela jusqu'à T184 jours. Aucune tendance n'est observée graphiquement. Le test de Spearman ne révèle pas de relation entre le temps de conservation et les concentrations.

On notera cependant que pour les deux études une différence entre le T0 avant congélation et le T1 après congélation est observée. Cette différence est mise en évidence graphiquement et statistiquement (Test de Dunn's et de Holm-Sidak). On peut dès lors suspecter un effet de la congélation/décongélation pour ces deux études. Cet effet reste cependant négligeable au vu des limites de stabilité et des faibles concentrations mesurées.

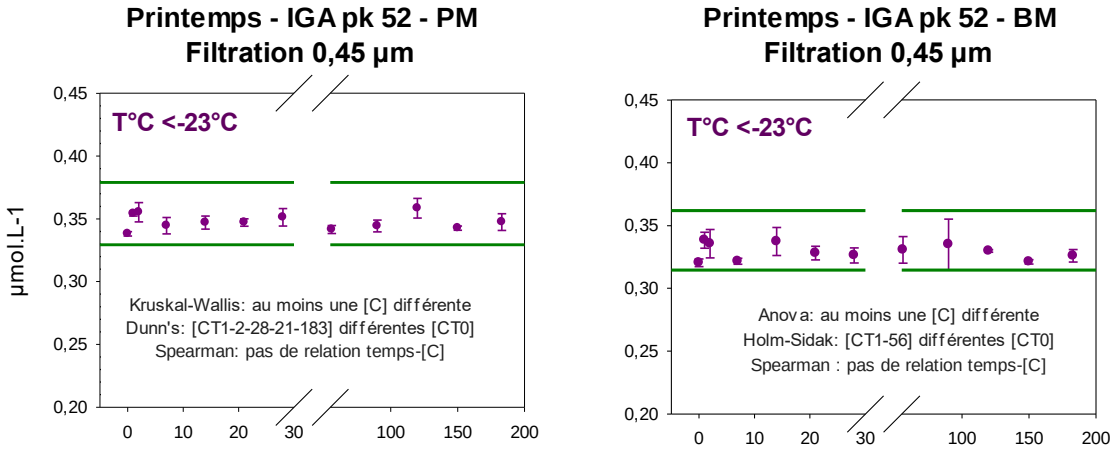


Figure 18 : Evolution des concentrations en nitrite des lots d'échantillons filtrés sur 0,45 µm et conservés à <-23°C (n = 10 flacons à t0 et n = 3 flacons à chaque pas de temps)

La méthode de conservation des échantillons de nitrite à <- 23°C après filtration sur membranes d'acétate de cellulose de porosité 0,45 µm pour une durée de 3 mois est validée.

7 Conclusion

Au vu des résultats présentés dans ce rapport, on peut conclure que :

- Les échantillons **nitrate+nitrite**, **ammonium** et **phosphate** filtrés sur membrane en nylon à une porosité de **40 µm** sont stables au moins **6 mois** lorsqu'ils sont conservés à une température **<- 23°C** ;
- Les échantillons **nitrite** filtrés sur Minisart à une porosité de **0,45 µm** sont stables au moins **3 mois** lorsqu'ils sont conservés à une température **<- 23°C** ;
- Les échantillons silicate filtrés sur Minisart à une porosité **de 0,45 µm** sont stables au moins **2 mois** lorsqu'ils sont conservés à **4±2°C**.

Ces études ont également mis en évidence l'importance, dans le cas du silicate, d'appliquer une filtration suffisamment fine pour s'affranchir de la présence de silice biogénique.

En outre, les résultats des études menées à température ambiante montrent que la filtration ne permet pas d'éliminer totalement les particules et les organismes vivants pouvant avoir une interaction biologique ou physique lors de la conservation.

En conclusion, les conditions de conservation mises en place au laboratoire sont validées et permettent de garantir l'intégrité des échantillons clients avant analyse.

Bibliographie

Aminot A, Kérouel R., Coverly S.C., 2009 Nutrients in seawater using segmented flow analysis. In : Wurl O editors. Practical guidelines for the analysis of seawater. Boca Raton, USA: CRC Press. p.143-78.

Aminot A., Kérouel R., 2004. Hydrologie des écosystèmes marins. Paramètres et analyses. Ed. Ifremer. Ifremer, Méthodes d'analyse en milieu marin, 336 p.

Aminot A., Kérouel R., 2007. Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines : méthodes en flux continu. Ed. Ifremer, Méthodes d'analyse en milieu marin. 188 p.

Augeau G., D'amico F., Meteigner C., Tournaire M-P, Gouriou L., 2019. Rapport d'évaluation intra laboratoire. Evaluation des performances des méthodes de dosage des nitrites dans les eaux salines par flux continu segmenté (SFA) selon la norme NF T90-210 : 2018.

Avanzino R.J., Kennedy V.C., 1993. Long-Term Frozen Storage of Stream Water Samples for Dissolved Orthophosphate, Nitrate Plus Nitrite, and Ammonia Analysis, Water resources research, 29(10), p. 3357-3362.

Chapman P., Mostert S. A., 1990. Does freezing of nutrient samples cause analytical errors? , South African Journal of Marine Science, 9(1), p. 239-247.

Clemenston L., Wayte S., 1992. The effect of frozen storage of open-ocean, seawater samples on the concentration of dissolved phosphate and nitrate. Wat. Res. Vol. 26, No. 9, p. 1171-1176

Daniel A., Kérouel R., Aminot A., 2010. Document de méthode hydrologie. Compléments au manuel de méthode d'analyses en milieu marin « Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines». Rapport DYNECO/PELAGIS/10.05.

Daniel A., Lampert L., 2016. Consignes pour le prélèvement d'échantillons d'eau en vue de mesures hydrologiques Document de méthode hydrologie. Version 2. ODE/DYNECO/PELAGOS/16-03. https://archimer.ifremer.fr/doc/00360/47127/

Daniel A., 2020a. Etat de l'art de la conservation des échantillons de nutriments en eau de mer. Guide technique hydrologie. Octobre 2020. ODE/DYNECO/PELAGOS/.

Daniel A., 2020b. Revue des normes existantes pour la conservation et l'analyse des nutriments en milieu aquatique. Guide technique hydrologie. Octobre 2020.

Dore J.E., Houlihan T., Hebel D.V., Tien G., Tupas L., Karl D.M., 1996. Freezing as a method of sample preservation for the analysis of dissolved inorganic nutrients in seawater. Mar. Chem., 53, p. 173-185.

Fellmana J. B., D'Amore D. V., Hood. E., 2008. An evaluation of freezing as a preservation technique for analyzing dissolved organic C, N and P in surface water samples. Science of the total environment, 392, p.305-312.

Gardolinski P. C. F. C, Hanrahan G., Achterberg E. P., Gledhill M., Tappin A. D., House W. A., Worsfold P. J., 2001. Comparaison of sample storage protocols for the determination of nutrients in naturel waters. Wat. Res. Vol. 35 (15), p. 3670–3678.

Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling F., 1983. Methods of Seawater Analysis. 2nd edn. Verlag Chemie, Weinheim, 410 pp.

Grasshoff K., Kremling K., Ehrhardt M., 1999. Methods of Seawater Analysis, Third Edition: 27 January 1999 WILEY-VCH Verlag GmbH

Guide technique d'accréditation : Analyses physico-chimiques des eaux – Document LAB GTA 05 version 02. Novembre 2018.

Horowitz A. J., Lum K., Lemieux C., Quemerais B., Garbarino J. R. G., Hall E. M., Bonham-Carter G. F., 1996. The effect of using different 0.45 pm filter membranes on 'dissolved' element concentrations in natural waters. Applied Geochemistry, 11, p. 243-249.

Kirkwood D.S., 1992. Stability of solutions of nutrient salts during storage. Marine Chemistry, 38, p. 151-164.

MacDonald R. W., McLaughlin, 1982. The effect of the storage by freezing on dissolved inorganic phosphate, nitrate and reactive silicate for samples from coastal and estuarine waters. Wat. Res., Vol. 16, No. 1, p 95-104.

Norme AFNOR NF EN ISO 5667-3 : 2018, Qualité de l'eau - Échantillonnage - Partie 3 : Conservation et manipulation des échantillons d'eau. Edition juin 2018.

Norme AFNOR NF EN ISO 5725-6 : 1994, Application de la statistique – Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure. Partie 6 : Utilisation dans le pratique des valeurs d'exactitude. Edition 1994.

Riley J.P, 1975. Analytical chemistry of seawater In Chemical Oceanography, 2nd Ed. 3. Riley,J. P. and G. Skirrow (Eds). London; AcademicPress : 193-514.

Strickland J.D.H. and Parsons T.R., 1972. A practical handbook of sea water analysis, 2ndEd.Bull. Fish. Res. Bd. Can. p. 167-310.

Annexe 1 : Analyses statistiques des jeux de données Silicate

Annexe 1.1 : Silicate, filtrés sur 0,45 µm et conservés à 4°C

Etudes	Tests paramétriques				Tests non paramétriques :		Corrélation de Spearman
	normalité (Shapiro-Wilk α=0,05)	Egalité des variances	Anova α=0,05	Holm-Sidak ≠ (T0# control groupe) α=0,05	Kruskal-Wallis α=0,05	Dunn's (T0# control groupe) α=0,05	
Printemps - Bouée 13 Filtration 0,45µm, 4°C	échoue p-value <0,050	/	/	/	p-value : 0,038 significatif au moins une médiane différente	Les médianes ne sont pas significativement différente de la médiane à T0	Coefficient corrélation : 0,606 p-value = 0,000249 significatif
Printemps - Bouée 13 *(T0 à T56)* Filtration 0,45µm, 4°C	passe p-value = 0,518	passe p-value = 0,455	p-value = 0,110 non significatif les moyennes sont équivalentes	/	/	/	Coefficient corrélation : 0,155 p-value = 0,466 non significatif
Printemps - Comprian – BM Filtration 0,45µm, 4°C	passe p-value = 0,082	passe p-value = 0,916	p-value = 0,586 non significatif les moyennes sont équivalentes	/	/	/	Coefficient corrélation : -0,0445 p-value = 0,808 non significatif
Printemps - Comprian – PM Filtration 0,45µm	passe p-value = 0,814	passe p-value = 0,710	p-value = 0,009 significatif au moins une moyenne différente	la moyenne à **T274** est significativement différente de celle à T0	/	/	Coefficient corrélation : -0,256 p-value = 0,166 non significatif
Printemps – Adour Filtration 0,45µm, 4°C	passe p-value = 0,605	passe p-value = 0,104	p-value <0,001 significatif au moins une moyenne différente	les moyennes ne sont pas significativement différentes de celle à T0	/	/	Coefficient corrélation : 0,288 p-value = 0,109 non significatif

Annexe 1.2 : Silicate, filtrés sur 0,80 µm et conservés à 4°C

Etudes	Tests paramétriques				Tests non paramétriques :		Corrélation de Spearman
	normalité (Shapiro-Wilk α=0,05)	Egalité des variances	Anova α=0,05	Holm-Sidak ≠ (T0# control groupe) α=0,05	Kruskal-Wallis α=0,05	Dunn's (T0# control groupe) α=0,05	
Hiver - Bouée 13 Filtration 0,8 µm, 4°C	échoue p-value <0,050	/	/	/	p-value = 0,119, non significatif les médianes sont statistiquement équivalentes	/	Coefficient corrélation : 0,221 p-value = 0,214 non significatif
Hiver - Comprian – BM Filtration 0,8 µm, 4°C	échoue p-value <0,050	/	/	/	p-value = 0,080, non significatif les médianes sont statistiquement équivalentes	/	Coefficient corrélation : 0,268 p-value = 0,131 non significatif
Hiver - Comprian – PM Filtration 0,8 µm, 4°C	non p-value <0,050	/	/	/	p-value = 0,454, non significatif sont statistiquement équivalentes	/	Coefficient corrélation : 0,228 p-value = 0,199 non significatif
Printemps - Bouée 13 Filtration 0,80µm, 4°C	échoue p-value <0,050	/	/	/	p-value = 0,341, non significatif sont statistiquement équivalentes	/	Coefficient corrélation : 0,3013 p-value = 0,0201 significatif
Printemps - Comprian – BM Filtration 0,80µm, 4°C	échoue p-value <0,050	/	/	/	p-value = 0,489, non significatif sont statistiquement équivalentes	/	Coefficient corrélation : 0,08 p-value = 0,530 non significatif
Printemps - Comprian – PM Filtration 0,80 µm, 4°C	échoue p-value <0,050	/	/	/	p-value = 0,266, non significatif sont statistiquement équivalentes	/	Coefficient corrélation : 0,441 p-value = 0,000809 significatif

Annexe 1.3 : Silicate, filtrés sur 0,45 µm et conservés à température ambiante

Etudes	Tests paramétriques				Tests non paramétriques :		Corrélation de Spearman
	normalité (Shapiro-Wilk α=0,05)	Egalité des variances	Anova α=0,05	Holm-Sidak ≠≠ (T0# control groupe) α=0,05	Kruskal-Wallis α=0,05	Dunn's (T0# control groupe) α=0,05	
Printemps - Bouée 13 Filtration 0,45µm, T°C ambiante	échoue p-value <0,050	/	/	/	NA	NA	Coefficient corrélation : 0,632 p-value = 0,00210 significatif
Printemps - Comprian – BM Filtration 0,45 µm T°C ambiante	passe p-value = 0,213	échoue p-value <0,05	/	/	NA	NA	Coefficient corrélation : 0,322 p-value = 0,152 non significatif
Printemps - Comprian – PM Filtration 0,45 µm, T°C ambiante	passe p-value = 0,355	échoue p-value <0,05	NA	NA	NA	NA	Coefficient corrélation : 0,536 p-value = 0,0123 significatif
Printemps – Adour Filtration 0,45µm, T°C ambiante	passe p-value = 0,939	échoue p-value <0,05	NA	NA	NA	NA	Coefficient corrélation : 0,982 p-value <0,05 significatif

NA : non applicable pas assez de données

Annexe 2 : Analyses statistiques des jeux de données des échantillons Ammonium

Annexe 2.1 : Ammonium, filtrés sur 40 µm et conservés à une température <-23°C

Etudes	Tests paramétriques				Tests non paramétrique :		Corrélation de Spearman α=0,05
	normalité Shapiro-Wilk, α=0,05)	Egalité des variances	Analyse des variances Anova, α=0,05	Holm-Sidak ≠ (T0# control groupe) α=0,05	Kruskal-Wallis α=0,05	Dunn's (T0# control groupe) α=0,05	
Hiver - Bouée 13 Filtration 40 µm, T°C :< -23°C	passe p-value = 0,578	passe p-value = 0,241	p-value = 0,007 significatif au moins une moyenne différente	La moyenne à **T274** est significativement différente de celle à T0	/	/	Coefficient corrélation : -0,281 p-value = 0,136 non significatif
Hiver - Comprian – BM Filtration 40 µm, T°C :< -23°C	passe p-value = 0,391	Passe p-value = 0,327	p-value = 0,084 non significatif les moyennes sont statistiquement équivalentes	/	/	/	Coefficient corrélation : -0,291 p-value = 0,0999 non significatif
Hiver - Comprian – PM Filtration 40 µm, T°C :< -23°C	échoue p-value <0,050	/	/	/	p-value : 0,008, significatif au moins une médiane est statistiquement différente	Les médianes ne sont pas différentes de celles à T0	Coefficient corrélation : -0,232 p-value = 0,193 non significatif
Printemps - Bouée 13 Filtration 40 µm, T°C :< -23°C	passe p-value = 0,832	Passe p-value = 0,611	p-value = 0,007 significatif au moins une moyenne différente	Les moyennes ne sont pas significativement différentes de celle à T0	/	/	Coefficient corrélation : 0,180 p-value = 0,329 non significatif
Printemps - Comprian – BM Filtration 40 µm, T°C :< -23°C	passe p-value = 0,625	Passe p-value = 0,494	p-value = 0,290 non significatif moyennes par point équivalentes	/	/	/	Coefficient corrélation : -0,349 p-value = 0,0502 non significatif
Printemps - Comprian – PM Filtration 40 µm, T°C :< -23°C	échoue p-value <0,050	/	/	/	p-value = 0,109 non significatif les médianes sont statistiquement équivalentes	/	Coefficient corrélation : 0,0698 p-value = 0,712 non significatif
Printemps – Adour Filtration 40 µm, T°C :< -23°C	passe p-value = 0,161	passe p-value =0,292	p-value = 0,021 significatif au moins une moyenne différente	Les moyennes ne sont pas significativement différentes de celle à T0	/	/	Coefficient corrélation : 0,148 p-value = 0,442 non significatif

Annexe 2.2 : Ammonium, filtrés sur 40 µm et conservés à température ambiante

Etudes	Tests paramétriques				Tests non paramétrique :		Corrélation de Spearman α=0,05
	normalité Shapiro-Wilk, α=0,05)	**Egalité des variances**	**Analyse des variances** Anova, α=0,05	**Holm-Sidak ≠ (T0# control groupe)** α=0,05	**Krushal-Wallis** α=0,05	**Dunn's (T0# control groupe)** α=0,05	
Printemps - Bouée 13 Filtration 40 µm, T°C ambiante	passe p-value = 0,914	passe p-value = 0,070	p-value = 0,007 significatif au moins une moyenne différente	Toutes les moyennes sont différentes de celle à T0	/	/	Coefficient corrélation : -0,927 p-value <0,05 significatif
Printemps - Comprian – BM Filtration 40 µm, T°C ambiante	passe p-value = 0,976	échoue p-value <0,05	/	/	NA	NA	Coefficient corrélation : -0,970 p-value <0,05 significatif
Printemps - Comprian – PM Filtration 40 µm, T°C ambiante	passe p-value = 0,134	échoue p-value <0,05	/	/	NA	NA	Coefficient corrélation : -0,877 p-value <0,05 significatif

NA : non applicable, on ne dispose pas de assez de données pour travailler en médianes

Annexe 3 : Analyses statistiques des jeux de données des échantillons Nitrate+Nitrite

Annexe 3.1 : Nitrate + Nitrite, filtrés sur 40 µm et conservés à une température <-23°C

Etudes	Tests paramétriques				Tests non paramétrique :		Corrélation de Spearman α=0,05
	normalité Shapiro-Wilk, α=0,05)	**Egalité des variances**	**Analyse des variances** Anova, α=0,05	**Holm-Sidak ≠ (T0# control groupe)** α=0,05	**Kruskal-Wallis** α=0,05	**Dunn's (T0# control groupe)** α=0,05	
Hiver - Bouée 13 Filtration 40 µm, T°C :< -23°C	passe p-value = 0,695	passe p-value = 0,829	p-value = 0,008 significatif au moins une moyenne différente	La moyenne à **T274** est statistiquement différente de celle à T0	/	/	Coefficient corrélation : -0,211 p-value = 0,251 non significatif
Hiver - Comprian – BM Filtration 40 µm, T°C :< -23°C	passe p-value = 0,256	passe p-value = 0,820	p-value < 0,001 significatif au moins une moyenne différente	La moyenne à **T7** est statistiquement différente de celle à T0	/	/	Coefficient corrélation : 0,45 p-value = 0,442 non significatif
Hiver - Comprian – PM Filtration 40 µm, T°C :< -23°C	passe p-value = 0,829	passe p-value = 0,108	p-value < 0,001 significatif au moins une moyenne différente	Les moyennes à **T7**, **T28**, **T88** et **T274** sont statistiquement différente de celle à T0			Coefficient corrélation : -0,211 p-value = 0,251 non significatif
Printemps - Bouée 13 Filtration 40 µm, T°C :< -23°C	passe p-value = 0,305	passe p-value = 0,905	p-value < 0,001 significatif au moins une moyenne différente	Les moyennes à **T1**, **T14**, **T274** et **T183** sont statistiquement différente de celle à T0	≠	≠	Coefficient corrélation : 0,244 p-value = 0,184 non significatif
Printemps - Comprian – BM Filtration 40 µm, T°C :< -23°C	échoue p-value <0,050	/	/	/	p-value = 0,048, significatif au moins une médiane est statistiquement différente	Les médianes ne sont pas statistiquement différentes de celles à T0	Coefficient corrélation : 0,157 p-value = 0,380 non significatif
Printemps - Comprian – PM Filtration 40 µm, T°C :< -23°C	passe p-value = 0,091	passe p-value = 0,506	p-value < 0,001 significatif au moins une moyenne différente	Les moyennes à **T7**, **T88**, **T374** sont statistiquement différente de celle à T0	/	/	Coefficient corrélation : 0,145 p-value = 0,435 non significatif
Printemps – Adour Filtration 40 µm, T°C :< -23°C	échoue p-value <0,050	/	/	/	p-value = 0,109 non significatif médianes équivalentes	/	Coefficient corrélation : 0,289 p-value = 0,108 non significatif

Annexe 3.2 : Nitrate + Nitrite, filtrés sur 40 µm et conservés à température ambiante

Etudes	Tests paramétriques				Tests non paramétrique :		Corrélation de Spearman α=0,05
	normalité Shapiro-Wilk, α=0,05)	Egalité des variances	Analyse des variances Anova, α=0,05	Holm-Sidak ≠ (T0# control groupe) α=0,05	Kruskal-Wallis α=0,05	Dunn's (T0# control groupe) α=0,05	
Printemps - Bouée 13 Filtration 40 µm, T°C ambiante	p-value <0,050	/	/	/	NA	NA	Coefficient corrélation : -0,124 p-value = 0,648 pas significatif
Printemps - Comprian – BM Filtration 40 µm, T°C ambiante	p-value <0,050	/	/	/	NA	NA	Coefficient corrélation : 0,638 p-value = 0,00988 significatif
Printemps - Comprian – PM Filtration 40 µm, T°C ambiante	p-value <0,050	/	/	/	NA	NA	Coefficient corrélation : -0,0414 p-value = 0,873 pas significatif
Printemps – Adour Filtration 40 µm, T°C ambiante	p-value <0,050	/	/	/	NA	NA	Coefficient corrélation : -0,708 p-value = 0,00388 significatif

NA : non applicable, on ne dispose pas de assez de données pour travailler en médianes

Annexe 4: Analyses statistiques des jeux de données des échantillons Phosphate

Annexe 4.1 : Phosphate, filtrés sur 40 µm et conservés à une température <-23°C

Etudes	Tests paramétriques				Tests non paramétrique :		Corrélation de Spearman α=0,05
	normalité Shapiro-Wilk, α=0,05)	**Egalité des variances**	**Analyse des variances** Anova, α=0,05	**Holm-Sidak ≠ (T0# control groupe)** α=0,05	**Kruskal-Wallis** α=0,05	**Dunn's (T0# control groupe)** α=0,05	
Printemps - Bouée 13 Filtration 40 µm, T°C :< -23°C	échoue p-value < 0,05	/	/	/	p-value : 0,008, significatif au moins une médiane est statistiquement différente	Les médianes ne sont pas différentes de celles à T0	Coefficient corrélation : 0,171 p-value = 0,354 non significatif
Printemps - Comprian – BM Filtration 40 µm, T°C :< -23°C	passe p-value = 0,181	passe p-value = 0,602	p-value <0,001, significatif au moins une moyenne significativement différente	Les moyennes sont significativement différentes de celle à T0, à l'exception de celle à T28	/	/	Coefficient corrélation : 0,190 p-value = 0,302 non significatif
Printemps - Comprian – PM Filtration 40 µm, T°C :< -23°C	passe p-value = 0,201	passe p-value = 0,902	p-value = 0,061 non significatif les moyennes statistiquement sont équivalentes	/	/	/	Coefficient corrélation : 0,0377 p-value = 0,836 non significatif
Printemps – Adour Filtration 40 µm, T°C :< -23°C	passe p-value = 0,586	passe p-value = 0,610	p-value <0,001, au significatif au moins une moyenne différente	Les moyennes à **T28, T88**, **T374** sont statistiquement différentes de celle à T0	/	/	Coefficient corrélation : 0,218 p-value = 0,220 non significatif

Annexe 4-2 : Phosphate, filtrés sur 40 µm et conservés à température ambiante

Etudes	Tests paramétriques				Tests non paramétrique :		Corrélation de Spearman α=0,05
	normalité Shapiro-Wilk, α=0,05)	Egalité des variances	Analyse des variances Anova, α=0,05	Holm-Sidak ≠ (T0# control groupe) α=0,05	Kruskal-Wallis α=0,05	Dunn's (T0# control groupe) α=0,05	
Printemps - Bouée 13 Filtration 40 µm, T°C ambiante	p-value <0,050	/	/	/	NA	NA	Coefficient corrélation : - 0,652 p-value = 0,00785 significatif
Printemps - Comprian – BM Filtration 40 µm, T°C ambiante	p-value <0,050	/	/	/	NA	NA	Coefficient corrélation : -0,398 p-value = 0,134 non significatif
Printemps - Comprian – PM Filtration 40 µm, T°C ambiante	p-value <0,050	/	/	/	NA	NA	Coefficient corrélation : -0,772 p-value = 0,000231 significatif
Printemps – Adour Filtration 40 µm, T°C ambiante	p-value <0,050	/	/	/	NA	NA	Coefficient corrélation : -0,747 p-value = 0,000903 significatif

NA : non applicable, on ne dispose pas de assez de données pour travailler en médianes

Annexe 5 : Analyses statistiques des jeux de données des échantillons Nitrite

Annexe 5.1 : Nitrite, filtrés sur 0,45 µm et conservés à une température <-23°C

Etudes	Tests paramétriques				Tests non paramétrique :		Corrélation de Spearman α=0,05
	normalité Shapiro-Wilk, α=0,05)	**Egalité des variances**	**Analyse des variances** Anova, α=0,05	**Holm-Sidak ≠≠ (T0# control groupe)** α=0,05	**Kruskal-Wallis** α=0,05	**Dunn's (T0# control groupe)** α=0,05	
Printemps - IGA - PM	passe p-value = 0,190	échoue p-value < 0,05	/	/	p-value = 0,002 significatif au moins une médiane différente	les médianes à:T1, T2, T28, T21 et T183 sont statistiquement différentes de celles à T0	Coefficient corrélation : 0,383 p-value = 0,0136 significatif
Printemps - IGA – PM (sans le T0))	passe p-value = 0,263	passe p-value = 0,097	p-value = 0,071 non significatif les moyennes statistiquement sont équivalentes	/			Coefficient corrélation : -0,336 p-value = 0,0649 non significatif
Printemps - IGA BM	passe p-value = 0 ,252	passe p-value = 0,302	p-value = 0,002 significatif au moins une moyenne différente	Les moyennes à **T1 & T56**, sont statistiquement différentes de celles à T0	/	/	Coefficient corrélation : 0,225 p-value = 0,161 non significatif
Printemps - IGA BM (sans le T0)	passe p-value = 0,288	passe p-value = 0,677	p-value = 0,071 non significatif les moyennes statistiquement sont équivalentes	/	/	/	Coefficient corrélation : 0,346 p-value = 0,0608 non significatif