

00001020

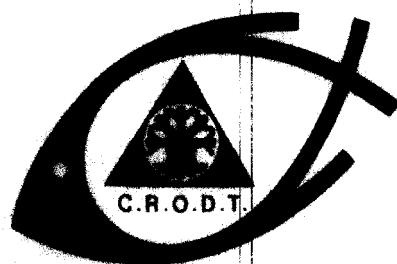
**ETUDE COMPARATIVE RE
TROIS METHODES DE CONSERVATION
DES ECHANTILLONS D'EAU EN VUE DE
L'ANALYSE DES SELS NUTRITIFS**

ISSN 0850-1602

DEME-GNINGUE

C. NDOUR

J. FERRARIS



CENTRE DE RECHERCHES **Océanographiques** DE DAKAR - TIAROYE

★ INSTITUT **SÉNÉGALAIS** DE RECHERCHES AGRICOLES ★

DOCUMENT
SCIENTIFIQUE

NUMÉRO 1 3 6

JUILLET 92

ETUDE COMPARATIVE DE TROIS METHODES DE CONSERVATION DES ECHANTILLONS D'EAU EN VUE DE L'ANALYSE DES SELS NUTRITIFS

par

1. DEME-GNINGUE ,C. NDOUR et J. FERRARIS

R E S U M E

Trois méthodes de conservation des échantillons d'eau en vue de l'analyse des sels nutritifs ont été testées et comparées pendant onze semaines (la congélation, le chloroforme au froid et à l'obscurité et le chlorure mercurique au froid et à l'obscurité).

L'analyse statistique des résultats et les graphiques de concentration en fonction du temps ont montré que le chloroforme et la congélation ne sont pas significativement différents sur les trois sels testés et sont nettement plus efficaces que le chlorure mercurique dans les conditions de l'essai.

S U M M A R Y

Three conservation methods of water-sample for nutrient analysis have been tested and compared during eleven weeks: freezing, chloroform and mercuric chlorid. The two last methods were combined with dark at 4°C.

The test was done on three nutrients: nitrate, nitrite and phosphate.

Statistic results and concentration by time grahs show that freezing and chloroform are not significativly different for conservation of the three nutrients tested and are best than mercuric chloridi n the conditions of the experimentation.

Key words: met hod, conservat ion , comparison, nutrient.

I N T R O D U C T I O N

Après prélèvement d'un échanti l on d'eau, celui-ci reste biologiquement et chimiquement actif . Mal gré l es performances de plus en plus grandes des appareils de dosage (apparei3s automat iques divers, rapides et précis), l es conditions de prélèvement ne permettent pas toujours un dosage simultané des échantillons qui, de ce fait, doivent attendre un certain temps avant l 'analyse. La concentration des éléments mineurs des eaux naturelles comme les sels nutritifs peut être ainsi modifiée par divers facteurs notamment l'intervention des bactéries, du phytoplancton et ou du zooplancton par leur respiration, digest ion et excrétion. Pour remédier à cet inconvénient , les scientifiques ont développe, au cours des années, différentes mét hodes de conservation pour préserver au maximum les proprietés initiales des échantillons d'eau (Rodier, 1975; Strickland et Parsons, 1972; Grasso ff *et al.*, 1983). Bon nombre de ces methodes sont physiques, notamment l'application du froid à différents degrés (la congélation étant actuel lement la rnéthode de référence). D'autres, par l'emploi de produits chimiques, visent à minimiser les effets du phytoplancton et de tout autre organisme vivant présent dans l 'échantillon. Chacune de ces methodes est utilisée dans plusieurs laboratoires, mais l'unanimité n'est pas faite sur la meilleure technique à adopter pour une bonne conservation des sels nutritifs et il semble qu'aucune méthode ne soit satisfaisante pour tous les sels. A partir des connaissances acquises, nous avons donc envi sage de fai re une étude comparative des trois mét hodss de conservat ion qui sont actuel lement les plus courant es la congélation qui constitue la méthode de référence (Macdonald et Laughlin, 1982), le chloroforme et le chlorure mercurique en solution.

La comparai son est effectuée sur trois sels nutritifs au cours de onze semaines; ces sels ont Bté choisis parmi les plus instables et les plus dosés dans les études de production primaire: le nitrate, le nitrite et l e phosphate (Riley e t Skirrow, 1967).

1. MATERIEL ET METHODE

L'eau utilisée pour cette expérimentation n'a pas été filtrée et a été recueillie à la station côtière de Yoff (Dakar-Sénégal). Un grand seau a été prélevé et a permis de remplir 216 flacons en verre de 50ml.

Les trois traitements testés ont été utilisés dans les conditions suivantes:

- Le chloroforme a été introduit dans l'eau à raison d'un millilitre par litre (1ml/l) (Kremlin et Wenck, 1986) et les échantillons ainsi traités sont conservés au froid (4°C) et à l'obscurité (traitement 1).

- Le chlorure mercurique a été utilisé en solution de 40mg/l (Rodier, 1975) et à raison de 1ml par flacon de 50ml d'eau, lequel sera gardé au froid (4°C) et à l'obscurité (traitement 2).

- La congélation a été faite au congélateur domestique (-20°C) (traitement 3).

Les doses de produits chimiques utilisées dans les traitements 1 et 2 sont des standards préconisés par les auteurs cités pour la conservation des échantillons de sels nutritifs.

Les dosages ont été effectués par colorimétrie au spectrophotomètre Bausch-Lomb 2000. Les nitrates réduits par un passage dans une colonne de cadmium ont été dosés avec les nitrites à 543nm après formation d'un complexe diazoté rose. Les phosphates forment en milieu acide un complexe phosphomolybdique bleu, dosé à 827nm selon les méthodes de Strickland et Parsons (1972).

Les flacons ont été repartis aléatoirement entre les trois traitements et les trois sels à tester.

La taille optimale de l'échantillon par condition expérimentale (nombre de prélèvements) a été calculée sur la base de la variance des dosages du phosphate sur des échantillons prélevés en 1989 à la station côtière de Thiaroye et conservés au chlorure mercurique pendant un mois (technique traditionnellement utilisée dans notre laboratoire). Le choix des dosages de phosphates réside dans le fait que ceux-ci présentent le plus de fluctuations parmi tous les résultats disponibles.

En utilisant le principe de base du calcul de l'effectif d'un échantillon pour la comparaison de deux moyennes

$$n = t^2_{\alpha/2} s^2 / d\%^2$$

avec

n: le nombre d'échantillons à prélever

$t_{\alpha/2}$: qui se lit dans une table en fonction de α

s^2 : la variance approximative de la population (donnée théorique ou obtenue à partir de mesures antérieures)

6%: le degré de précision que l'on veut

Ainsi, nous aboutissons à une taille optimale de trois prélèvements.

Dès le prélèvement, trois flacons ont été dosés pour chaque sel nutritif (TO).

Trois flacons sont ensuite analysés par traitement la première, la deuxième et la quatrième semaine pour chacun des trois sels. Au delà, les échantillons sont pris et dosés à huit et à onze semaines.

L'analyse a été planifiée selon un plan d'expérience équilibré à deux facteurs : le moyen de conservation (trois niveaux) et le temps (cinq niveaux). L'analyse statistique des données sera effectuée à l'aide d'un modèle d'analyse de variance permettant de tester l'effet des deux facteurs sur les variables dépendantes mesurées (nitrate, phosphate et nitrite) et de tester globalement l'effet du traitement et du temps et de comparer l'évolution de chaque traitement au cours du temps lequel avec un effectif de trois unités par condition expérimentale, permet de comparer les différents niveaux d'un même facteur. Le temps T0 est exclu de la comparaison (une seule mesure) mais les moyennes seront comparées à la valeur initiale.

Les deux logiciels utilisés pour les tests statistiques sont : Statgraphics et Statitcf.

2 . R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

L'analyse statistique des résultats de cette expérience montre que quelque soit le sel nutritif considéré, la variance et le coefficient de variation sont plus élevés avec la conservation par le chlorure mercurique (traitement 2) (tab 1). Ces résultats s'accordent avec ceux de Kremling et Wenck (1985) qui ont observé une évolution similaire dans les mêmes conditions de température et avec une plus faible concentration en chlorure mercurique (10mg/l); ainsi, il semble que l'augmentation de la concentration en chlorure mercurique (40mg/l dans notre expérience) n'ait pas amélioré l'effet de conservation.

En comparant les moyennes, on constate que celles correspondant au traitement par le chlorure mercurique sont toujours très inférieures à celles des deux autres traitements. Elles font moins de 70 % de celles obtenues avec les deux autres traitements pour les nitrites et les phosphates (tab.7) et 90% pour les nitrates. Cette observation indique que le chlorure mercurique conviendrait plus à la conservation des nitrates qu'à celles des autres sels testés. Ce résultat est en accord avec ceux de Jenkins (1968) et Charpiot (1969) qui semblent valider l'utilisation des sels mercuriques pour la conservation des échantillons de nitrates. L'interférence des sels mercuriques dans le dosage des nitrates n'est pas observée comme l'avait fait Grasshoff (1976) car aucun signe distinctif n'apparaît dans l'allure des courbes de nitrates avec le traitement au sel mercurique par rapport aux deux autres.

Cependant, si nous regardons les courbes d'évolution des nitrates en fonction du temps (fig. 1a), on constate que le traitement au chlorure mercurique présente une pente négative assez accusée qui traduit une moins bonne conservation.

L'analyse factorielle de variance à deux critères de classification qui permet de comparer l'évolution de chacun des sels testés par rapport aux deux facteurs temps et traitement donne les résultats suivants:

- Les nitrates : on constate selon le modèle d'analyse des variances (tab.2), qu'il y a un effet temps et un effet traitement avec des probabilités inférieures à 5% mais pas d'interaction temps-traitement. L'évolution des nitrates au cours du temps pour les trois traitements, ne montre pas de différences significatives (parallélisme des profils). En utilisant le test de Newman-Keuls au seuil de 5%, on constate que par rapport au temps (tab.5), les résultats de nitrates constituent trois groupes homogènes mais avec une évolution continue, chaque groupe ayant un point commun avec le suivant. La diminution de la concentration dans le temps est donc régulière.

- Les nitrites: le tableau d'analyse de variance (tab.3) pour ce sel, montre qu'il y a un effet temps, un effet traitement et une faible interaction temps-traitement, la probabilité pour cette dernière étant de 0.79%. Le test de Newman-Keuls montre que les nitrites constituent quatre groupes homogènes bien distincts dans le temps (tab.5), ce qui signifie que ce sel a une évolution par palier, chaque semaine en constituant un au delà de deux semaines. Par rapport au facteur traitement, les résultats de nitrites constituent deux groupes homogènes: le premier étant formé par le chloroforme et la congélation et le second par le chlorure mercurique. L'interaction temps-traitement donne une évolution continue avec des groupes homogènes imbriqués.

- Le phosphate: le tableau d'analyse de variance (tab.4) montre qu'il y a un effet temps, un effet traitement et un effet inter-action tous importants. Le test de Newman-Keuls montre une évolution discontinue dans le temps, chaque semaine constituant un palier distinct de la suivante. Par rapport au facteur traitement (tab.6), le chloroforme constitue un groupe homogène avec la congélation nettement différent du groupe constitué par le chlorure mercurique. L'effet interaction temps-traitement confirme ces résultats, montrant une évolution continue pour les traitements chloroforme et congélation au cours de l'ensemble du test et le chlorure mercurique qui évolue par palier à partir de la deuxième semaine.

Les courbes représentant la teneur en sels nutritifs en fonction du temps (fig.1) ont des pentes de même allure et très proches pour les traitements 1 et 3 et nettement différentes pour le traitement 2. Ce qui confirme encore les résultats statistiques.

Le graphique des teneurs en sels nutritifs en fonction des traitements réalisé avec la version modifiée de "standard box and whisker plot" de McGill et al (1978) (fig.2) résume la comparaison des traitements (toutes mesures de temps confondues) et confirme les observations obtenues avec les tests statistiques. En effet, on observe sur cette figure que les médianes issues des traitements par congélation et par le chloroforme sont très proches quelque soit le sel nutritif considéré et que les encoches et les boîtes tracées représentant l'ensemble des données et leur dispersion autour de la médiane se superposent. Ces résultats montrent donc que ces deux traitements ne sont pas significativement différents au seuil de 5%. Par contre, le traitement par le chlorure mercurique présente une médiane très en dessous des deux autres et des boîtes beaucoup plus allongées notamment pour les

nitrate et les phosphates. Ces observations montrent que le traitement par chlorure mercurique est significativement différent des autres. Par ailleurs, on constate que quelque soit le traitement et le sel considérés, les médianes ainsi que les données autour sont nettement inférieurs à la médiane du temps zéro: ceci montre également qu'il y'a une diminution de la concentration des sels quelque soit le traitement appliqué. En comparant les trois traitements, on remarque que cette diminution est plus marquée avec celui au chlorure mercurique pour lequel, la médiane est très inférieure comparée à la valeur initiale. Les boîtes tracées indiquent aussi qu'il y a une plus grande variabilité avec la congélation par rapport au chloroforme, notamment pour les phosphates et les nitrites.

Tous les tests effectués sur les échantillons semblent donc s'accorder sur le fait que le chloroforme conviendrait mieux à la conservation des sels phosphates et nitrites notamment pour sa plus grande stabilité par rapport à la congélation. Ce résultat confirme ceux de Murphy et Riley (1956), et Gilmartin (1967) qui préconisent l'utilisation du chloroforme pour la conservation des échantillons de phosphate. Par contre les résultats de Fitzgerald et Faust (1967), Jones (1963) et Thayer (1970) ne sont pas confirmés car malgré l'absence de filtration pour les échantillons, il n'est pas constaté une tendance à l'augmentation des concentrations de phosphate même au cours des premières semaines (fig. 1c).

En comparant nos résultats avec ceux de Kremling et Wenck (1986), on constate que les pertes observées avec les nitrates et phosphates à environ trois mois (tab.8) sont plus importantes dans notre expérience. Ce phénomène serait lié aux concentrations des échantillons, car, ceux de Kremling et Wenck étant prélevés à 100 m et 2 000 m, les concentrations y sont plus élevées et donc l'erreur relative y est minimisée. Ceci a d'ailleurs été démontré dans leurs travaux avec les concentrations des échantillons à 100 m et à 2 000 m.

C O N C L U S I O N

Dans les conditions de notre expérience, les tests statistiques (fig. 2) ainsi que l'évolution des concentrations par traitement dans le temps (fig. 1) ont montré que le chloroforme et la congélation pourraient être intéressés indifféremment pour la conservation des sels nutritifs, alors que le chlorure mercurique viendrait bien après notamment en ce qui concerne les nitrites et phosphates. En effet, les deux premiers traitements donnent des pertes relativement faibles au cours du temps alors que le chlorure mercurique significativement différent des deux autres, provoque des pertes de plus de 50% avec les nitrites et phosphates en trois mois. Il semble mieux convenir aux nitrates pour lesquels les pertes sont moins de 25% pour la même durée (tab.8).

BIBLIOGRAPHIE

- CHARPIOT (R.), 1969.- Technique de conservation des échantillons d'eau de mer pour le dosage de phosphates, nitrite, nitrate, silice et bore. Cah. Oceanogr. 8:773-793.
- FITZGERALD (G.P.) and S.L. FAUST, 1967.- Effect of water sample preservation methods on the release of phosphorus from algae. Limnol. Oceanogr. 12/2:332-334.
- GILMARTIN (M.), 1967.- Changes in inorganic phosphate concentration occurring during sea water sample storage. Limnol. Oceanogr. 12/2 : 325-328
- GRASSHOFF (K.), 1976.- Filtration and storage p. 21-30 in Methods of sea water analysis GRASSHOFF K (ed) Verlag chemie Weinheim RFA.
- GRASSHOFF (K.), M. ERHARDT and K. KREMLING, 1983. Methods of seawater analysis. Second, revised and extended edition Verlag chemie .p,25-30.
- JENKINS (D.), 1968.- The differentiation, analysis and preservation of nitrogen and phosphorus forms in natural waters. Adv. Chem. Ser. 73: 265-280.
- JONES (P.G.W.), 1963.- The effect of chloroform on the soluble inorganic phosphate content of unfiltered sea water. J. Cons. Int. Explor. Mer 28/1: 3-7.
- KREMLING (K.) and A. WENCK, 1985.- On the storage of dissolved inorganic phosphate, nitrate and reactive silicate in Atlantic ocean water samples. Meeresforsch 31(1986) 69-74.
- MACDONALD (R.W.), F.A. McLAUGHLIN, 1982.- The effect of storage by freezing on dissolved inorganic phosphate, nitrate and reactive silicate for samples from coastal and estuarine waters. Water Research vol. 16 pp 95 to 104.
- Mc-GILL (R.), J.W. TUKEY, W.A. LARSEN, 1978.- variation of box plots "American statistician 32" p12-16.
- MURPHY (J.) and J.P. RILEY, 1956.- The storage of sea water samples for the determination of dissolved inorganic phosphates. Anal. Chem. Acta 14: 318-319.
- RILEY, SKIRROW 1967.- Chemical oceanography vol. 1 p26-33 2ème édition Academie Press INC (london) LTD (1965).
- RODIER (J.), 1975.- L'analyse de l'eau: eaux naturelles. eaux résiduaires eau de mer. 7ème édition Dunod.

STRICKLAND (J.D.H.), T. R. PARSONS 1972.-A practical handbook of seawater analysis. Fish. RES. BOARD of Canada Ottawa bul. 167 (2ème édition).

THAYER (G. w.). 1970.- Comparison of two storage methods for the analysis of nitrogen and phosphorus in estuarine water. Chesapeake Science 11/3: 155-158.

Tableau 1.- Analyse statistique des résultats

TRAITEMENT		NO3	NO2	PO4
CC13	Moy.	6.60	0.60	1.02
	Var.	0.0168	0.0016	0.0014
	coef.var	0.0196	0.0673	0.0375
HgC12	Moy.	5.93	0.39	0.66
	Var.	0.2082	0.0168	0.0519
	coef.var	0.0769	0.3323	0.3453
Cong	Moy.	6.51	0.57	1.00
	Var.	0.0397	0.0062	0.0034
	coef.var	0.0306	0.1974	0.0034

Tableau 2.- Analyse de variance des nitrates

	SCE	DDL	Carrés moyens	Test F	Probabi lité
Variance totale	7.42	44	0.17		
Variance temps	1.67	4	0.42	7.57	0.0003
Variance traitement	3.34	2	1.67	30.23	0.0000
Variance inter-fact	0.75	8	0.09	1.70	0.1379
Variance résiduelle	1.66	30	0.06		

Tableau 3.- Analyse de variance des nitrites

	SCE	DDL	Carrés moyens	Test F	Probabilité
Var-lance totale	0.91	44	0.02		
Variance temps	0.43	4	0.11	23.95	0.0000
Variance traitement	0.23	2	0.11	25.68	0.0000
Variance inter-fact	0.12	8	0.01	3.32	0.0079
Var-lance résiduel le	0.13	30	0.00		

Tableau 4.- Analyse de variance des phosphates

	SCE	DDL	Carres moyens	Test F	Probabili- té
Variance totale	1.95	44	0.04		
Variance temps	0.52	4	0.13	100.30	0.0000
Variance traitement	11.06	2	0.53	408.52	0.0000
Variance inter-fact	0.33	8	0.04	32.05	0.0000
Variance résiduel le	0.04	30	0.00		

Tableau 5.- Test de Newman-Keuls seuil 1 5% : facteur temps

F1 temps	Libellés	Moyenne			Groupes homogènes		
		NO3	NO2	PO4	NO3	NO2	PO4
1	N1	6.63	0.67	1.04	A	A	A
2	N2	6.50	0.62	0.99	A	A	B
3	N3	6.37	0.55	0.91	AB	B	C
4	N4	6.21	0.48	0.82	BC	C	D
5	N5	6.09	0.40	0.75	C	D	E

**Tableau 6.- Test de Newman-Keuls seuil 5% : facteur
Traitement**

F1 trait	Libellés	Moyenne			Groupes homogènes		
		NO3	NO2	PO4	NO3	NO2	PO4
CC13	N1	6.63	0.61	1.02	A	A	A
HgCl2	N2	6.46	0.57	1.00	B	A	A
Congélat	N3	5.99	0.45	0.68	C	B	B

**Tableau 7.- la moyenne du traitement au chlorure
mercurique
12) sur celle des traitements 1 (chloroforme) et
3 (congélation)**

Traitement	NO3	NO2	PO4
chloroforme	89.8	65.0	64.7
congélation	91.1	68.4	66.0

Tableau a.- % de perte à onze semaines

Traitement	NO3	NO2	PO4
Chloroforme	6.1	18.9	11.4
Congélation	7.3	36.8	13.9
chlorure mercurique	15.8	67.2	66.7