

Abrégé des protocoles analytiques pour TP et semaine ENAC

Stéphane Marquis - Marc Deront / EPFL-LBE

1 février 2016

Résumé

Les protocoles fournis d'origine avec les kits sont parfois difficiles d'accès pour les personnes n'ayant pas l'habitude du travail pratique au laboratoire. Ce document synthétise les protocoles des kits Merck de la série Spectroquant ainsi que les kit HACH que vous allez utiliser pour l'analyse des cycle du Phosphore et de l'Azote et de la DCO. Les protocoles d'origines restent cependant à disposition dans votre documentation. Par ailleurs, plus spécifiquement pour les étudiants de la semaine ENAC, certaines analyses de base sont décrites en fin de document dans la quatrième partie.

Première partie
Cycle de l'azote

Azote ammoniacal / NH_4^+ – N

Référence du kit

Merck Spectroquant 1.14752.0001

Contenu du Kit

- Réactif 1 (bouteille de 250 ml)
- Réactif 2 (3 poudriers à bouchons bleus)
- Réactif 3 (bouteille carrée noire de 50 ml)

Protocole de mesure

- Pipeter 5 ml de la solution à analyser dans un Falcon de 10 ml
- Ajouter 0,6 ml de réactif 1 au moyen d'une micro-pipette
- Ajouter une spatule rase (celle fixée à la face interne du bouchon) de réactif 2
- Fermer le Falcon et secouer vigoureusement jusqu'à dissolution totale du réactif
- Laisser reposer 5'
- Ajouter 4 gouttes du réactif 3
- Fermer et homogénéiser
- Laisser reposer 5'
- Transférez une partie du liquide dans une micro-cuvette jusqu'à 5 mm du haut au moyen d'une pipette pasteur
- Analyser au moyen du spectrophotomètre Spectroquant Nova 60 en introduisant préalablement le bâton Autoselecteur (repère noir face à l'encoche).

Résultats et calcul

Le résultat fourni par l'appareil est exprimé en mg/l d'azote ammoniacal. Il est possible de calculer la concentration en ion ammonium en multipliant le résultat fourni par 1,29 (coefficient stœchiométrique entre les deux espèces)

Azote en tant que nitrate / NO_3^- – N

Référence du kit

Merck Spectroquant 1.09713.0001

Contenu du Kit

- Réactif 1 (bouteille de 250 ml)
- Réactif 2 (bouteille carrée noire de 50 ml)

Protocole de mesure

- Pipeter 4,0 ml du réactif 1 dans un Falcon de 10 ml
- Ajouter 0,5 ml de solution à analyser au moyen d'une micro-pipette **sans mélanger**
- Ajouter 0,5 ml de réactif 2.
- Fermer le Falcon et mélanger!! **le mélange chauffe de manière significative!!**
- Laisser reposer 10'
- Transférez une partie du liquide dans une micro-cuvette PVC jusqu'à 5 mm du haut au moyen d'une pipette pasteur
- Analyser au moyen du spectrophotomètre Spectroquant Nova 60 en introduisant préalablement le bâton Autoselecteur (repère noir face à l'encoche).

Résultats et calcul

Le résultat fourni par l'appareil est exprimé en mg/l d'azote présent dans le ion nitrate. Il est possible de calculer la concentration en ion nitrate en multipliant le résultat fourni par 4,42 (coefficient stœchiométrique entre les deux espèces)

Azote Total

Référence du kit

Merck Spectroquant 1.00613.0001

Contenu du Kit

- Réactif 1 "N-1K" (bouteille carrée noire de 50 ml)
- Réactif 2 "N-2K" (poudrier carré noir de 50 ml à bouchon bleu)
- Réactif 3 "N-3K" (bouteille carrée noire de 50 ml)
- Tubes de mesure en verre à usage unique (1 par échantillon)
- Pastille autocollante bleue pour identifier l'échantillon

Préliminaire

Enclencher l'incubateur si ce n'est pas encore fait.

Protocole (deux étapes)

Minéralisation

- Pipeter 10,0 ml de la solution à analyser dans un tube **en verre** avec bouchon vissable.!! **ne pas utiliser le tube de mesure fourni dans le kit!!**. Vérifier préalablement que le goulot du tube ne soit pas ébréché, même légèrement, et qu'il y ait un joint au fond du bouchon vissable.
- Ajouter une spatule rase (celle fixée à la face interne du bouchon) du réactif 1 et mélanger
- Ajouter 6 gouttes de réactif 2
- Fermer hermétiquement et mettre à minéraliser pendant 60' dans l'incubateur à 120°C
- Sortir le tube et le laisser reposer 10' à température ambiante

Protocole de mesure

- Pipeter 1,0 ml d'échantillon minéralisé et refroidi dans un tube de mesure fourni dans le kit. **Ne pas mélanger**
- Ajouter 1,0 ml de réactif 3 et visser le couvercle.
- Mélanger
- Laisser reposer pendant 10'
- Analyser au moyen du spectrophotomètre Spectroquant Nova 60 directement avec le tube de mesure en alignant le repère noir face à l'encoche

Résultats et calcul

Le résultat fourni par l'appareil est exprimé en mg/l d'azote. Cet azote vient des nitrates, des nitrites, de l'ammonium et de l'azote organique présent dans l'échantillon.

Deuxième partie

Cycle du phosphore

Phosphore ex phosphate / PO_4^{3-} – P

Référence du kit

Merck Spectroquant 1.14848.0001

Contenu du kit

- Réactif 1 (bouteilles carrées noire de 50 ml)
- Réactif 2 (Poudriers carrés de 25 g. à bouchon bleu)

Protocole de mesure

- Pipeter 5,0 ml de solution à analyser dans un Falcon de 10 ml
- Ajouter 5 gouttes du réactif 1 et mélanger
- Ajouter une spatule rase (celle fixée à la face interne du bouchon) de réactif 2
- Fermer le Falcon et agiter vigoureusement jusqu'à dissolution totale du réactif
- laisser reposer 5'
- Transférez une partie du liquide dans une micro-cuvette PVC jusqu'à 5 mm du haut au moyen d'une pipette pasteur
- Analyser au moyen du spectrophotomètre Spectroquant Nova 60 en introduisant préalablement le bâton Autoselecteur (repère noir face à l'encoche).

Résultats et calcul

Le résultat fourni par l'appareil est exprimé en mg/l de phosphore venant du ion phosphate. Il est possible de calculer la concentration en ion phosphate en multipliant le résultat fourni par 3,06 (coefficient stœchiométrique entre les deux espèces). Il arrive également que le phosphore soit exprimé en concentration de pentoxyde de diphosphore, auquel cas il convient de multiplier le résultat par 2,29.

Phosphore Total

Référence du kit

Merck Spectroquant 1.14687.0001 "Crack Set 10"

Contenu du Kit

- Réactif 1 "R-1" (bouteille carrée noire de 25 ml)
- Réactif 2 "R-2" (poudrier carré noir de 25 ml)
- Réactif 3 "R-3" (bouteille carrée noire de 25 ml)
- Papier indicateur pH universel
- Capuchon doseur bleu

Informations préliminaires

Ce kit ne constitue pas en soi un kit d'analyse à part entière. Il s'agit en fait d'une extension du kit précédant. Le principe général est de prendre la même matrice que celle prélevée lors de l'analyse des phosphates et de la soumettre à une "minéralisation" afin de libérer le phosphore non phosphate au moyen du "Crack Set 10" et de le transformer en phosphate. Cette matrice "enrichie" en phosphate sera analysée ensuite comme lors d'une recherche de phosphate avec le kit "Merck Spectroquant 1.14848.0001". C'est ensuite par différence entre les résultats des deux tests qu'il sera possible de différencier le phosphore non phosphate.

Préliminaire

Enclencher l'incubateur si ce n'est pas encore fait.

Protocole (deux étapes)

Minéralisation

- Pipeter 10.0 ml de la solution à analyser dans un tube **en verre** avec bouchon vissable. Vérifier préalablement que le goulot du tube ne soit pas ébréché, même légèrement, et qu'il y ait un joint au fond du bouchon vissable.
- Ajouter une goutte de réactif 1 et mélanger
- Remplacer le bouchon noir du réactif 2 par le capuchon doseur bleu
- Secouer vigoureusement le flacon pour décompacter la poudre
- Renverser le flacon et tapoter légèrement 2 ou trois fois le nez du bouchon bleu sur une table
- Enfiler le nez du bouchon bleu dans le goulot du tube en verre et appuyer sur la languette latérale du bouchon bleu et la maintenir appuyée
- Tapoter légèrement l'ensemble pour faire descendre le contenu de la dose du bouchon bleu et relâcher la languette.
- Fermer hermétiquement le tube en verre, mélanger jusqu'à dissolution et mettre à minéraliser pendant 60' dans l'incubateur à 120°C

- Sortir le tube et le laisser reposer 30' à température ambiante
- Dans le tube de minéralisation refroidi **tenu verticalement** ajouter trois gouttes de réactif 3
- Mélanger
- Laisser reposer pendant 2'

Protocole de mesure

Sur la solution refroidie, analyser les phosphates exactement de la même manière que selon le protocole précédant (phosphore ex phosphate) en utilisant le kit "Merck Spectroquant 1.14848.0001".

Résultats et calcul

Le résultat fourni par l'appareil est exprimé en mg/l de phosphore. Ce phosphore vient des phosphates, des phosphites, des polyphosphates et du phosphore organique présent dans l'échantillon.

Troisième partie

Demande Chimique en Oxygène (DCO)

La DCO est une analyse en apparence très simple. Elle est très sensible au biais de manipulation. Sa précision avoisine un écart de 10% par rapport à la moyenne. La dispersion s'aggrave considérablement avec les biais de manipulation. La DCO repose sur une oxydation totale (organique et minérale) par du dichromate de potassium à chaud et en milieu acide. Le chrome VI originellement de couleur orange se transforme en chrome III de couleur verte. C'est sur la base de l'intensité de la couleur verte que l'analyse se fait.

Référence du kit

HACH Lange LCK 514 (100 - 2000 mg/L)

Préliminaire

Enclenchez l'incubateur si ce n'est pas déjà fait. Consultez un technicien le cas échéant.

Protocole

- Agiter le tube d'analyse pendant 15" avec un vortex (tenir le tube entre le pouce et l'index à environ 3/4 de sa hauteur) de manière à suspendre le sédiment qui se trouve au fond du tube.
- A l'aide d'une micropipette, pipeter 2,00 mL d'échantillon à analyser dans le tube.
- Fermer le tube et agitez-le 15" au vortex de la même manière que précédemment.
- Placer le tube dans l'incubateur pendant 30'.
- Agitez le tube au vortex pendant 15" et laissez revenir à température ambiante pendant 20'.
- Sans agiter, mesurer la DCO au moyen du spectrophotomètre DR 2500. Demander à un technicien de vous expliquer son fonctionnement.

Quatrième partie
Analyses diverses

pH/PO₂

Introduction

Ces deux mesures se font à l'aide d'un multimètre HACH HQ40D. L'appareil est étalonné et prêt à l'emploi et est d'une utilisation élémentaire. Dans la configuration proposée l'appareil sera équipé de deux sondes (pH et PO₂). L'appareil les mesurera les deux, simultanément, dès que vous déclencherez la mesure.



pH

Le pH se mesure via une sonde remplie de gel. Cette sonde est très sensible et surtout très onéreuse. Pour en préserver l'intégrité veuillez respecter les points suivants :

- La sonde ne doit pas rester à l'air libre plus de 5 mn. Elle doit être en permanence stockée avec sa tête baignant dans le liquide de stockage qui se trouve dans la petite tête blanche. Cette tête doit être délicatement retirée pour effectuer les mesures.
- La sonde ne doit pas être tapée, secouée ou brutalisée.
- Pour effectuer la mesure la sonde peut être complètement immergée dans le milieu pour un bref instant. Pour une mesure au laboratoire, dans la mesure où le niveau d'immersion est contrôlable on immergera la sonde que sur la moitié de sa hauteur.
- Une fois la mesure effectuée, rincer la sonde sous l'eau potable du robinet, tamponnez-la avec une kleenex et replonger le nez de la sonde dans son liquide de stockage.



PO2

La sonde PO2 est très sensible aux chocs et est très onéreuse. Contrairement à la sonde pH elle n'a pas pas besoins d'être stockée dans un liquide de conservation. Pour en préserver l'intégrité veuillez respecter les points suivants :

- **Ne jamais chercher à bouger, ôter ou dévisser le nez renflé de la sonde. La sonde serait irrémédiablement détruite. Le cache renflé doit toujours être présent lors de la mesure.**
- La sonde ne doit pas être tapée, secouée ou brutalisée
- Pour effectuer la mesure la sonde peut être complètement immergée dans le milieu pour un bref instant. Pour une mesure au laboratoire, dans la mesure où le niveau d'immersion est contrôlable on immergera la sonde que sur la moitié de sa hauteur.



Prise de mesure

Pour effectuer la mesure vous ne devrez appuyer que sur **un et un seul bouton**, **LE VERT** à votre droite quand vous regardez l'appareil, en tenant les connecteurs de sonde en haut. Pour effectuer la mesure :

- Plonger la ou les sondes dans le ou les milieux à analyser
- Appuyez sur le bouton vert
- Laissez stabiliser la mesure
- Une fois que la mesure sera stable l'affichage sera bloqué et vous pourrez la relever
- **Ne cherchez en aucun cas à naviguer par vous-même dans les menus de l'appareil. Vous ne maîtrisez pas son paramétrage et risquez d'occasionner des dégâts fastidieux à réparer.**

Turbidité

Matériel

- Turbidimètre "TurbiCheck" de chez AquaLytic
- Cellule de mesure avec bouchon

Préliminaires

La cellule de mesure et le bouchon doivent être propres, secs et exempts de dépôts calcaires. Une cellule rayée doit être remplacée. La mesure de turbidité se fait au moyen d'un rayon lumineux incident à 90° calé à une longueur d'onde de 860 nm, pour éviter les absorbances liées à la couleur.

Mode opératoire

- Mettre en marche le turbidimètre en pressant sur la touche "**ON/OFF**" et attendre l'affichage "**ntu**"
- Rincer une fois la cellule avec la solution à analyser et la remplir jusqu'au trait de jauge blanc
- Fermer la cellule avec le bouchon vissable
- Placer la cellule dans le puits en prenant garde de diriger le triangle imprimé sur la cellule contre vous
- Appuyer sur le bouton "**READ**" et attendre la mesure
- L'unité est le NTU (Nephelometric Turbidity Unit)

Transparence selon Snellen

Appareil

L'appareil permettant de mesurer la transparence selon Snellen est un cylindre de verre de 60 cm de haut et de 22 mm de diamètre. le fond de l'appareil est muni d'une pastille en verre incolore permettant de lire des caractères Arial 11 par transparence à travers la colonne d'eau.

Mode opératoire

- Monter l'appareil de Snellen sur son support et réglez la hauteur de celui-ci de manière à ce que le bas du tube se trouve à 20 mm de la plaque du support
- Poser la languette de papier sur laquelle sont inscrites les lettres Arial 11 sous le tube de l'appareil de manière à pouvoir les lire par transparence en regardant par le haut du tube de l'appareil
- Placer un béccher de 250 ml sous le robinet latéral du tube de Snellen
- Verser l'échantillon fraîchement prélevé et homogénéisé dans le tube jusqu'à sa marque supérieure, et **sans attendre** :
- Ouvrir le robinet latéral en regardant à travers la colonne de liquide jusqu'à ce que la lecture des lettres soit possible et qu'elles soient distinctement lisibles
- Fermer le robinet et notez le niveau
- Si la mesure n'est pas possible du fait que le niveau du liquide est inférieur à 50 mm, vous devrez refaire la mesure en diluant 2 fois ou plus

Expression du résultat

Le résultat de la mesure s'exprime directement en millimètre. Exemple :

- En laissant couler l'échantillon homogénéisé, la lecture est possible à 230 mm.

$$T_s = 230mm \quad (1)$$

- En laissant couler l'échantillon homogénéisé, les lettres étaient lisibles en dessous de la barre des 50 mm. On a procédé à une dilution de 10 fois en diluant 1 volume d'échantillon avec 9 volumes d'eau du robinet. A près dilution le mélange est lisible à 280 mm.

$$T_s = \text{lecture} / \text{facteur} = 280 / 10 = 28mm \quad (2)$$

Remarque

- Cette mesure dépend énormément de l'accuité visuelle de l'opérateur ainsi que de son appréciation de la lisibilité

Matières Décantables

Définition

Le taux de matière décantable se définit comme étant le volume de matière sédimentée dans un kilogramme d'eau après un temps "t" qui voit une mesure stable du niveau de sédiment. Classiquement le volume stabilisé de sédiments est de 200 à 300 ml/l en 30'.

Mode opératoire

- Un prélèvement de 1000 ml de boues activées est homogénéisé et rapidement versé dans un cône de Imhoff. A partir de ce moment décompter le temps
- Prendre une mesure toute les 5' jusqu'à stabilisation du niveau de sédiment et clarification du surnageant (environ 30')

Remarques

Il est intéressant de prendre une mesure de turbidité toute les 10' jusqu'à turbidité constante puis, une fois que cette valeur est atteinte de mesurer une DCO.