

Département des Sciences de la Terre

Licences Sciences et Techniques Eau & Environnement

Mémoire de projet de fin d'étude

ANALYSES DES ISOTOPES STABLES DES NITRATES DANS DES ÉCHANTILLONS D'EAU PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Réalisé par : BEN TABET Chaima
CHARDI Safaa

Soutenu le : 30 Juin 2021

Devant la commission d'examen composée de :

Encadrant : Pr. Abdelfattah BENKADDOUR, FST Marrakech
Examineur : Pr. Khalid ELAMARI, FST Marrakech

Année universitaire 2020-2021

DÉDICACE

Nous dédions ce projet :

A nos chers parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer notre respect, notre amour éternel et notre considération pour les sacrifices consentis pour notre instruction et notre bien-être. Et nous ne pourrions jamais oublier la tendresse, amour et encouragement que vous avez apporté à nous durant nos études.

A nos chers frères et sœurs

Aucun mot, aucune dédicace ne pourrait exprimer nos sentiments d'amour et de tendresse envers vous pour l'encouragement et le soutien exemplaire durant nos études.

A toute la famille CHARDI

A toute la famille BEN TABET

Merci pour votre amour et encouragement.

A nos cher(e)s ami(e)s

En particulier (OUAARDA Hasna, QADIRI Imane, DAOUDI Hajar, BOUKMOUR Hanane, EL HAMIANI Hind, IDOUCHBAREG Khadija)

Merci pour votre soutien et les agréables moments que nous avons passés ensemble .Puisse ce travail être le témoignage de amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble.

REMERCIEMENTS

Nous aimerions adresser nos sincères remerciements à toutes les personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce modeste travail à savoir.

Mme RAIBI Fatima Cadre supérieur à l'Unité Hydrogéologie et Isotopique au CNESTEN pour tout le temps qu'elle nous a consacrée, pour ses directives précieuses, et pour la qualité de son suivi durant toute la période de notre stage malgré ses charges professionnelles.

Mr BENKADDOUR Abdelfattah professeur à la faculté des Sciences et Techniques de Marrakech qui a accepté d'encadrer notre travail et nous a apporté de précieux conseils pour la réalisation de ce mémoire.

Mr SAADI Radouan pour son aide et sa grande sympathie tout au long de notre stage.

Mr TAOUS Fouad pour sa disponibilité et son aide pour réaliser ce mémoire.

Mr ELAMARI Khalid notre enseignant à la FST, qui nous a fait l'honneur d'examiner ce rapport et en siégeant dans ce jury. Ses jugements seront d'une grande valeur dans l'appréciation de ce travail.

Un très grand merci à l'ensemble du personnel du CNESTEN pour leur aide, leurs conseils et pour leur appui tout au long de ce stage.

Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à toutes les personnes qui de près ou de loin nous ont aidé à la réalisation de ce mémoire.

RÉSUMÉ

De nos jours, beaucoup des nappes, des lacs et des rivières du royaume souffrent de la pollution. Les résultats de certaines analyses montrent que le taux de nitrates dans les eaux est en croissance jour par jour. La présence des ions des nitrates cause beaucoup de méfaits sur l'environnement et l'homme. Se qui rend les chercheurs scientifiques pensent à des techniques pour éliminer cet élément dans l'eau mais avant l'élimination, il faut suivre l'origine des nitrates par des méthodes plus développée, plus précise et plus utilisée, donc la meilleure méthode pour le traçage c'est la méthodes isotopique.

Le Centre National de l'Energie, des Sciences et des Techniques Nucléaires en collaboration avec l'Agence Internationale de l'Énergie Atomique ont décidé d'adopter ce sujet afin de trouver des solutions pour résoudre ce problème.

L'objectif de ce travail est d'identifier la source des nitrates par la méthode isotopique qui consiste à analyser des échantillons d'eau de surface par spectrométrie de masse à rapport isotopique.

Les résultats d'un cas d'étude que nous avons adopté, nous a aidé à déterminer l'origine de la pollution par les nitrates dans ce cas on a trouvé que l'origine de cette pollution sont des zones du fumier et les fosses septiques.

LISTE DE FIGURES

Figure1 : Cycle de l'eau (Gat, J et al., 1996).....	12
Figure2: Schéma représentant la relation entre les divers composés azotés et les risques qui résultent de leur présence (BOUGHERARA. H. Thèse de master)..	14
Figure3 : Étapes d'eutrophisation (Photo credit: Dr. Hans W. Paerl).....	15
Figure4 : Cycle d'Azote (Mariotti. A. (1982)).....	19
Figure 5: Distribution de $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{18}\text{O}$ de différentes sources potentielles des nitrates, (Kendall et al.,2008).....	21
Figure6 : exemple des flacons, seringues 50ml, filtres (0.21um) à seringue stériles.....	23
Figure7 : section présente les grandes lignes de la mesure de la composition isotopique du nitrates	27
Figure8 : les flacons utilisés.....	28
Figure9 : pompe à vide de rotary.....	28
Figure10: La solution de Titanium et échantillons à analysé.....	29
Figure11 : Les étapes d'injection N_2O	30
Figure12 : Dispositif analytique.....	31
Figure13: Spectrogramme typique obtenu lors de l'analyse d'un échantillon de N_2O	32
Figure14 : Les étapes de fonctionnement de l'IRMS.....	33
Figure 15 : Source de potentiel des nitrates dans l'exemple analysé.....	37

LISTES DES TABLEAUX

Tableau1 : Les étapes de prélèvement d'échantillons	25
Tableau2 : les résultats de l'analyse des isotopes stables des nitrates.....	36

SOMMAIRE

Dédicace.....	2
Remerciements.....	3
Résumé.....	4
Listes de figures.....	5
Listes des tableaux	5
Introduction	8
Présentation du Centre National d'Énergie,des sciences et techniques nucléaires.....	9
Chapitre I : Revue bibliographique.....	11
I-1 : Généralités sur l'eau.....	12
I-2 : Les principales sources de la pollution.....	13
I-3 : l'effet des nitrates sur l'homme et l'environnement.....	14
I-4 : La lutte contre la pollution par les nitrates	16
I-5 : Le traçage de la pollution d'eau par les isotopes stables de nitrates ¹⁵ N et ¹⁸ O	16
I-5-1 : La composition isotopique	16
I-5-2 : Les propriétés physico-chimiques.....	17
I-5-3 : Le fractionnement et l'abondance isotopique des nitrates	17
I-5-4 : Fractionnement isotopique dans le cycle d'azote.....	18
I-5-5 : Le traçage de la pollution par les nitrates.....	20
Chapitre II : Matériels et Méthode.....	22
II-1 : Echantillonnage.....	23
II-2 : Préparations chimiques.....	26
II-2-1 : Préparation de la solution du chlorure de Titanium (III).....	26
II-2-2 : Préparation de la solution à analyser.....	27
II-3 : Analyses des échantillons par spectrométrie de masse.....	31
II-3-1 : Définition de la spectrométrie de masse.....	31
II-3-2 : Mesure isotopique de N ₂ O par IRMS	32
II-3-3 : Calibration de différentes valeurs isotopiques	33
II-3-4 : Incertitudes sur la mesure de $\delta^{17}\text{O}$, $\delta^{18}\text{O}$, $\Delta^{17}\text{O}$, et $\delta^{15}\text{N}$	34
Chapitre III : Résultats et discussion.....	35
III-1 : Un exemple des résultats de données	36
III-2 : Interprétation des résultats	37
Conclusion générale.....	38
Les références bibliographique.....	40

INTRODUCTION

L'eau est un élément indispensable à la vie, elle est le substrat fondamentale des activités biologiques et le constituant le plus important des êtres vivants (70% de leur poids moyen).

Malheureusement cet élément est exposé à la pollution par plusieurs polluants. Pour avoir plus d'informations sur l'origine et le comportement de la pollution, il est préférable de suivre plusieurs paramètres.

On trouve que les impacts des activités anthropiques sur le fonctionnement des cours d'eau sont étudiés à partir d'un certain nombre de polluants spécifiques, dans notre cas on utilise les nitrates qui sont issus à partir des activités agricoles, industrielles et des activités humains.

Pour mieux comprendre la composition de la fraction dissoute de cette matière organique et la relier à la qualité des masses d'eau. On se base sur des méthodes plus développées qui utilisent les isotopes comme des traceurs de la pollution.

Donc le but est d'appliquer la méthode isotopique pour déterminer l'origine des nitrates dans l'eau à l'aide de la spectrométrie de masse qui détermine le rapport des isotopes de nitrates.

La méthodologie de l'étude s'articule autour de trois parties principales :

- *Revue bibliographique
- *Matériels et Méthodes
- *Résultats et discussion

Présentation du Centre National d'Énergie, des sciences et techniques nucléaires

Le centre national de l'énergie, des sciences et techniques nucléaires est situé à 22km au Nord-Est de Rabat et 15km au Sud-Ouest de Kénitra dans la forêt de la Maâmora. C'est un complexe technologique abritant réacteur de recherche et un ensemble de module scientifique et technique comprenant :

- infrastructure de sûreté, de sécurité et de gestion des situations d'urgence ;
- installation de production des radio-pharmaceutiques ;
- infrastructure de gestion des déchets radioactifs ;
- plateforme d'analyse ;
- plateforme des applications industrielle ;
- laboratoire d'étalonnage et de dosimètres ;
- centre de formation



CNESTEN est un établissement public à caractère scientifique, technique, industriel et commercial, placé sous la tutelle du Ministère De l'énergie, des Mines, de l'Eau et de l'environnement et administré par un conseil d'administration présidé par le Premier Ministre. Ses principales missions sont :

- Promouvoir la recherche scientifique et les applications des techniques nucléaires dans les différents secteurs socio-économiques du pays : médecine, industrie, environnement, agriculture, hydrologie etc.
- Préparer les bases technologiques nécessaires à l'introduction de l'électronucléaire : Technologie des réacteurs, cycle du combustible, sûreté nucléaire.

- Assurer à l'échelle nationale, la gestion des déchets radioactifs.
- Constituer l'outil technique de l'état en matière de sûreté et sécurité radiologique.

CHAPITRE I : Revue **bibliographique**

I-1 : Généralités sur l'eau :

Cycle de l'eau : le voyage de l'eau à travers la terre

Le cycle d'eau se décompose en plusieurs étapes :

- **L'évaporation** : les rayons du soleil réchauffent l'eau des rivières, des fleuves, des lacs, des mers et des océans et cela fait passer de l'état liquide à l'état de vapeur d'eau (gazeux)
- **La condensation** : au contact de l'atmosphère, la vapeur d'eau se refroidit et se transforme en gouttelettes qui vont former les nuages, la brume ou le brouillard.
- **La précipitation** : lorsque les gouttelettes des nuages deviennent trop lourdes, elles tombent sous forme de pluie, de neige ou de grêle.
- **L'infiltration** : Une partie de l'eau des précipitations pénètre dans la terre, formant ainsi des réserves d'eau souterraines, les nappes phréatiques.
- **Le ruissellement** : L'autre partie de l'eau des précipitations s'écoule en surface, alimentant ainsi les rivières, les fleuves, jusqu'aux océans.

Le cycle de l'eau recommence ainsi sans cesse et ne s'arrête jamais.

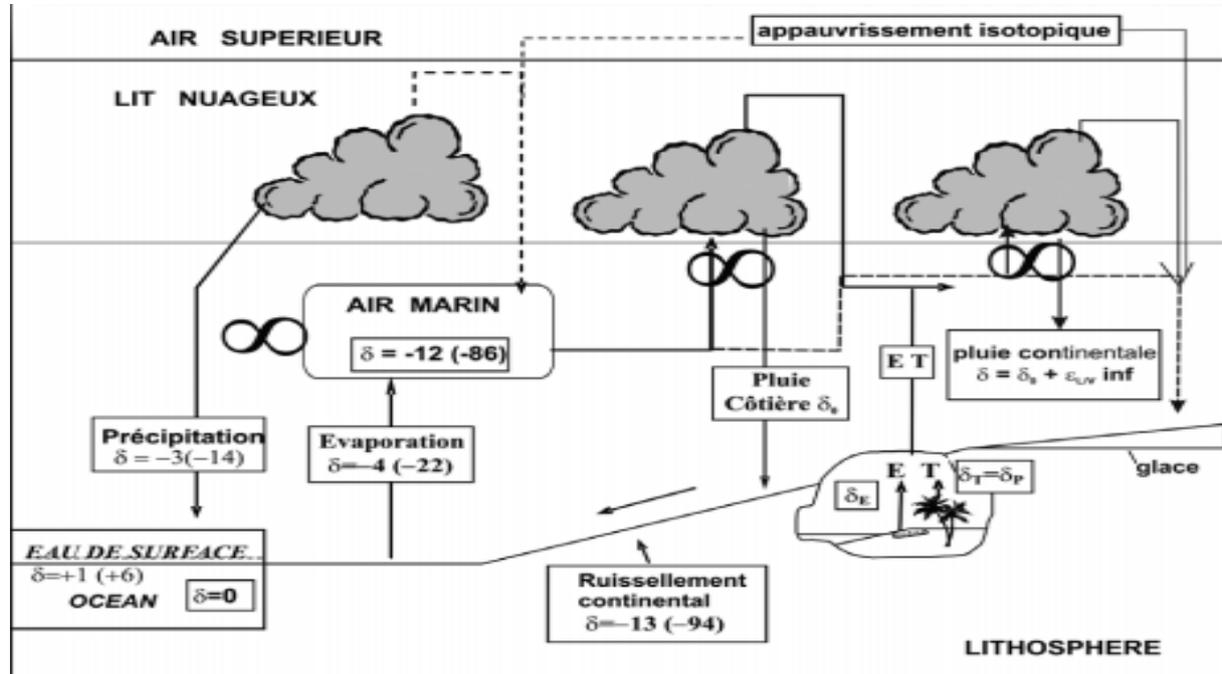


Figure1 : Cycle de l'eau (Gat, J et al., 1996).

I-2 : Les principales sources de la pollution d'eau :

La pollution d'eau peut être définie comme une altération de sa qualité et de sa nature en modifiant ses propriétés physiques, chimiques et biologiques qui rendent son utilisation dangereuse et perturbe l'écosystème aquatique (le comité de recherche et de sensibilisation d'Eau Secours, 2006).

Cette pollution peut venir de plusieurs sources :

- ***La pollution industrielle*** : Les industries et les sites industriels du monde entier contribuent largement à la pollution de l'eau. De nombreux sites industriels produisent des déchets sous la forme de produits chimiques toxiques et de polluants et, bien que réglementés, certains ne disposent toujours pas de systèmes de gestion des déchets appropriés. Dans ces rares cas, les déchets industriels sont déversés dans les systèmes d'eau douce voisins. Lorsque les déchets industriels ne sont pas traités correctement (ou pire, pas traités du tout), ils peuvent très facilement polluer les systèmes d'eau douce avec lesquels ils entrent en contact.

- ***La pollution agricole*** : Afin de protéger leurs cultures des bactéries et des insectes, les agriculteurs utilisent souvent des produits chimiques et des pesticides. Lorsque ces substances s'infiltrent dans les eaux souterraines, elles peuvent nuire aux animaux, aux plantes et aux humains. De plus, lorsqu'il pleut, les produits chimiques se mélangent à l'eau de pluie, qui s'écoule ensuite dans les rivières et les ruisseaux qui se jettent dans l'océan, aggravant ainsi la pollution de l'eau.

- ***La pollution domestique*** : Des produits chimiques, des bactéries et des agents pathogènes dangereux peuvent être trouvés dans les eaux usées, même lorsqu'elles ont été traitées. Les eaux usées de chaque ménage sont rejetées dans la mer avec de l'eau douce. Les agents pathogènes et les bactéries présents dans ces eaux usées provoquent des maladies et sont donc à l'origine de problèmes de santé chez les humains comme chez les animaux.

- ***Trop de phosphore et de nitrate dans l'eau*** : Dans la plupart des rivières et lacs, la croissance des algues et des plantes est assurée par le phosphore et le nitrate. Les excédents de ces derniers qui se retrouvent dans les milieux aquatiques constituent donc la cause directe de l'eutrophisation des cours d'eau. Cela peut avoir plusieurs effets néfastes tels que la turbidité d'eau, certaines algues peuvent produire des substances qui intoxiquent le zooplancton, les poissons et les oiseaux aquatiques.

I-3 : L'effet des nitrates sur l'homme et l'environnement :

La présence d'ion nitrate dans les eaux engendre deux principaux impacts :

Nuisances à la santé humaine :

Les nitrates ne sont pas en eux-mêmes dangereux pour la santé mais leur transformation en ions nitrites, assurée par les bactéries intestinales, qui présente un risque toxique potentiel. Environ 20% des nitrates sont transformés par la flore buccale en nitrites qui sont alors facilement absorbés par l'intestin et l'estomac. Les nitrites seraient en cause dans des cas de méthémoglobinémie qui est une oxydation de l'hémoglobine qui induit la formation de méthémoglobine en grande quantité et réduit l'oxygénation des cellules. Cette maladie se manifeste par une cyanose, coloration bleutée de la peau et des muqueuses, peut provoquer l'asphyxie et la mort. Les nitrites réagissent aussi avec les amines et les amides. Cette interaction serait susceptible de former des composés azotés cancérigènes pour le tube digestif.

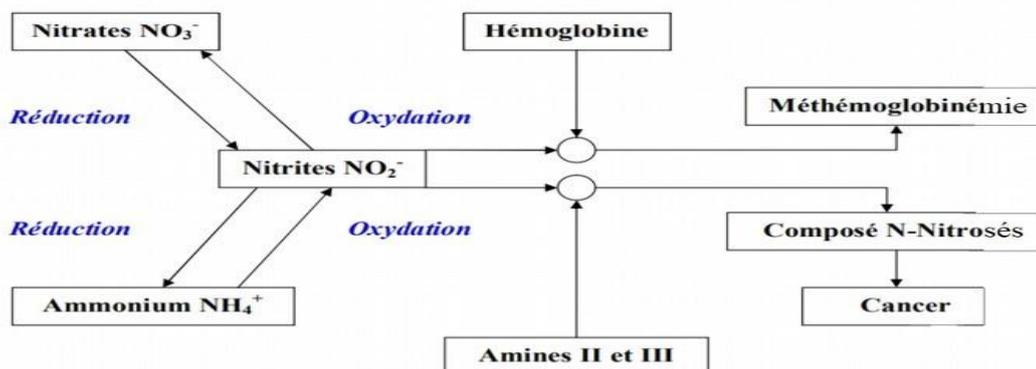


Figure2: Schéma représentant la relation entre les divers composés azotés et les risques qui résultent de leur présence (BOUGHERARA. H. Thèse de master)

Nuisances à l'environnement :

En ce qui concerne l'environnement, dans les eaux de surface, les nitrates ne sont pas décomposés, car l'eau est en général aérée, sauf dans des circonstances de condition extrême. Lorsque les eaux sont trop chargées en nitrates et en phosphates, ces deux nutriments permettent la croissance des algues microscopiques (phytoplancton) et des végétaux fixés (macrophytes) d'une manière excessive. La matière organique présente dans le fleuve augmente démesurément (la rivière devient parfois verte tellement les algues y pullulent),

et quand les algues meurent, cette matière organique se décompose en consommant tout l'oxygène de la colonne d'eau, induisant ainsi l'anoxie (l'absence d'oxygène dans l'eau), et donc la mort de tous les poissons et invertébrés du milieu. Cette anoxie ne se produit pas en général dans le réseau fluvial mais dans les estuaires turbides où le transit de l'eau est fortement ralenti et où la décomposition l'emporte sur la production algale. Le phénomène **d'eutrophisation** fluviale se produit principalement au printemps et en été, quand l'ensoleillement est fort, permettant la photosynthèse par les algues, et la température élevée.

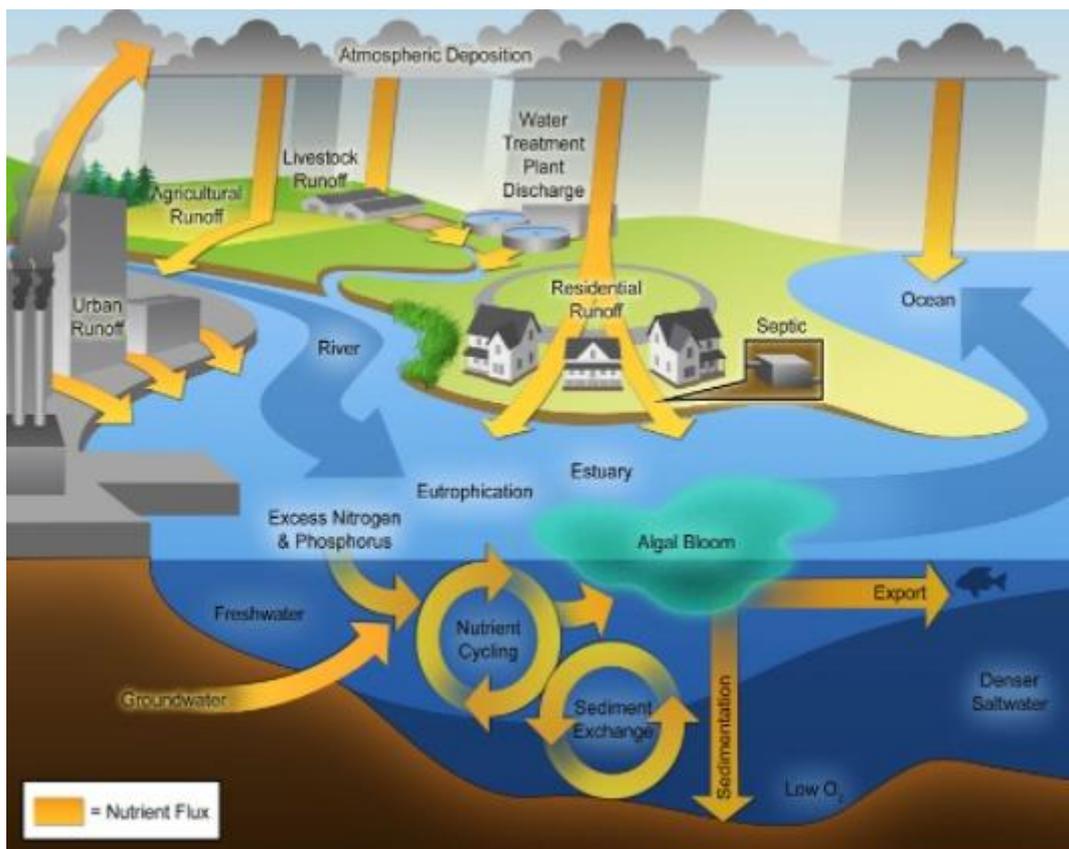


Figure3 : Étapes d'eutrophisation (Photo credit: Dr. Hans W. Paerl)

I-4 : La lutte contre la pollution par les nitrates :

Ces différents problèmes causés par les nitrates, en plus que tous les sels de ces derniers sont très solubles dans l'eau, ont amené les chercheurs à effectuer des recherches concernant la lutte contre la pollution des eaux. Il est possible d'utiliser et de combiner certaines techniques pour que les eaux usées, domestique et urbaines et les eaux usées résiduelles industrielles, ne soit déversées dans le milieu naturel qu'après avoir subi des traitements réduisant la pollution dans des limites acceptables, respectant les exigences biologiques du règne animal, du règne végétal et au-dessus de tout du genre humain. On trouve plusieurs procédés d'élimination des nitrates dans l'eau :

Les procédés physico-chimiques :

- Échange d'ions sur résine
- Deux procédés membranaires « osmose inverse et électrodialyse » .
(Sibony, 1983)

Les procédés biologiques :

Se base sur l'utilisation des bactéries qui utilise les nitrates à la place d'oxygène de l'air et qui les transforment en azote gazeux.

I-5 : Le traçage de la pollution d'eau par les isotopes stables de nitrates : ^{15}N & ^{18}O

I-5-1 : La composition isotopique des nitrates :

Le nitrate est un composé inorganique composé d'un atome d'azote (N) et de trois atomes d'oxygène (O). Sa formule chimique est NO_3^- et sa masse Moléculaire est de 62 g.mol⁻¹.

C'est un élément indispensable à la vie et notamment au développement des plantes, cependant la présence de ces ions peut engendrer des nuisances à la santé de l'homme et aussi de l'environnement.

Il existe deux isotopes stables naturels de l'azote, à savoir ^{14}N (99,633 %) et ^{15}N (^{15}N (0,366 %). Et pour l'oxygène il y a trois isotopes stables, ^{16}O (99,757 %), ^{17}O (0,038 %) et ^{18}O (0,205 %).

L'azote et l'oxygène participent à divers processus physiques et réactions chimiques dans l'environnement

I-5-2 : Les propriétés physico-chimiques :

Les nitrates étant des sels très solubles dans l'eau, ils migrent donc aisément dans la nappe phréatique lorsque les niveaux excèdent ce que les plantes peuvent utiliser. Les nitrates sont très utilisés comme engrais minéraux. Ils sont également utilisés dans les explosifs, comme agents oxydants dans l'industrie chimique et comme agents de conservation. Dans des conditions anaérobies, le nitrate peut se dénitrifier.

I-5-3 : Le fractionnement et l'abondance isotopique des nitrates :

**Abondance isotopique :*

Beaucoup d'éléments sont présents dans la nature sous différentes formes isotopiques, chimiquement indiscernables. C'est le cas, entre autres, de l'azote et de l'oxygène. Par spectrométrie de masse, on peut mesurer un rapport isotopique, R, qui exprime, dans un composé donné, la proportion d'isotope lourd par rapport à l'isotope léger, le plus abondant :

$$R = \frac{[^{15}\text{N} \cdot ^{14}\text{N}]}{[^{14}\text{N} \cdot ^{14}\text{N}]} \text{ pour l'azote (1)}$$

$$R = \frac{[^{18}\text{O} \cdot ^{16}\text{O}]}{[^{16}\text{O} \cdot ^{16}\text{O}]} \text{ pour l'oxygène (2)}$$

On définit la composition isotopique δ ‰, comme la différence relative en pour mille du rapport isotopique d'un échantillon par rapport à celui d'un étalon :

$$\delta \text{échantillon (‰)} = \frac{R_{\text{échantillon}} - R_{\text{étalon}}}{R_{\text{étalon}}} \times 1000 \quad (3)$$

Où R est le rapport isotopique de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ou $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ de l'échantillon et de l'étalon. La plupart des composés biologiques présentent des ^{15}N entre -30 et 30 donc un échantillon est dit « enrichi en ^{15}N » si $\delta^{15}\text{N}$ est positif et l'inverse « appauvri en ^{15}N » est négatif (Mathieu. S. Thèse de doctorat de l'université

PARIS VI).

***Fractionnement isotopique :**

L'existence d'un fractionnement isotopique lors des réactions de transformation des composés de l'azote et de l'oxygène provient d'une différence de réactivité cinétique entre les isotopes de l'azote (^{14}N et ^{15}N) et entre les isotopes de l'oxygène (^{16}O et ^{18}O). Ainsi, par exemple, lors de la dénitrification, on assiste à un fractionnement isotopique, accompagnant la rupture de la liaison N-O lors du passage de NO_3^- à NO_2^- et de NO_2^- à N_2 . Il y a alors un partage inégal des isotopes de l'azote et de l'oxygène dans les produits de la réaction (Mathieu. S)

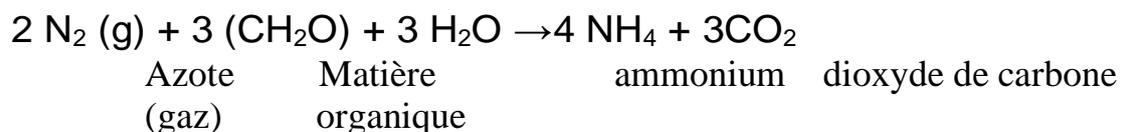
I-5-4 : Le fractionnement isotopique dans le cycle d'eau :

L'azote est un élément chimique très répandu dans la nature. On trouve cet élément dans l'eau sous forme combinée : nitrates (NO_3^-), nitrites (NO_2^-), azote ammoniacal (NH_3 , NH_4^+), azote organique.

Les principales réactions à médiation biologique qui contrôlent le fractionnement de l'azote dans le sol et les eaux sont l'assimilation, la nitrification, la dénitrification et l'ammonification. Ce sont des réactions qui appartiennent au cycle d'azote. (Shoun et al., 1992).

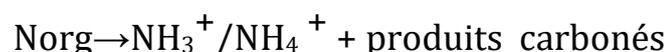
Les étapes du cycle d'azote est comme suit :

La fixation : correspond au passage de l'azote atmosphérique (N_2) en azote combiné sous l'action de certains organismes.



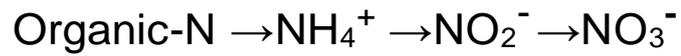
L'assimilation : est la transformation de matière azotée minérale ou organique inerte en matière vivante.

L'ammonification : est la libération d'ammoniac à partir de matières azotées organiques.



La nitrification : est l'oxydation de l'azote ammoniacal en nitrate par

l'intermédiaire de bactéries nitrifiantes.



La dénitrification : est la réduction des nitrates en azote gazeux par l'intermédiaire de bactéries dénitrifiantes.

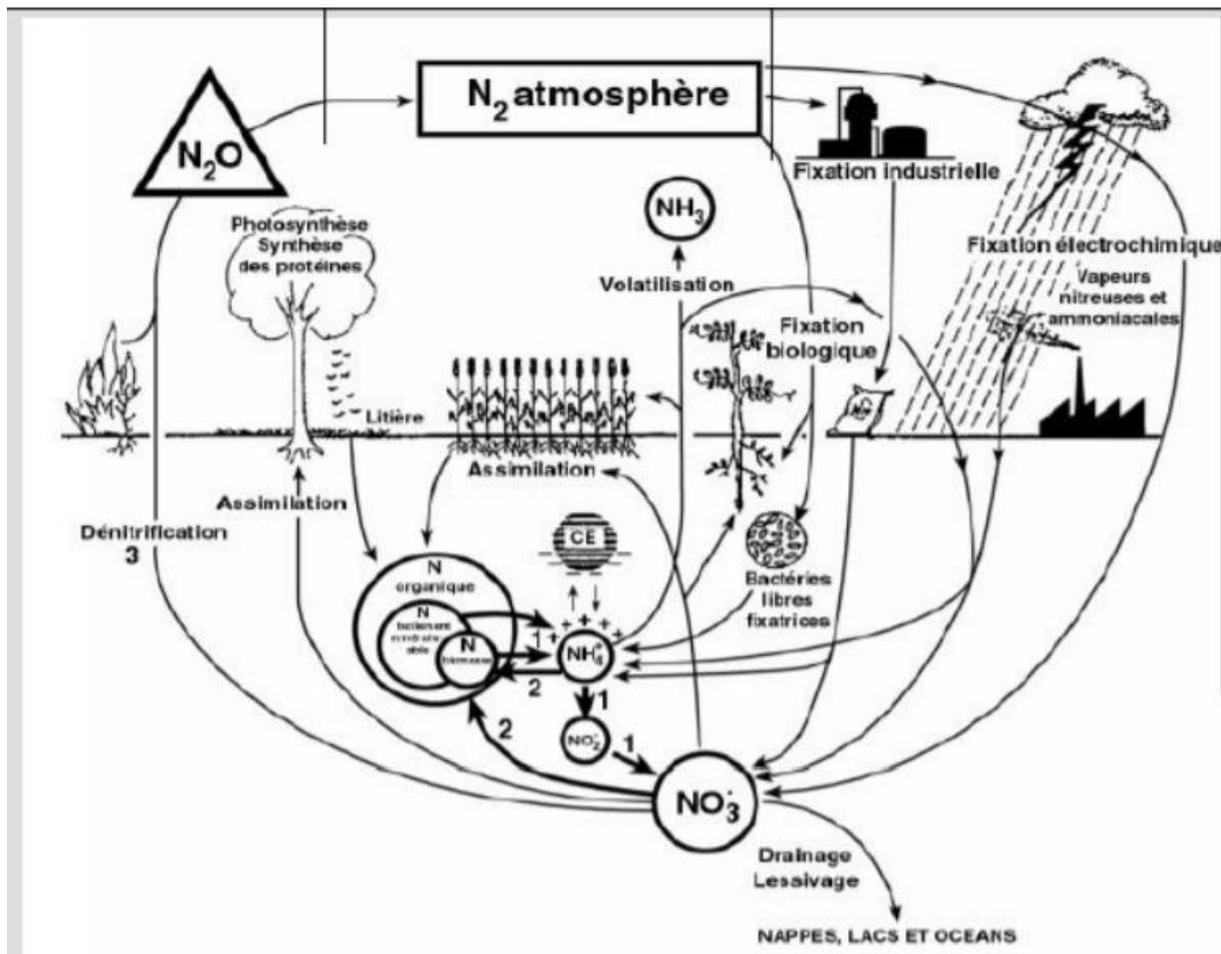
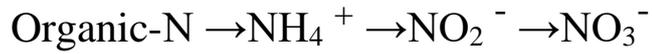


Figure 4 : Cycle d'Azote (Mariotti. A. (1982))

I-5-5 : le traçage de la pollution par les isotopes :

Pour tracer la pollution par les isotopes on se base sur le rapport isotopique des isotopes de nitrates chaque source d'azote dans l'environnement a une signature précise. Les nitrates atmosphériques ont des compositions isotopiques très variables avec Compris entre -15 et +15 ‰, et $\delta^{18}\text{O}-\text{NO}_3$ allant de +23 à +100 ‰.

- **Les engrais synthétiques :**

Fabriqués par procédés industriels à partir de l'azote atmosphérique dont la signature isotopique est $\delta^{15}\text{N} = 0$ ‰. Ainsi les signatures isotopiques de l'azote de ces fertilisants de synthèse sont également proches de $\delta^{15}\text{N} \sim 0$ ‰, variant généralement entre -4 à +4 ‰, avec des valeurs extrêmes de -8 et +7 ‰. Les engrais nitrates ont généralement des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ supérieures à celles des engrais à base d'ammonium. L'oxygène des engrais nitrates étant principalement dérivé de $^{18}\text{O}_2$ atmosphérique ($\delta^{18}\text{O} \sim +23,5$ ‰), ces engrais ont des valeurs de $\delta^{18}\text{O}$ allant de +17 à +25 ‰.

- **Les engrais organiques :**

Les engrais organiques (lisiers, fumiers ...), présentent généralement des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ plus élevées et une gamme de compositions isotopiques beaucoup plus large que les engrais minéraux. Des valeurs supérieures à 30 ‰ ont été mesurées localement, à rattacher à des conditions environnementales influençant la volatilisation de l'ammoniac, déterminant ainsi les degrés d'enrichissement en ^{15}N des nitrates formés.

- **Les eaux usées :**

Les rejets d'eaux usées domestiques (fuites de fosses septiques ou rejets de stations d'épuration) ont des signatures isotopiques en $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{18}\text{O}$ des nitrates similaires aux engrais organiques. Il est donc impossible de distinguer isotopiquement (sur la base des seuls isotopes N et O des NO_3 les nitrates dérivés de déchets humains et d'animaux.

- **L'azote du sol :**

La plupart de l'azote du sol est présent sous forme organique et n'est pas directement disponible pour les plantes. L'azote inorganique dissous, principalement sous forme de nitrates (NO_3) représente environ 1 % de l'azote

des sols. La signature isotopique en azote des nitrates du sol peut varier entre $\delta^{15}\text{N-NO}_3 = -10$ et $+15$ ‰, la majorité des valeurs sont cependant dans la gamme $\delta^{15}\text{N-NO}_3 = +2$ à $+5$ ‰. Et dans la dénitrification, l'ammonium résiduel de l'échantillon augmente en ^{15}N tandis que le nitrate produit est appauvri en ^{15}N .

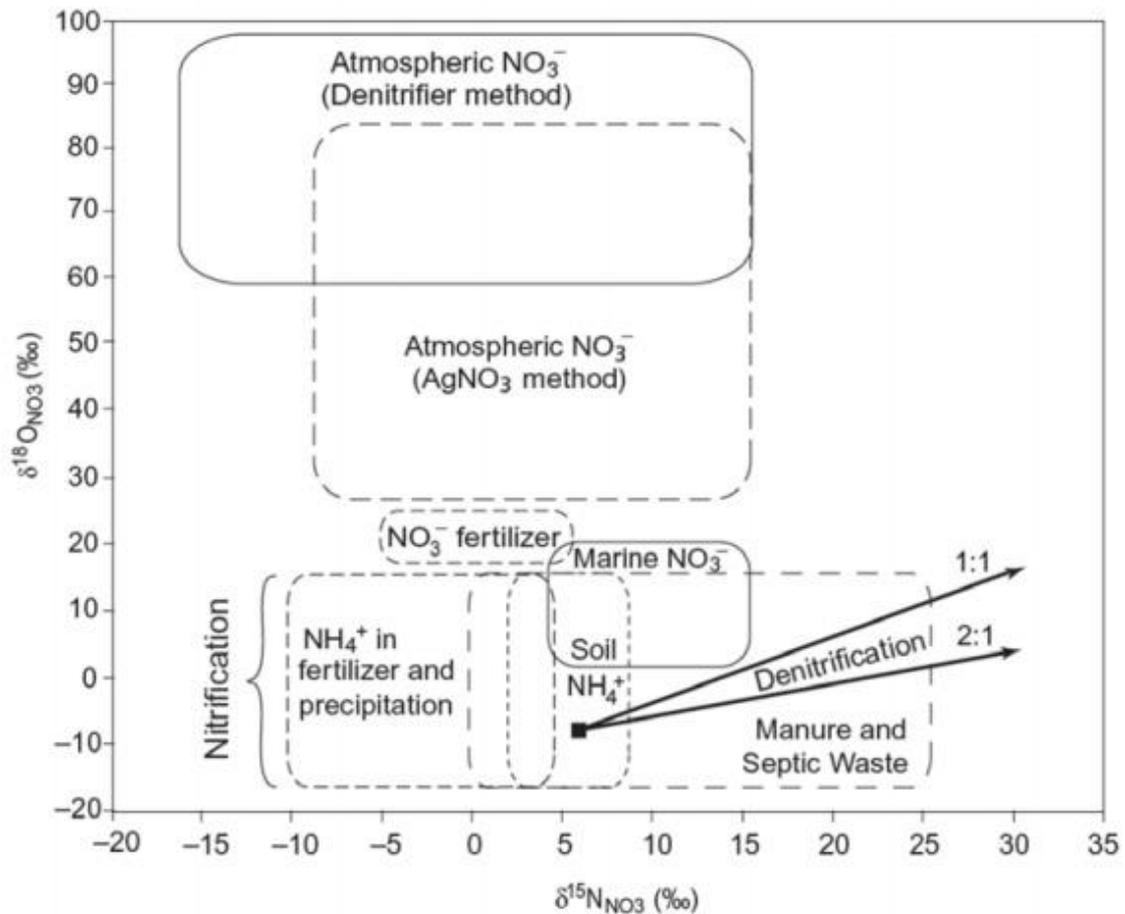


Figure5: Distribution de $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{18}\text{O}$ de différentes sources potentielles des nitrates, (Kendall et al.,2008).

CHAPITRE II : MATERIEL **ET METHODES**

II-1 : Echantillonnage :

*Matériels utilisés :

- Flacons de 40ml
- Seringues de 50ml
- Récipient HDPE
- Filtres (0,21um) à seringue stériles
- Glacière



Figure6 : exemple des flacons, seringues 50ml, filtres (0.21um) à seringue stériles

*Méthodes :

Les échantillons ont été prélevés à partir de plusieurs Oueds de la royaume selon le protocole ci-dessous :

Étape1 : Collecter des échantillons à l'aide d'un Récipient HDPE propre attaché à une perche, ce qui permet d'accéder à des eaux plus profondes



Étape2 : Recueillir l'eau de surface à une profondeur de 10-20 cm



Étape3 : Remplissez une seringue de 50 ml avec un échantillon d'eau . La seringue est bien remplie, car environ 50 ml d'eau seront nécessaires (environ 10 ml pour le rinçage et environ 40 ml pour remplir le flacon).



Étape4 : Attachez le filtre à seringue 0.21um à la seringue remplie d'eau.



Étape5: Ouvrir un flacon pré-nettoyé de 40ml



<p>Étape6 : Le flacon doit être rincé avec un échantillon d'eau filtrée . filtrer l'eau directement dans le flacon en poussant vers le bas sur le piston de la seringue . Remplir le flacon environ 1/4 avec de l'eau filtrée , remettre le bouchon et rincer le flacon une fois en secouant doucement et en tournant le flacon . Ouvrir le flacon et décanter l'eau .</p>	
<p>Étape7 : Conservez le flacon avec son échantillon d'eau dans la glacière</p>	
<p>Étape9 : Au retour au laboratoire local . Transférer les flacons dans le réfrigérateur pour les conserver jusqu'à leur expédition au laboratoire d'isotopes stables . (s'assurer que les flacons ne touchent pas les parois du réfrigérateur et qu'ils ne gèlent pas)</p>	

Tableau1 : Les étapes de prélèvement d'échantillons

II-2 : Préparations chimiques :

**Les réactifs :*

- * Titanium (III) chloride
- * 10 % HCl
- * Eau purifiée (eau dés ionisée dégazée)
- * Poudre de zinc

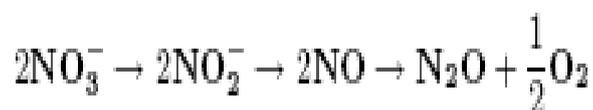
**Outils utilisés :*

- * Macro et micro-pipettes de volume variable (100ul, 1000ul, 5ml, 10ml)
- * Flacons
- * Bêchers

II-2-1 : Préparation de la solution du chlorure de Titanium (III) :

Production de N₂O PAR LA MÉTHODE DE TITANIUM :

Le principe de la technique 'DU TITANIUM' repose sur la conversion quantitative du nitrate (NO₃⁻) en protoxyde d'azote (N₂O) gazeux sans perte de son intégrité isotopique par la suite, selon la réaction suivante :



La solution du Titanium (III) se prépare 30mins avant la préparation des échantillons de nitrate :

- 1/ On prépare l'eau acidifiée : On ajoute 10ml d'HCl au 90ml d'eau purifiée.
- 2/ On mélange l'eau acidifiée (100 ml préparé) avec 30g du Titanium (III) après dissolution et on ajoute doucement 1g de poudre de Zn pour chaque 10ml, 10ml, donc 10g de Zn est utilisé pour la totalité de solution.
- 3/ Après l'obtention une réaction complète entre Zn et Ti(III) on laisse le mélange dans une chambre pendant 30mins, mué chaque 5-10mins.

II-2-2 : Préparation de la solution l'échantillon à analyser :

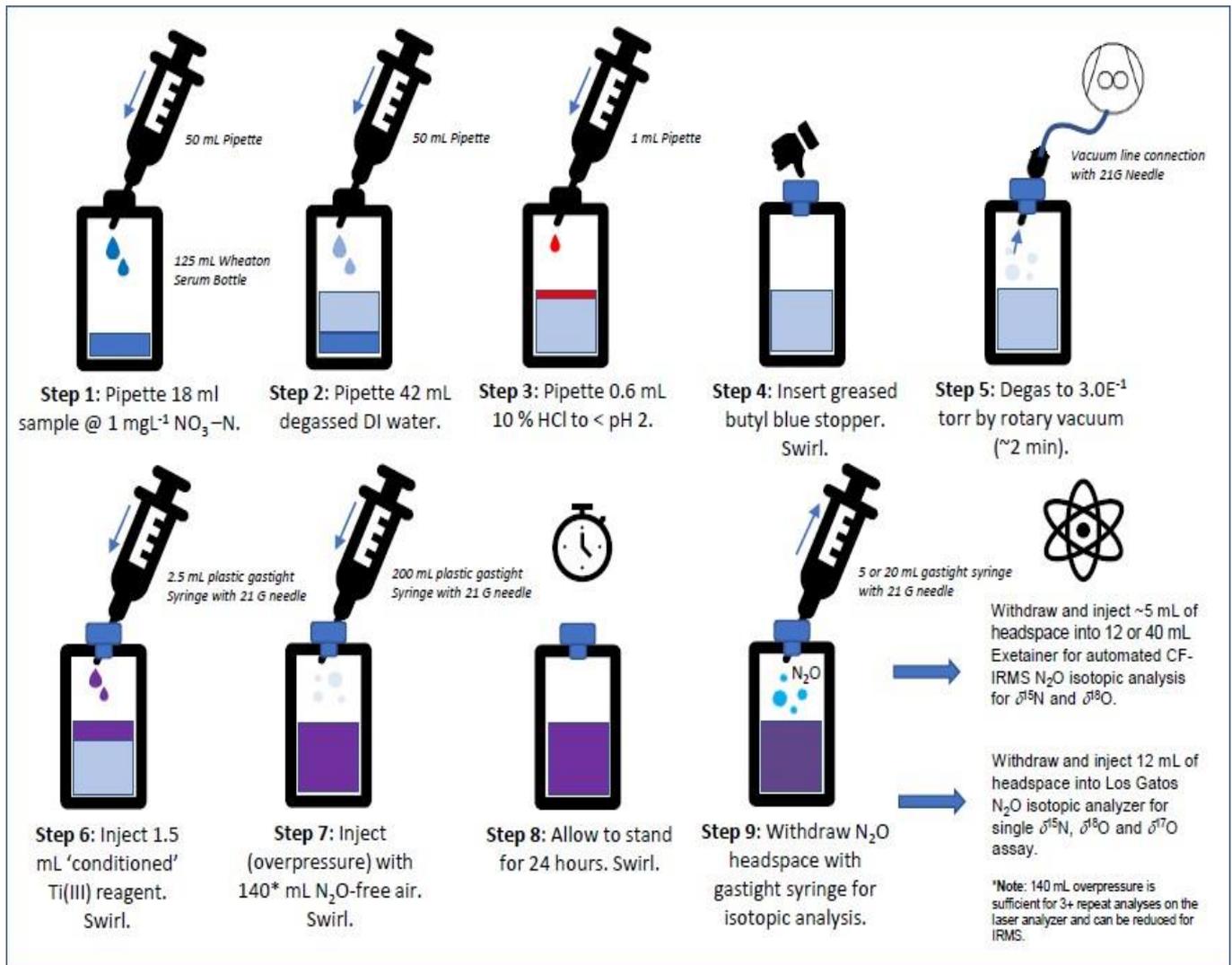


Figure7 : section présente les grandes lignes de la mesure de la composition isotopique du nitrate .

Tous les flacons en verre doivent être placés dans le plateau avec les bouchons ouverts.

Marquez les ID des échantillons sur les flacons. Un modèle prédéfini indiquant l'ensemble des échantillons d'eau, des échantillons d'air et des blancs doit être utilisé.

Ajouter deux grandes cuillères de HCl (0,4 g) dans chaque flacon. Remarque : Aucun sel n'est ajouté dans le(s) échantillon(s) d'air.

Ajoutez la quantité d'échantillon d'eau dans chaque cuvette comme calculé dans la feuille

Excel. Attention ! Aucune eau n'est ajoutée dans les échantillons d'air et le blanc.

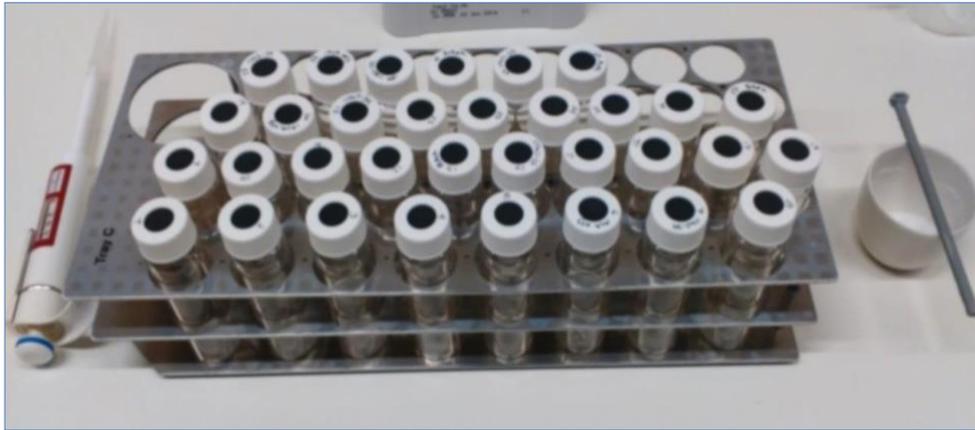


Figure8 : les flacons utilisés

Mettre les échantillons sous vide

Mettez en marche la pompe à vide dans la salle des nitrates.

Fixez l'aiguille à la pompe.

Assurez-vous que les flacons sont hermétiquement fermés.

Insérez doucement l'aiguille dans chaque flacon jusqu'à ce que la pression tombe approximativement à

$2,6 \times 10^{-1}$ mbar. Remarque : L'aiguille ne doit pas être insérée au milieu des septa mais près du bord.

Après environ 10 vacuum ou si la pression baisse très lentement, changez l'aiguille



Figure9 : pompe à vide de rotary

Introduction au Titane

Placez le plateau avec les flacons enrichis en N_2O dans la hotte.

Portez des gants et un manteau en nitrile pour des raisons de sécurité.

Videz une quantité suffisante de chlorure de titane(III) dans un bécher.

Remplissez une seringue de 5 ml avec 3-4 ml de chlorure de titane (III).

Insérez l'aiguille près du bord des septa de chaque flacon jusqu'à quelques millimètres et avec une pente d'environ 45°, de sorte que l'aiguille touche le côté du flacon. Injecter le chlorure de titane(III) doucement de façon à ce qu'aucune bulle ne soit libérée. Ne pas injecter le titane dans les échantillons d'air, mais seulement dans les échantillons et les blancs. Laisser les flacons dans la hotte pendant la nuit.

Les échantillons sont prêts à être mesurés dans l'IRMS.



Figure10: La solution de Titanium et échantillons à analysé

Injection de N₂O :

Fixer une aiguille dans la seringue qui se connecte au flux de gaz N₂O.

La valve d'arrêt à 3 voies doit être tournée en position fermée à l'aiguille.

Ouvrez doucement la valve de gaz N₂O. Un petit tour de la valve suffit.

Le plongeur commence à reculer. Tournez la vanne d'arrêt en position ouverte sur l'aiguille et videz la seringue une fois. Tournez la valve en position fermée jusqu'à l'aiguille et laissez la seringue se remplir de N₂O jusqu' 100 ml.

Tournez le robinet en position ouverte à l'aiguille et insérez l'aiguille dans le flacon, tout en injectant le N₂O en poussant le piston doucement, jusqu'à ce que le piston cesse de bouger. Remarque : L'aiguille ne doit pas être insérée au milieu des septa mais près du bord.

Retirer l'aiguille du flacon et tourner la valve en position fermée à l'aiguille et laisser la seringue se remplir de N₂O jusqu'à 100 ml.

Répéter le même processus pour tous les échantillons, y compris les blancs, mais pas pour le ou les échantillons d'air. Évacuer la seringue et mettre la vanne d'arrêt en position fermée. Fermez la vanne de gaz N₂O.



Figure11 : Les étapes d'injection N₂O

II-3 : Analyses des échantillons par la spectrométrie de masse à rapport isotopique :

Le CNESTEN dispose de :

- Spectromètre de masse à isotopes stables Delta Plus V,
- Gaz Bench II couplé au spectromètre de masse,
- Ligne d'analyse de l'azote 15, l'oxygène 18

II-3-1 : Définition du spectrométrie de masse :

La spectrométrie de masse à rapport isotopique (IRMS, pour isotope-ratio mass spectrometry) est une spectrométrie de masse avec laquelle il est possible de mesurer l'abondance relative des différents isotopes d'un même élément chimique dans un échantillon donné. Cette technique est utilisée pour mesurer les rapports n'impliquant que des isotopes non radiogénique : $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ etc.

il y a plusieurs techniques utilisées pour la détermination des rapports isotopique comme : Laser et la chromatographie..., mais la technique la plus efficace, la plus précise et la mieux développée c'est la spectrométrie de masse.

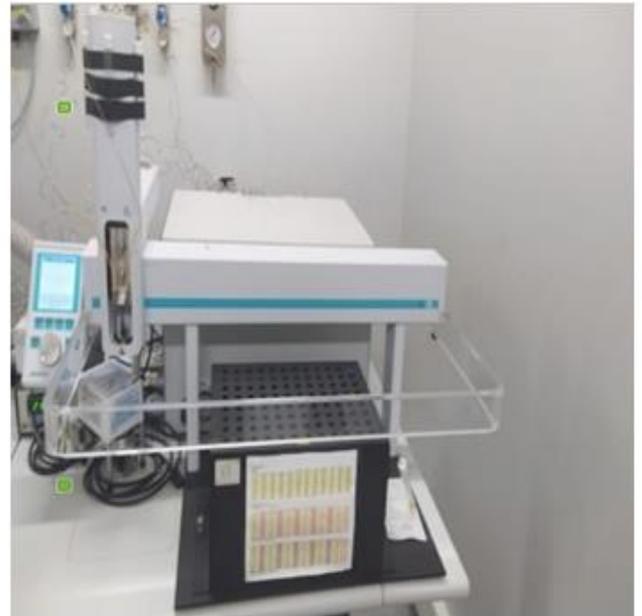


Figure12 : Dispositif analytique

II-3-2 : Mesures isotopiques de N₂O par IRMS

L'analyse du N₂O produit par les bactéries dans un volume fermé (20 ml) est réalisé à l'aide d'une technique automatisée 'en ligne', au cours de laquelle l'échantillon subit une série d'opérations tout en étant transporté d'une étape à l'autre dans un flux d'hélium, sans interruption manuelle de la chaîne d'analyse.

Le contenu du flacon de 20 ml est balayé et récupéré par un flux d'hélium pendant 15 minutes. Le gaz extrait est envoyé vers une série de pièges qui permettent de purifier le N₂O et de retirer successivement les traces d'air, de vapeur d'eau, une partie du CO₂ et des composés organiques volatils. À ce stade, il ne reste plus que du N₂O qui est envoyé dans un tube en or chauffé à 900 qui permet de décomposer ce gaz en N₂ et O₂.

Une colonne chromatographique en phase gaz sépare, enfin ces deux gaz ce qui permet de les envoyer successivement vers le spectromètre de masse pour la mesure des enrichissements isotopiques.

Lors d'une mesure d'échantillon on obtient le spectrogramme. Les trois premiers pics correspondent aux valeurs des trois standards d'oxygène. Ensuite, il y a la valeur du pic d'oxygène puis du pic d'azote et ensuite les valeurs des trois standards d'azote.

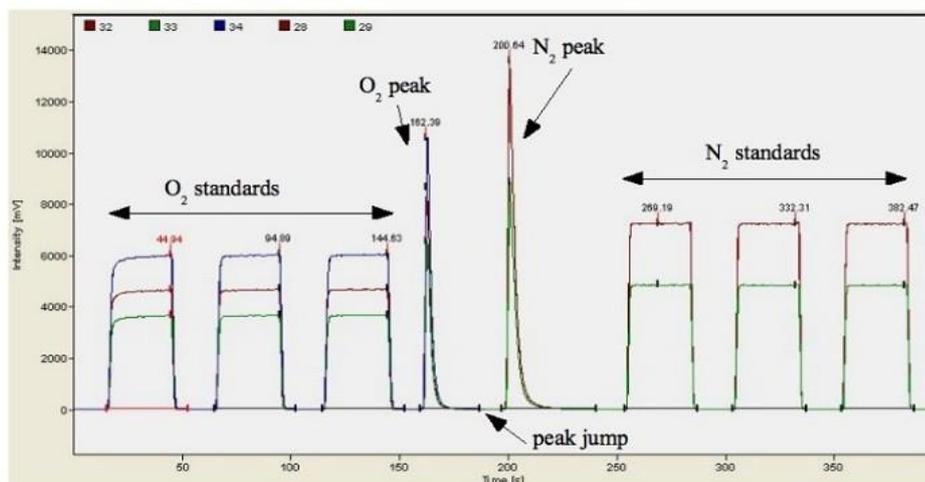


Figure13: Spectrogramme typique obtenu lors de l'analyse d'un échantillon de N₂O.

Les 3 pics de Standards que l'on observe sont des standards internes au spectromètre à ne pas confondre avec les standards externes (dont on connaît la composition isotopique) .

Les étapes suivantes présentes le fonctionnement de l'IRMS :

1. Échantillon sous Forme gazeux
2. Introduction dans la chambre d'ionisation
3. Ionisation par impact électronique (1 ion/300 molécules)
4. Accélération des ions
5. Séparation suivant m/e par électro-aimant
6. Mesure des courants ionique (~ nA au pA) et amplification par cage de faraday.

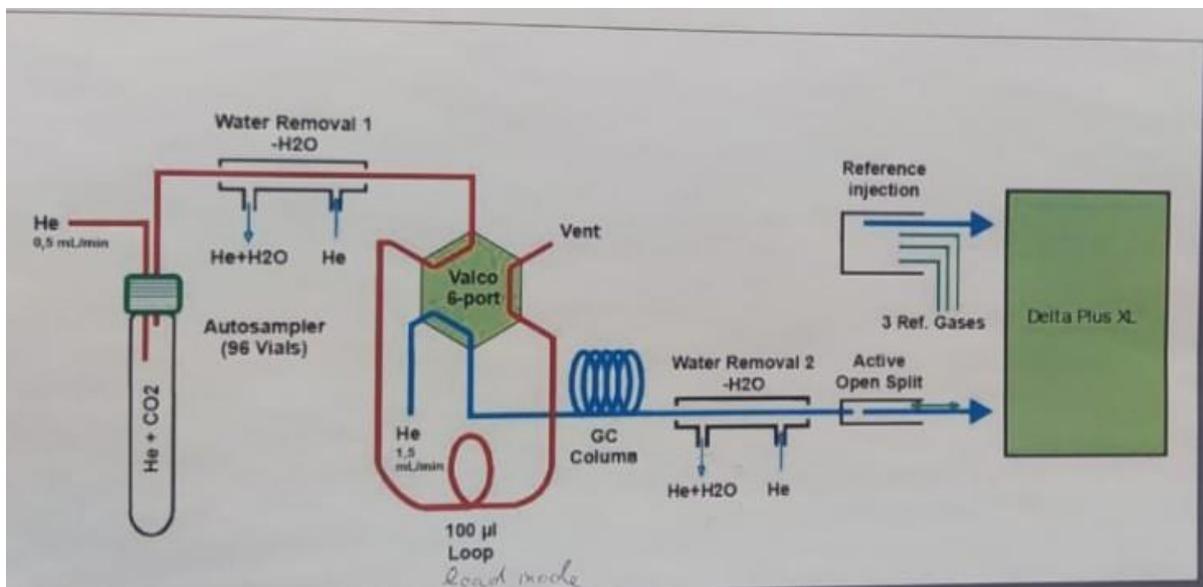


Figure14 : Les étapes de fonctionnement de l'IRMS

II-3-3 : Calibration des différents valeurs isotopiques :

Les différentes étapes de l'analyse de N₂O par cette méthode induisent un certain nombre de fractionnements isotopiques (bactéries, micro fuites sur le système, dérive de la ligne de base, variation de sensibilité du spectromètre...). Pour s'en affranchir, à chaque fois que nous procédons à une série de tests sur des échantillons, nous testons aussi des standards isotopiques. Ces standards ont des compositions isotopiques parfaitement connues et ils nous permettent de remonter aux vraies valeurs des compositions de nos échantillons.

En corrélant les valeurs théoriques des compositions isotopiques des standards avec celles mesurées nous obtenons une équation qui permet à partir de

de nos mesures de retrouver les valeurs « réelles » isotopiques des standards. Ce facteur de corrélation étant constant au cours de l'expérience, celui-ci nous permet de recalculer les valeurs « correctes » de nos compositions, pour tous nos échantillons, et qui sont les valeurs calibrées.

Les standards isotopiques de nitrate utilisés sont des standards internationaux types avec des valeurs isotopiques bien caractéristiques. Le standard A correspond à USGS 35 pur, le standard E correspond à USGS 34 pur, et les B, C, D correspondent aux compositions intermédiaires (25%, 50% et 75% de USGS 34, respectivement).

II-3-4 : Incertitudes sur la mesure de $\delta^{17}\text{O}$, $\delta^{18}\text{O}$, $\Delta^{17}\text{O}$, et $\delta^{15}\text{N}$

Incertitudes sur les mesures de $\delta^{17}\text{O}$, $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{17}\text{O}$, et $\delta^{15}\text{N}$ sont ainsi directement liées aux incertitudes sur mesure des standards externes. Nous définissons l'incertitude sur $\Delta^{17}\text{O}$ (par exemple) comme l'écart-type des résidus à la calibration des standards : $\sigma(\Delta^{17}\text{O}_{\text{calibré}} - \Delta^{17}\text{O}_{\text{standard}})$, il correspond à la différence entre la valeur calibrée et la valeur théorique des standards. Plus nos mesures sont précises, plus la valeur de cette différence est proche de zéro.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III-1 : Un exemple des résultats de données :

Un cas d'étude a été proposé afin de se familiariser avec l'interprétation des différentes données isotopiques et également pour qu'on puisse identifier les sources de la pollution par nitrates.

Ce projet contient des échantillons souterraines et de surface, mais dans cet on a opté que pour ceux souterraines.

ID d'échantillon	<u>Elevation (m asl)</u>	Type	$\delta^{15}\text{N}-\text{NO}_3$	$\delta^{18}\text{O}-\text{NO}_3$ (VSMOW)
A1	220	Puits	13.2	7.6
A2	126	Puits	10.5	5.9
A3	111	Puits	13.4	6.6
A4	132	Puits	8.7	5.3
A5	98	Puits	17.6	9.2
A6	75	Puits	6.4	2.9
A7	81	Puits	7.1	3.1
A8	46	Puits	10.5	2.8
A9	27	Puits	19.3	11.2
A10	352	Puits	13.4	5.6
A11	560	Puits	17.8	7.2
A12	150	Puits	5.6	7,8
A13	312	Puits	21.3	5.1
A14	94	Puits	7.2	6,3
A15	85	Puits	7,3	4.3
A16	19	Puits	11.1	2.7

Tableau2 : les résultats de l'analyse des isotopes stables des nitrates.

L'analyse se concentre uniquement sur les échantillons pour lesquels la concentration en nitrates est suffisamment élevée pour permettre une bonne quantification des isotopes.

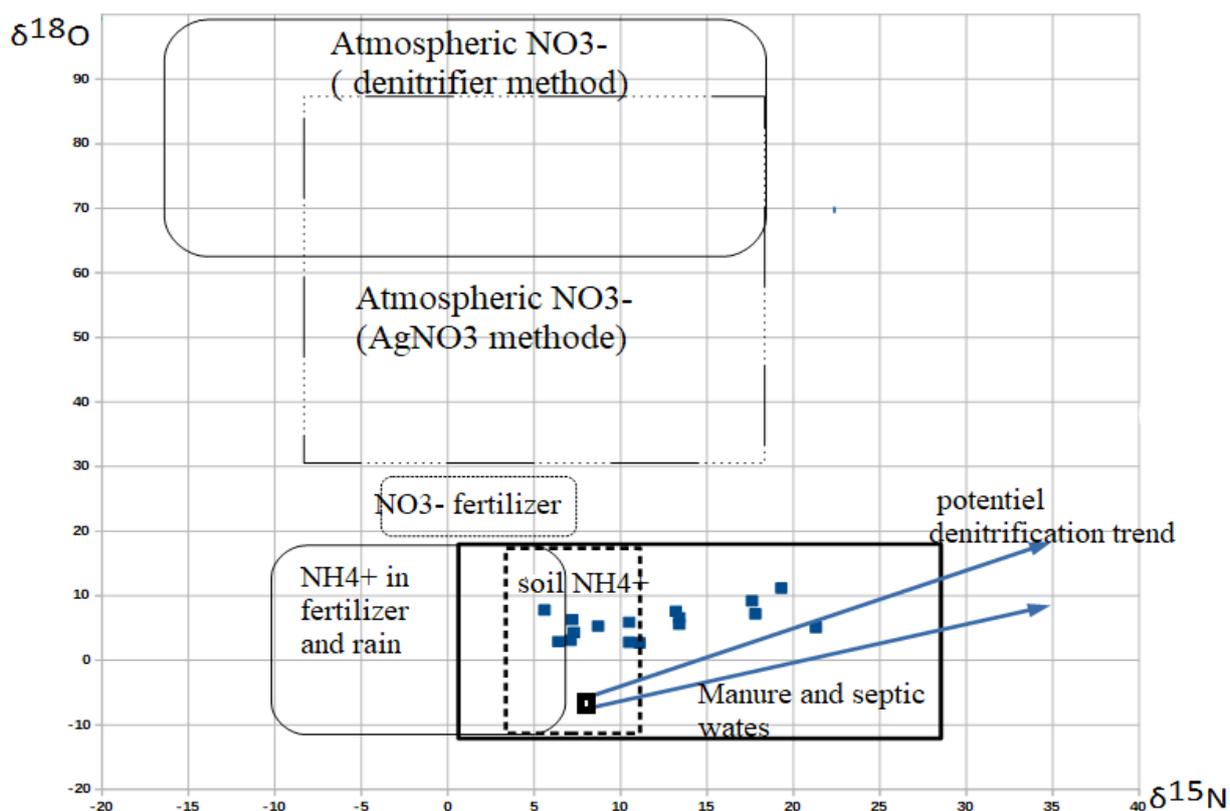


Figure 15 : Source de potentiel des nitrates dans l'exemple analysé

III-2 : discussion des résultats

Dans cet exemple on remarque que les points de nuages sont concentrés dans les zones où le sol est riche en NH_4^+ (ammonium) qui transforme par la suite en nitrates par les micro-organismes. On trouve aussi quelques points dans la zone de fumier et les fosses septiques, les eaux usées. On constate que l'origine de la pollution des eaux souterraines par les nitrates dans cette zone vient des eaux usées et la présence du NH_4^+ dans le sol en grande quantité.

Conclusion générale :

On conclut que l'application de la méthode isotopique nous a permis à mieux comprendre d'où la pollution des eaux par les nitrates à l'aide de L'IRMS .

Les résultats d'un cas d'étude que nous avons adopté, nous a aidé à déterminer l'origine de la pollution par les nitrates . Dans ce cas on a trouvé que l'origine de cette pollution sont des zones du fumier et les fosses septiques.

Le stage que nous avons effectué au CNESTEN nous a permis d'apprendre et de s'initier dans l'utilisation de ces outils isotopiques aussi bien d'un point de vue analytique que d'interprétation.

La méthode d'analyse des nitrates, développée au CNESTEN permet :

- l'analyse d'une faible quantité de nitrate (100nmol),
- la mesure simultanée des trois compositions isotopiques du nitrate : ^{17}O , ^{18}O et ^{15}N ,
- une analyse rapide (28 minutes par échantillon), en ligne et automatisée.

La méthode DU TITATIUM permet également de travailler sur des échantillons fortement concentrés en HCl . Afin de garantir la bonne calibration de cette méthode, il est primordial de connaître la concentration en nitrate

Références bibliographiques :

- Adam, J. W. H.** (1980) Health aspects of nitrate in drinking-water and possible means of denitrification. *Water SA*, 6: 79
- Bougherara, H.**(2015) La biodégradation par culture mixte en réacteur batch .Thèse de master.Université mentouri constantine.
- **Clark, I., Fritz, P.** (1997): *Environmental isotopes in hydrogeology*. New York.
- **Etcheverry, D.** (1997). Valorisation des méthodes isotopiques dans la pratique de l'hydrogéologie(oxygène-18, deutérium, tritium). Rapport interne du GEOLEP (EPF de Lausanne) pour le Service hydrologique et géologique national, Berne.
- **Etcheverry, D., Parriaux, A.** (1998) : Les méthodes isotopiques dans la pratique de l'hydrogéologie.In : *Gas–Wasser–Abwasser 1/98:10–17*, Zürich
- Gat, J.R.**, Oxygen and hydrogen isotopes in the hydrologic cycle, *Annual Rev. Earth Planet. Sci.* 24 (1996) 225-262
- Heaten T.H.E.** (1986) Isotopic studies of nitrogen pollution in the hydrosphere and atmosphere: A review. *Chem. Geology*, 59, 87-102.
- Kendall, C., E.M. Elliott and S.D. Wankel.** 2008. *Tracing Anthropogenic Inputs of Nitrogen to Ecosystems. Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*. Blackwell Publishing Ltd. p. 375-449.
- La pollution de l'eau, par le comité de recherche et de sensibilisation d'Eau Secours ! Novembre 2006.
- Mathieu. S.** Thèse de doctorat de l'université PARIS VI « utilisation du traçage isotopique naturel pour caractériser et quantifier les processus de nitrification et dénitrification à l'échelle du réseau hydrographique de la sienne ».
- Mariotti. A.** (1982) Apport de la géochimie isotopique à la connaissance du cycle de l'azote. Thèse, Paris, Univ. P. et M. Curie, 510 P. (G 8938).
- Services d'analyse des nitrates de Beta Analytic.
- SMITH,A.**(2015) Fingerprinting Sources of environmental Pollution Using stable Isotopes,3:4.
- Shoun, H, Kim D.H, Uchiyama H et Sugiyama J** (1992) Denitrification by fungi. *FEMS Microbiology letters*, 94,277-282.
- spectrometry – history and terminology in brief », *Drug testing and analysis*,2008.
- Van Dongen, LGJM, Jetten MSM, Van Loosdrecht MCM.** (2001 a) The combined Sharon/Anammox process. A sustainable method for N-removal from sludge water. 1èreed London: STOWA. (STOWA, ed. *Water and wastewater*

Practitioner Series)

-Zhang, Y.; Li, F.; Zhang, Q.; Li, J.; Liu, Q. Tracing nitrate pollution sources and transformation insurface- 4and ground-waters using environmental isotopes. Sci. Total Environ. 2014, 490, 213–222

webo-graphie :

-Le centre d'information sur l'eau (https://www.cieau.com/espace-enseignants-et-jeunes/les-enfants-et-si-on-en-apprenait-plus-sur-leau-du-robinet/cycle-de-leau/).

- L'utilisation des isotopes pour caractériser l'origine des pollutions dans les eaux souterraines :<https://hal-brgm.archives-ouvertes.fr/hal-0094>
<http://www.bretagne-environnement.org/Eau/Les-pollutions-et-menaces/Nitrates/Effets-des-nitrates-sur-la-sante-et-l-environnement.8005>.

- Services d'analyse des nitrates de Beta Analytic.<https://www.betalabservices.com/francais/eau/nitrates.html>