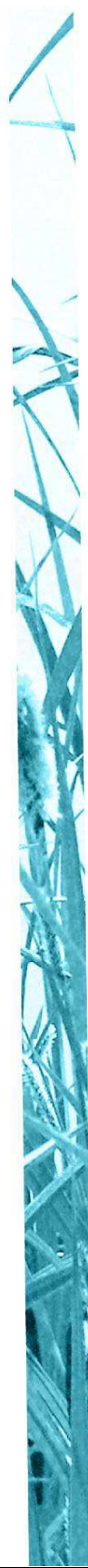


Partenariat 2013 - 2015– Domaine L'eau en espace urbanisé
Action 46 : Les Zones de Rejet Végétalisées (ZRV)
Sous-action 3 : Les ZRV de type « bassin » : suivi du site de Marguerittes (30)

A vertical decorative image on the left side of the page shows a close-up of reeds or grasses in shades of blue and green.

Protocole détaillé du prélèvement de biomasse végétale en zone de rejet végétalisée

Rôle du compartiment végétal au sein de la zone de rejet végétalisée de type « bassin » de Marguerittes (30)

Rapport final

Hélène GUERREIRO (Irstea Villeurbanne)
Vincent BERTRIN (Irstea Bordeaux)
Marina COQUERY (Irstea Villeurbanne)
Catherine BOUTIN (Irstea Villeurbanne)

Décembre 2015

- **AUTEURS**

Hélène GUERREIRO, Ingénieure (Irstea Lyon-Villeurbanne), helene.guerreiro@irstea.fr

Vincent BERTRIN, Ingénieur (Irstea Bordeaux), vincent.bertrin@irstea.fr

Marina COQUERY, Directrice de recherche (Irstea Lyon-Villeurbanne), marina.coquery@irstea.fr

Catherine BOUTIN, Ingénieure (Irstea Lyon-Villeurbanne), catherine.boutin@irstea.fr

- **CORRESPONDANTS**

Onema : Estérelle VILLEMAGNE, Direction de l'Action Scientifique et Technique (Onema),
Esterelle.villemagne@onema.fr

Irstea : Catherine Boutin, Ingénieure (Irstea), catherine.boutin@irstea.fr

Droits d'usage : accès libre

Niveau géographique : national

Couverture géographique : national

Niveau de lecture : professionnels

	Protocole détaillé du prélèvement de biomasse végétale en zone de rejet végétalisée – Rôle du compartiment végétal au sein de la zone de rejet végétalisée de type bassin de Marguerittes (30) Rapport final Hélène GUERREIRO (Irstea) Vincent BERTRIN (Irstea) Marina COQUERY (Irstea) Catherine BOUTIN (Irstea)	
---	---	---

• RESUME

Les zones de rejet végétalisées (ZRV) sont des structures aménagées entre le rejet de la station de traitement des eaux usées et le milieu récepteur. Ces constructions s'inspirent du processus d'auto-épuration naturel basé sur l'interaction des compartiments eau-sol-plante. Les ZRV sont des infrastructures proposées pour prodiguer un espace de protection supplémentaire avant l'arrivée des eaux traitées dans le milieu récepteur de surface.

L'évolution de ces installations et l'efficacité des ZRV sont difficilement appréciables. Néanmoins, il convient d'étudier leur fonctionnement et d'évaluer scientifiquement leurs capacités réelles de traitement des polluants majeurs et des micropolluants sur le long terme. Dans ce cadre, il est important de déterminer le rôle du compartiment végétal et donc de définir au préalable une méthodologie de prélèvement adaptée aux ZRV.

Ce document présente le protocole expérimental de prélèvement et de préparation des végétaux, développé et testé pour une application à la ZRV de type « bassin » de Marguerittes (30). Les objectifs de ce protocole sont d'effectuer des estimations quantitatives de la biomasse végétale totale à l'échelle de la ZRV et de la biomasse exportable lors des opérations d'entretien du site, et de réaliser des analyses de certains paramètres chimiques dans les tissus végétaux prélevés.

Potentiellement applicable à d'autres ZRV du même type, sous réserve d'une validation, il consiste principalement en des prélèvements et traitements de macrophytes émergés, de macrophytes à feuilles flottantes et de macrophytes submergés, dans un milieu où la profondeur permet d'effectuer des récoltes à la main sur l'ensemble de la colonne d'eau.

Ce document présente également, à titre d'exemple, les travaux réalisés sur la zone de rejet végétalisée de type « bassin » de Marguerittes (30) lors d'une campagne de prélèvements réalisée en octobre 2015.

• MOTS CLES (THEMATIQUE ET GEOGRAPHIQUE)

Biomasse, macrophyte, prélèvement, protocole, zone de rejet végétalisée, nutriments, micropolluants.

	Protocole détaillé du prélèvement de biomasse végétale en zone de rejet végétalisée – Rôle du compartiment végétal au sein de la zone de rejet végétalisée de type bassin de Marguerittes (30) Rapport final Hélène GUERREIRO (IIRSTEA) Vincent BERTRIN (IIRSTEA) Marina COQUERY (IIRSTEA) Catherine BOUTIN (IIRSTEA)	
---	---	---

- **ABSTRACT**

Planted Discharge Areas (PDA) are constructions which are based on the natural self-purification process provided by the interaction of water-soil-plant compartments. PDA are defined as structures located between the wastewater treatment plant and the receiving environment. They provide additional spaces for protection before the arrival of treated water in the receiving environment. The evolution and efficiency of PDA are difficult to evaluate. Nevertheless, their benefits and real capacities of treatment of pollutants in the long term should be studied and scientifically evaluated.

In this context, it is important to define the role of the vegetation and to provide sampling procedures adapted to PDA.

This document describes an experimental protocol for sampling and preparation of emergent macrophytes, macrophytes with floating leaves and submerged macrophytes, in shallow water. It was developed and tested on the site of Marguerittes (France, 30), a PDA "basin" type.

This methodology leads to a quantitative estimation of the total plant biomass across a PDA, and to the evaluation of the exportable biomass provided through maintenance operations. Another main goal is the realization of chemical analysis on plant's tissues collected.

This protocol is in theory applicable to other PDA types, but it requires a prior validation in case of necessary adaptations. This document also describes, as an illustration, the work done on PDA of Marguerittes during a sampling campaign conducted in October 2015.

- **KEY WORDS (THEMATIC AND GEOGRAPHICAL AREA)**

Biomass, macrophyte, sampling, protocol, sub-surface flow Constructed Wetland, nutrient, micropollutants.

Sommaire

1. Introduction	7
1.1 Définition d'une zone de rejet végétalisée	7
1.2 Rôle du compartiment végétal	8
1.3 Entretien des ZRV	8
1.4 Méthodologie d'évaluation des ZRV	8
2. Domaine d'application	9
2.1 Objectifs	9
2.2 Groupes végétaux étudiés	9
2.3 Méthodologie.....	10
2.4 Limites d'application	10
3. Prélèvement de la biomasse végétale : méthode des quadrats (<i>in situ</i>).....	10
3.1. Macrophytes à feuilles flottantes.....	11
3.2. Macrophytes submergés	12
3.3. Macrophytes émergés (biomasse aérienne)	13
3.4. Macrophytes émergés (biomasse immergée).....	14
4. Conditionnement des prélèvements de macrophyte	15
4.1. Conditionnement et consignes d'étiquetage	15
4.2. Transport et conservation des prélèvements	15
5. Préparation des prélèvements pour une estimation de la biomasse végétale	16
5.1. Application aux macrophytes à feuilles flottantes et submergés.	17
5.2. Application aux macrophytes émergés (biomasse aérienne).....	18
5.3. Application aux macrophytes émergés (biomasse immergée).....	19
5.4. Protocole de mesure du poids sec de la biomasse végétale.....	20
6. Adaptation de la préparation des prélèvements pour analyses de paramètres chimiques.....	20
6.1 Sélection d'un échantillonnage de biomasse végétale en vue d'analyses chimiques.....	21
6.2 Séchage	21
6.3 Broyage	22
6.4 Conditionnement avant analyse	22
7. Cas d'application : travaux réalisés lors de la campagne d'octobre 2015...	23
7.1 Présentation du site de Marguerittes.....	23
7.2 Campagne d'octobre 2015 : volet végétal	23
7.2.1 Espèces étudiées	24
7.2.2 Organisation des prélèvements.....	24
7.2.3 Préparation des prélèvements réalisés à Marguerittes en octobre 2015	25
8. Conclusion.....	27
9. Glossaire.....	28
10. Bibliographie	28
Annexes.....	30

Annexe I : Liste du matériel nécessaire pour réaliser des prélèvements de végétaux sur une ZRV en vue de l'estimation de la biomasse exportable.....30

Annexe II : Exemple de tableur de traitement des données de séchage et d'estimation de biomasse.	31
Annexe III: Organisation des travaux réalisés lors de la campagne d'octobre 2015 sur la ZRV de type bassin de Marguerittes (30).....	32

Protocole détaillé du prélèvement de biomasse végétale en zone de rejet végétalisée – Rôle du compartiment végétal au sein de la zone de rejet végétalisée de type « bassin » de Marguerittes (30)

1. Introduction

Le développement des connaissances sur le fonctionnement des zones humides et des écosystèmes aquatiques a permis de mettre en lumière les services écosystémiques qu'ils produisent. Leurs capacités d'épuration ont inspiré, depuis plus d'une dizaine d'années, la création et le développement de structures artificielles qui s'inspirent et tentent de reproduire le processus naturel d'auto-épuration en se basant sur l'interaction des compartiments eau-sol-plante.

1.1 Définition d'une zone de rejet végétalisée

Les zones de rejet végétalisées (ZRV) ont été définies par l'arrêté du 21 juillet 2015 (MEDD, 2015) comme étant : « un espace aménagé entre la station de traitement des eaux usées et le milieu récepteur superficiel de rejets des eaux usées traitées. Cet aménagement ne fait pas partie du dispositif de traitement des eaux usées mais est inclus dans le périmètre de la station ». La première ZRV française a été créée dans les années 80. Ces ouvrages se sont beaucoup développés depuis une dizaine d'années. En 2013, plus de 560 ZRV ont été recensées en France (Boutin, Prost-Boucle, 2013). Cependant, aucune instruction n'encadre leur mise en œuvre et leur dimensionnement.

Il existe différents types de ZRV (Figure 1). Suivant le contexte local, les ZRV sont mises en avant pour leurs principaux rôles attribués en matière d'hydrologie (amortissement des débits, lissage des flux, favorisation de l'infiltration), d'épuration, et de promotion de la biodiversité. Néanmoins, ce sont des structures indépendantes de la station d'épuration. De ce fait, leurs impacts ne sont pas pris en compte lors de l'établissement des seuils de qualité définissant le niveau de traitement des eaux assigné à la station d'épuration. Les ZRV sont donc présentées comme étant des infrastructures proposées pour prodiguer un espace de protection supplémentaire avant l'arrivée des eaux traitées dans le milieu récepteur, cependant la démonstration de leur potentialité reste à faire (Boutin, Prost-Boucle, 2012).

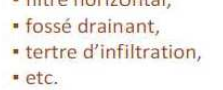
Sol en place (sol remanié ou non)			Sol reconstitué (matériaux rapportés)
Prairie	Bassin	Fossé	Autres
			
Sol relativement plat, sans surcreusement	Sol avec surcreusement, différence de niveau	Longueur très supérieure à la largeur	Exemples de matériaux : sables, graviers
			

Figure 1 : Les différents types de ZRV selon la classification EPNAC (atelier ZRV EPNAC, 2015).

1.2 Rôle du compartiment végétal

Certaines espèces végétales sont valorisées et utilisées pour leurs capacités d'assimilation des substances d'origine anthropique au sein de la biomasse produite (phyto-remédiation / phyto-épuration). Elles sont donc parfois présentées comme un élément potentiellement efficace sous réserve d'une exportation de matière organique et de polluants en dehors du système (ex : par récolte et faucardage).

Selon les constructions, la diversité végétale en ZRV peut être issue d'espèces présentes dans le milieu initial et/ou importées lors de l'aménagement. Ce milieu artificiel végétalisé, dont les bénéfices attendus sont donc nombreux, est cependant très dépendant de son évolution sur le long terme.

En ZRV, les attentes attribuées à la végétation sont donc très nombreuses et concernent plusieurs objectifs au sein de l'ouvrage et de nombreuses espèces aquatiques sont très employées en ZRV. Ces végétaux vont contribuer à une diversification des habitats, une augmentation de la surface de supports disponibles et bénéfiques au développement des micro-organismes. Les végétaux vont également aider à l'insertion appréciable de l'ouvrage dans le paysage, faciliter l'acceptation de la ZRV (et donc de l'ouvrage même de la station d'épuration) auprès de la population, et la mise en place d'outils de communication et de promotion de la biodiversité. La végétation est aussi une aide en matière d'hydrologie, puisque la biomasse végétale participe à la diminution de la vitesse de courant et au lissage des flux.

Pourtant toutes ces attentes sont à démontrer et à relativiser par rapport aux masses polluantes réellement introduites dans la ZRV (Membres de l'atelier ZRV du groupe de travail EPNAC, 2014). Effectivement, des attentes et questionnements se posent en matière de stockage des micropolluants et de polluants majeurs au sein des espèces végétales implantées en ZRV. Cet aspect, associé à des exports de matière hors du site, reste à nuancer et à étudier en mettant en place une méthodologie précise et adaptée.

1.3 Entretien des ZRV

Après la construction, le fonctionnement optimal d'une ZRV requiert des mesures d'entretien nécessaires et régulières (fauche et exportation de la végétation, curage des boues, gestion des espèces invasives, etc.). Elles vont permettre de minimiser les risques d'évolution spontanée vers un enrichissement progressif du système risquant d'outrepasser toute capacité épurative. Ceci augmenterait le risque de dégradation des eaux rejetées, altérant ainsi les bénéfices attendus, dans le cas de la mise en place d'une ZRV. Il est nécessaire que la qualité des eaux traitées préalablement par la station d'épuration ne se dégrade pas, à défaut de s'améliorer.

1.4 Méthodologie d'évaluation des ZRV

L'évolution et l'efficacité des ZRV sur le long terme est aujourd'hui difficilement appréciable. En effet, le suivi du fonctionnement des ZRV et l'évaluation de leurs avantages sont encore peu étudiés. Compte tenu du degré de développement important de ces aménagements, il convient d'étudier leur fonctionnement et d'évaluer rigoureusement et scientifiquement les capacités réelles des ZRV sur le long terme. C'est ce que s'emploie à réaliser Irstea dans le cadre de *l'action 46 du programme de recherche Irstea- ONEMA sur la période 2013-2018*.

Pour cela, les 4 types de ZRV (Cf. Figure 1) font l'objet d'études permettant d'évaluer le rôle respectif des compartiments : eau, sol et plantes grâce à un suivi régulier.

Déterminer le rôle du compartiment végétal requiert une réflexion scientifique en matière de méthodologie à appliquer en ZRV. Il s'agit ici de proposer un protocole dédié au prélèvement et à la préparation des végétaux aquatiques en zone de rejet végétalisée afin d'effectuer des mesures de biomasse et des analyses chimiques en laboratoire dans les tissus végétaux.

La structure du document est la suivante :

- A l'issue de la présente introduction, le chapitre 2 décline le contexte d'application de la proposition de protocole
- Les chapitres 3 à 4 présentent une proposition de protocole de prélèvement de la biomasse végétale en zone de rejet végétalisée.

- Les chapitres 5 à 6 présentent une proposition de protocole de préparation des prélèvements récoltés en vue d'une estimation de la biomasse végétale et de l'analyse de certains paramètres chimiques dans les tissus végétaux.

Ces propositions ont été développées et testées sur la zone de rejet végétalisée de type bassin de Marguerittes (30) entre 2014 et 2015.

- Le chapitre 7 présente, à titre d'exemple, les travaux relatifs au compartiment végétal, réalisés dans le cadre d'une campagne réalisée en octobre 2015.

L'interprétation des résultats acquis à la suite de la campagne d'octobre 2015 sur le site de Marguerittes fera l'objet d'un document ultérieur.

2. Domaine d'application

2.1. Objectifs

Ce document méthodologique s'applique à proposer un protocole de prélèvements de végétaux aquatiques et de leur préparation pour analyses au laboratoire de chimie, dans le contexte des ZRV de type « bassin ». Les travaux menés sur la zone de rejet végétalisée de Marguerittes (30) lors de la campagne de prélèvements d'octobre 2015 sont présentés à titre d'exemple.

Les objectifs de cette méthodologie de prélèvement ont été définis comme suit :

- Quantifier la biomasse végétale totale à l'échelle de la ZRV
- Quantifier la biomasse végétale exportable lors des opérations d'entretien de la ZRV
- Analyser certains paramètres chimiques (polluants majeurs et micropolluants) au sein d'échantillons de tissus de végétaux prélevés.

2.2. Groupes végétaux étudiés

Le terme de macrophyte est une appellation générale regroupant l'ensemble des plantes aquatiques visibles à l'œil nu. Le choix des espèces étudiées doit être fait en fonction de la couverture végétale sur le site. Le but étant de fournir une représentation significative de l'état de colonisation des végétaux sur le site lors de la période déterminée.

Les macrophytes peuvent être distingués, selon leur position au sein de la colonne d'eau, en s'inspirant d'une classification proposée par Brix en 1989 :

- Les macrophytes à feuilles flottantes sont des espèces se développant en surface de l'eau. Elles peuvent être enracinées (ex : *Nymphaea alba*) ou libres (ex : *Lemna minor*, *Azolla filiculoides*). Les espèces libres flottantes peuvent créer des nuisances dans les ZRV en raison de leur développement sur des surfaces importantes en bloquant l'arrivée de lumière dans la colonne d'eau.
- Les macrophytes submergés (ex : *Ceratophyllum demersum*, *Myriophyllum spicatum*) sont des espèces dont l'appareil végétatif se situe intégralement sous la surface.
- Les macrophytes émergés (ex : *Phragmites australis*, *Typha latifolia*), sont souvent employés pour l'aménagement des ZRV. Ces végétaux possèdent des tiges et feuilles aériennes, ainsi qu'un système racinaire se développant sur un substrat immergé. Elles sont particulièrement bien adaptées au milieu aquatique grâce à un important réseau d'espace lacunaire permettant la circulation de l'oxygène dans la plante, jusque dans les parties immergées et souterraines.

Pour estimer la production de biomasse végétale au cours de l'année, les prélèvements doivent être réalisés au printemps (mars /avril) et en automne (septembre/octobre) pour englober la période la plus favorable à la croissance des végétaux.

2.3. Méthodologie

L'utilisation des quadrats (cadres délimitant une surface connue, voir figure 2) est couramment employée en écologie végétale pour réaliser des observations et diverses mesures sur les plantes par unité de surface. Elle est notamment employée pour effectuer un recensement et/ou une estimation quantitative de la végétation dans une grande variété de milieux.

Dans le cadre d'une estimation de biomasse, les quadrats vont permettre de récolter les végétaux sur une surface connue et d'estimer à partir de plusieurs prélèvements la biomasse végétale de la zone étudiée, puis de la ZRV dans sa totalité.

Le nombre de quadrats à réaliser sur une zone d'étude doit être au minimum de 3. Les quadrats sont disposés dans des zones colonisées par la végétation de manière la plus homogène possible afin de représenter au mieux l'état de colonisation de la végétation du site étudié. Pour cela, une observation préalable de la végétation, de sa composition spécifique et de sa densité, doit être réalisée à l'échelle de la ZRV afin de définir le positionnement des quadrats.

Le choix de la taille du quadrat se fait en fonction de l'espèce étudiée. Dans le cas de macrophytes à feuilles flottantes et de macrophytes submergés, l'emploi de quadrat flottant de 30*30 cm est adapté. Pour des macrophytes émergés, la dimension du quadrat recommandée est de 50*50 cm.

La localisation de chaque quadrat doit être reportée sur une carte du site, les coordonnées GPS de la position des quadrats peuvent également être enregistrées.

2.4. Limites d'application

La méthodologie présentée dans ce document est majoritairement orientée vers l'estimation de la biomasse végétale et développée pour une application en ZRV de type bassin.

Ce protocole se concentre sur le prélèvement de :

- macrophytes à feuilles flottantes
- macrophytes submergés,
- macrophytes émergés

dans les zones de la ZRV où la profondeur permet d'effectuer des récoltes à la main sur l'ensemble de la colonne d'eau ($\leq 1\text{m}$).

Dans le cas où la profondeur est supérieure à 1 mètre, l'utilisation d'une embarcation est recommandée. Alors, l'utilisation d'un râteau pour les prélèvements est possible dans la mesure où il est manipulé de façon à ne pas récolter les plantes situées à l'extérieur du quadrat. Cette technique n'a pas été testée et devrait faire l'objet de tests supplémentaires dans l'avenir afin de définir au mieux ses modalités et son applicabilité.

Il est également important de prendre en considération que la variabilité obtenue lors des prélèvements sur site peut être importante. C'est particulièrement le cas lors de prélèvement de biomasse souterraine chez les macrophytes émergés dû à la difficulté d'extraction des rhizomes solidement ancrés dans le sédiment. Cette variabilité peut être diminuée en réalisant un plus grand nombre de prélèvements.

3. Prélèvement de la biomasse végétale : méthode des quadrats (*in situ*)

Ce chapitre présente le protocole de prélèvement décliné pour 4 situations distinctes selon la typologie des végétaux à prélever. Effectivement les protocoles diffèrent pour des prélèvements de macrophytes à feuilles flottantes, de macrophytes submergés et de macrophytes enracinés. Pour ces derniers, une distinction supplémentaire est faite selon les parties prélevées : aérienne ou immergée. Ces 4 fiches d'une structure analogue, mentionnent les précisions nécessaires à chacune des situations permettant la réalisation d'un prélèvement dans des conditions les plus fiables possibles.

Une visite sur site est recommandée dans les semaines précédant les prélèvements. Elle permet d'apprécier l'état de la végétation et de sélectionner les espèces à prélever et les lieux de prélèvements.

Le port de gants montants et de waders est requis afin de limiter le contact avec l'eau de la ZRV et les coupures.

3.1. Macrophytes à feuilles flottantes.

Protocole de prélèvement : Macrophytes à feuilles flottantes (ex *Lemna minor*, *Azolla filiculoides*)

Nombre d'opérateur requis : 1 à 2
Durée: environ 30 minutes par prélèvement

Opérateur 1 : récolte des végétaux
Opérateur 2 : retrait de la biomasse excédentaire

Liste du matériel : quadrat flottant en PVC (30*30 cm), 4 jalons en fer (de longueur adaptée pour permettre une bonne fixation selon la profondeur maximale du site d'étude) waders, gants montants, épuisette, sacs plastiques (de taille adaptée), papier absorbant, étiquettes, marqueur indélébile, carte de la ZRV, GPS, appareil photo, feuilles de terrain, si nécessaire embarcation légère.

Dans le cas d'espèces à feuilles flottantes (ex : *Lemna minor*, *Azolla filiculoides*), les prélèvements sont à réaliser avec un quadrat flottant en PVC de dimension 30*30 cm. Pour obtenir une représentativité suffisante de la zone à étudier, 3 prélèvements sont nécessaires. *Le port de gants montants et de waders est requis afin de limiter le contact avec l'eau de la ZRV et les coupures.*

1. Une visite sur site est recommandée dans les semaines précédant les prélèvements. Elle permet d'apprécier l'état de la végétation et de sélectionner les espèces à prélever et les lieux de prélèvements.
2. Pour chaque prélèvement, choisir un emplacement où la végétation est homogène et représentative du milieu.
3. L'emplacement des sites de prélèvement prédéfinis peut être adapté en fonction des conditions d'accès (profondeur de l'eau trop importante, végétation trop dense pour être pénétrée, etc.).
4. Repérer l'emplacement de chaque prélèvement sur une carte de la zone ou relever les coordonnées GPS

5. Positionner le quadrat (30*30 cm) flottant en surface.
6. Immobiliser le quadrat à l'aide de 4 jalons (barres métalliques) disposés en ses 4 coins (En cas de présence d'une bâche d'étanchéité, attention de ne pas l'endommager.
7. Noter le pourcentage de recouvrement de la surface du quadrat par les plantes



Figure 2 : Prélèvement d'*Azolla filiculoides* à l'aide d'un quadrat flottant

8. Prélever les plantes à l'aide d'une épuisette d'aquarium ou à la main.
9. Eviter les mouvements trop brusques qui conduiraient à l'insertion de biomasse extérieure au sein du quadrat en passant sous les bordures (i.e. biomasse excédentaire).
10. Si la récolte s'avère délicate, un opérateur peut dégager la végétation présente le long des pourtours extérieurs du quadrat. Eviter alors que les plantes situées à l'intérieur du quadrat s'en échappent.
11. Chaque prélèvement de biomasse est ensuite placé dans un sac plastique de taille adaptée ou un récipient propre préalablement étiqueté (Cf. chapitre 4).
12. Vider au maximum l'eau présente dans l'échantillon avant sa conservation.

3.2. Macrophytes submergés

Protocole de prélèvement : Macrophytes submergés (ex *Ceratophyllum demersum*)

Nombre d'opérateur requis : 1 à 2
Durée: environ 30 à 45 minutes par prélèvement

Opérateur 1 : récolte des végétaux
Opérateur 2 : retrait de la biomasse excédentaire
Opérateur 3 (optionnel) : maintien du quadrat

Liste du matériel : quadrat flottant en PVC (30*30 cm), 4 jalons fer de fer (de longueur adaptée pour permettre une bonne fixation selon la profondeur maximale du site d'étude), waders, gants montants, cisaille, épaisseur, seau de nettoyage, papier absorbant, sacs plastiques 110 L, poubelles ou grand container, étiquettes, marqueur indélébile, carte de la ZRV, fiches de terrain, GPS, appareil photo, si nécessaire embarcation légère et râteau.

Les prélèvements sont à réaliser avec un quadrat flottant en PVC de dimension 30*30 cm. Pour obtenir une représentativité suffisante de la zone à étudier, 3 prélèvements sont nécessaires.

1. Une visite sur site est recommandée dans les semaines précédant les prélèvements. Elle permet d'apprécier l'état de la végétation et de sélectionner les espèces à prélever et les lieux de prélèvements.
2. Pour chaque prélèvement, choisir un emplacement où la végétation est homogène et représentative du milieu.
3. L'emplacement des sites de prélèvement prédéfinis peut être adapté en fonction des conditions d'accès (profondeur de l'eau trop importante, végétation trop dense pour être pénétrée, etc.).
4. Repérer l'emplacement de chaque prélèvement sur une carte de la zone ou relever les coordonnées GPS

5. Positionner le quadrat (30*30 cm) flottant en surface.
6. Immobiliser le quadrat à l'aide de 4 jalons (barres métalliques) disposés en ses 4 coins (En cas de présence d'une bâche d'étanchéité, attention de ne pas l'endommager.
7. Noter le pourcentage de recouvrement de la surface du quadrat par les plantes



Figure 3 : *Ceratophyllum demersum*

8. La récolte de certaines espèces peut s'avérer très délicate en raison de l'enchevêtrement important des plantes. Dans la mesure du possible, démêler préalablement les plantes de manière à recueillir les plantes situées uniquement dans le volume d'eau délimité par le quadrat.
9. Les végétaux peuvent être coupés à l'aide d'une cisaille et extraits en plusieurs parties à la main. Il est possible de tirer délicatement sur la tige des plantes à proximité du fond pour déraciner celles-ci, mais il est recommandé de couper les tiges au ras du substrat et de laisser le système racinaire en place.
10. Eviter les mouvements trop brusques qui conduiraient à l'insertion de biomasse extérieure au sein du quadrat.
11. Chaque prélèvement de biomasse est ensuite placé dans un sac plastique de taille adaptée ou un récipient propre préalablement étiqueté (Cf. chapitre 4).
12. Vider au maximum l'eau présente dans l'échantillon avant sa conservation.

3.3. Macrophytes émergés (biomasse aérienne)

Protocole de prélèvement : Macrophytes émergés (biomasse aérienne) (ex *Typha latifolia*, *Phragmites australis*)

Durée: environ 30 à 45 minutes par prélèvement

Opérateur 2 : Aide à l'installation du quadrat et au conditionnement

Liste du matériel : quadrat flottant en PVC (50*50 cm), 4 jalons en fer (de longueur adaptée pour permettre une bonne fixation selon la profondeur maximale du site d'étude), waders, gants montants, tasseau gradué, sécateur, cisaille, sceau de nettoyage, papier absorbant, sacs plastiques 110 L, poubelles ou grands containers, étiquettes, marqueur indélébile, carte de la ZRV, GPS, fiches de terrain, appareil photo.

Pour les espèces de grandes tailles (ex : *Phragmites australis*, *Typha latifolia*), l'emploi d'un quadrat de dimension 50*50 cm, et démontable est conseillée. Si les déplacements à l'intérieur de la roselière s'avèrent trop difficiles, placer le quadrat à au moins 1 mètre de la bordure de la végétation, à l'intérieur de la roselière, en excluant les plantes couchées et abîmées. La biomasse aérienne représente la biomasse exportable suite à une opération d'entretien de la ZRV.

1. Une visite sur site est recommandée dans les semaines précédant les prélèvements. Elle permet d'apprécier l'état de la végétation et de sélectionner les espèces à prélever et les lieux de prélèvements.
2. Pour chaque prélèvement, choisir un emplacement où la végétation est homogène et représentative du milieu.
3. L'emplacement des sites de prélèvement prédéfinis peut être adapté en fonction des conditions d'accès (profondeur de l'eau trop importante, végétation trop dense pour être pénétrée, etc.).
4. Repérer l'emplacement de chaque prélèvement sur une carte de la zone ou relever les coordonnées GPS

5. Mettre en place le quadrat.
 - Si le quadrat est démontable (conseillé), il convient de l'assembler directement autour des tiges des plantes à récolter. En le refermant, on délimite ainsi la surface de prélèvement
 - Si le quadrat n'est pas démontable, incliner les plantes de façon à faire passer leur extrémité à l'intérieur du quadrat
6. Faire descendre le quadrat le long des tiges tout en remettant les tiges en place
7. Immobiliser le quadrat à l'aide de 4 jalons (barres métalliques) disposés en ses 4 coins (En cas de présence d'une bâche d'étanchéité, attention de ne pas l'endommager)
8. Identifier les plantes incluses dans la surface du quadrat, éliminer les plantes présentes dans la zone de prélèvement mais enracinées à l'extérieur du quadrat
9. Mesurer la hauteur maximale des plantes à l'aide d'un tasseau gradué et compter le nombre de pieds compris dans la surface de prélèvement

10. A l'aide d'un sécateur, un premier opérateur découpe les tiges à environ 15 cm au-dessus de la surface l'eau (hauteur approximative de fauchage lors des fauchages d'entretien).
11. Il est possible de couper les plantes récoltées pour les placer plus facilement dans un sac plastique propre préalablement étiqueté (Cf. chapitre 4).
12. Vider au maximum l'eau présente dans l'échantillon avant sa conservation
13. Maintenir le quadrat en position si un prélèvement de biomasse immergée est à réaliser.



Figure 4 : prélèvement de *Phragmites australis*

3.4. Macrophytes émergés (biomasse immergée)

Protocole de prélèvement : Macrophytes émergés (biomasse immergée) (ex *Typha latifolia*, *Phragmites australis*)

Nombre d'opérateur requis : 1 à 2

Durée: environ 30 à 45 minutes par prélèvement

Opérateur 1 : travail à la cisaille

Opérateur 2 : Aide au déracinement et conditionnement

Liste du matériel : quadrat flottant en PVC (50*50 cm), 4 jalons en fer (de longueur adaptée pour permettre une bonne fixation selon la profondeur maximale du site d'étude), waders, gants montants, tasseau gradué, cisaille, bêche de jardinier, sécateur, seau de nettoyage, brosse, papier absorbant, poubelles ou grands containers, sacs plastiques 110 L, étiquettes, marqueur indélébile, carte de la ZRV, GPS, fiches de terrain, appareil photo.

La biomasse immergée représente les résidus de plantes après faucardage. Elle est composée par le système racinaire des plantes et les fragments de tiges compris entre la base de la tige jusqu'à 15 cm au-dessus de l'eau. Selon les espèces et l'architecture de leur réseau racinaire, une détermination précise de la biomasse végétale immergée peut devenir compliquée. Pour des espèces ayant un système racinaire dense et compact (ex : *Phragmites australis*), les prélèvements peuvent très vite devenir physiques et contraignants.

1. Les prélèvements de biomasse immergée sont situés aux mêmes endroits que les prélèvements de biomasse émergée. Sinon, couper la partie émergée en se référant à la procédure présentée en partie 3.3.
2. Vérifier que le quadrat n'ait pas été décalé, et le maintenir fermement fixé avec les jalons en fer aux 4 angles.
3. Identifier les plantes présentes uniquement dans la surface du quadrat.

4. A l'aide d'une cisaille ou d'une bêche bien aiguisée, effectuer des entailles à la verticale profondément dans le sol, à l'intérieur de toute la surface du quadrat, pour sectionner les racines et rhizomes afin de les extraire
5. En tirant avec force sur les parties accessibles, notamment les portions de tiges restantes et les rhizomes, la biomasse racinaire peut être récoltée en continuant à creuser et à sectionner simultanément à l'aide d'un sécateur.
6. Si la biomasse racinaire demeure bloquée dans le sol, il faut utiliser la cisaille :
 - L'enfoncer au maximum en position ouverte
 - S'aider de la force des bras et des jambes en calant les manches sur l'intérieur des genoux
 - Fermer la cisaille et sectionner les tissus
 - Faire ensuite un mouvement de levier vers le haut pour soulever légèrement le sol.
 - Tirer sur les tiges pour aider au déracinement.
 - Répéter l'opération autant que nécessaire.

10. Les tissus récoltés sont ensuite placés dans un sac plastique préalablement étiqueté (Cf. Chapitre 4).
11. Vider au maximum l'eau présente dans l'échantillon avant sa conservation.

4. Conditionnement des prélèvements de macrophyte

Dès la récolte effectuée, il est recommandé de commencer sur site la préparation et le conditionnement des prélèvements pour faciliter leur traitement ultérieur.

4.1. Conditionnement et consignes d'étiquetage

Il est fortement conseillé de réaliser un pré-nettoyage (à l'eau de la ZRV) des prélèvements de biomasse immergée avant de les conditionner. On peut utiliser un bac pour rincer et brosser délicatement la plus grosse partie des sédiments.

Cette étape n'est pas nécessaire pour les prélèvements de biomasse aérienne de macrophytes émergés, les macrophytes à feuilles flottantes et submergés.

Les prélèvements de biomasse végétale sont stockés individuellement dans des sacs plastiques propres et de volume suffisant pour recevoir un prélèvement complet. Ils sont ensuite percés plusieurs fois pour permettre à l'eau de s'écouler et éviter la macération des végétaux. Les sacs contenant des espèces de petites tailles ne doivent pas être percés, cependant il faut vider au maximum l'eau contenue dans les sacs avant de les refermer.

Chaque sac est étiqueté soigneusement afin d'éviter toute perte et confusion d'origine des prélèvements.

Il est également recommandé de répertorier sur un même document toutes les informations concernant le prélèvement : nom des opérateurs, date de prélèvement, zone et numéro de prélèvement, taille du quadrat, espèce, nature de la biomasse (immergée/émergée), hauteur moyenne de la végétation, nombre de pieds par surface de prélèvement, pourcentage de recouvrement, référence des sacs de prélèvement.

Exemple d'étiquetage des sacs de prélèvement :

- Date de prélèvement
- Site d'étude (nom de la ZRV + désignation de la zone étudiée)
- Numéro de prélèvement
- Espèce prélevée
- Nature du prélèvement (biomasse émergée ou immergée)



Figure 5 : Conditionnement des prélèvements de macrophytes

4.2. Transport et conservation des prélèvements

Une fois arrivés sur le site de préparation, les sacs de biomasse sont déchargés et stockés dans un endroit frais, à l'abri de la lumière directe. Ils sont ouverts et régulièrement brassés manuellement pour limiter la décomposition des plantes.

Les sacs de prélèvements de macrophytes submergés et de macrophytes à feuilles flottantes peuvent être placés quelques jours (moins d'une semaine) dans l'eau (de la ZRV ou du robinet). Au-delà de cette période, il est conseillé de les maintenir dans les sacs plastiques sans eau ni sédiment, à l'abri de la lumière et au frais (4°C). Ces prélèvements sont les plus délicats à conserver. Il est fortement recommandé de les traiter en priorité.

5. Préparation des prélèvements pour une estimation de la biomasse végétale

Ce chapitre décrit toutes les étapes de nettoyage et de préparation des prélèvements en vue de la détermination de la biomasse végétale humide et sèche.

Si la réalisation d'analyses de certains paramètres chimiques est envisagée sur des échantillons issus de ces prélèvements, il convient d'appliquer des précautions particulières permettant de limiter les risques de contamination. Cela concerne particulièrement le choix des matériaux des contenants et des ustensiles employés (contenant, découpe, broyage, etc.).

Ainsi selon les situations, il convient de procéder comme suit :

- **Absence d'analyses chimiques => le choix des matériaux des contenants se fait selon la convenance de l'opérateur ;**
- **Analyse des paramètres majeurs et / ou des micropolluants => se référer également au chapitre 6 pour le choix des matériaux des contenants et les méthodes de nettoyage du matériel recommandés**

Ce chapitre présente les trois différentes possibilités de préparation des prélèvements selon la typologie des végétaux à prélever. Un premier protocole est commun aux prélèvements de macrophytes à feuilles flottantes et à ceux de macrophytes submergés. Pour les macrophytes enracinés, il existe deux protocoles tenant compte de la biomasse aérienne et de la biomasse immergée.

Ces 3 fiches d'une structure analogue, mentionnent les précisions nécessaires à chacune des situations permettant la réalisation d'une préparation d'échantillon dans des conditions les plus fiables possibles pour l'obtention d'une masse de biomasse fraîche (ou poids frais).

La mesure du poids sec, commune à toutes les espèces est mentionnée en fin de ce chapitre

Le poste de travail doit disposer d'un espace important, à proximité d'un point d'eau. Les sacs de biomasse sont successivement traités dans son intégralité.

Le port des gants est requis lors de la manipulation des végétaux afin de limiter le contact avec les sédiments et l'eau de la ZRV, et les risques de coupure. La liste totale du matériel nécessaire est présentée en Annexe I.

5.1. Application aux macrophytes à feuilles flottantes et submergés.

Protocole de préparation : macrophytes à feuilles flottantes et submergés

Nombre d'opérateur requis : 1

Durée: 2 à 3 jours pour une dizaine de prélèvements

Liste du matériel : bacs destinés au séchage de 1 et/ou 2 litres, tamis, gants, blouse, cuves de nettoyage, ciseaux, épuisette,essoreuse, papier absorbant, une balance équilibrée (avec précision au 0,1 gramme), carnet de laboratoire, marqueur indélébile, fichier de nomenclature et de suivi des échantillons.

1. Organiser l'espace en deux parties : une zone de nettoyage proche de l'évier, et une zone d'essorage et de remplissage des bacs de séchage.
2. Placer le sac à traiter dans un évier pour qu'il s'égoutte.
3. Préparer le matériel:
 - o Numéroté plusieurs bacs de séchage au marqueur indélébile et peser leur poids à vide (poids de « tare »).
 - o Disposer les bacs pesés sur un côté du plan de travail.
4. Mettre un tamis au-dessus de l'évacuation de l'évier pour retenir les sédiments et débris de végétaux lors du lavage, afin d'éviter de boucher les canalisations.
5. Pour les espèces de petite taille, les plantes sont mises dans une épuisette puis rincées directement au l'eau du robinet.

6. Dans une grande cuve de nettoyage pleine d'eau du robinet, laver les végétaux et enlever les débris, sédiments ou organismes présents.
7. Renouveler en eau propre en vidant au-dessus du tamis, récupérer les feuilles si besoin.
8. Mettre les plantes lavées dans uneessoreuse (typeessoreuse à salade).
9. Essorer brièvement une première fois et vider l'excédent d'eau.
10. Essorer une seconde fois à un rythme soutenu
11. Renouveler l'opération si nécessaire.

12. Remplir les bacs de séchage tarés avec la biomasse essorée, sans la tasser pour un séchage optimal.
13. Peser les bacs de séchage remplis de biomasse (« poids frais » + poids de « tare »).
14. La création d'un fichier pour répertorier les données et suivre plus facilement l'évolution des prélèvements est fortement conseillée. Un exemple de structure de tableur est fourni en annexe II.



Figure 6 : Biomasse fraîche de *Ceratophyllum demersum* avant séchage

5.2. Application aux macrophytes émergés (biomasse aérienne)

Protocole de préparation : macrophytes émergés (biomasse aérienne)

Nombre d'opérateur requis : 1

Durée: 2 à 3 jours pour une dizaine de prélèvements

Liste du matériel : bacs destinés au séchage de 1 et/ou 2 litres, gants, blouse, cuves de nettoyage, brosse, tamis, sécateur ou ciseaux,essoreuse, papier absorbant, une balance équilibrée (avec précision au 0,1 gramme), carnet de laboratoire, marqueur indélébile, fichier de nomenclature et de suivi des échantillons.

1. Organiser l'espace en deux parties : une zone de nettoyage proche de l'évier, et une zone d'essorage et de remplissage des bacs de séchage.
2. Placer le sac à traiter dans un évier.
3. Préparer le matériel:
 - o Numéroté plusieurs bacs de séchage au marqueur indélébile et peser leur poids à vide (poids de « tare »).
 - o Disposer les bacs pesés sur un coté du plan de travail.
4. Mettre un tamis au-dessus de l'évacuation de l'évier pour retenir les sédiments et débris de végétaux lors du lavage, afin d'éviter de boucher les canalisations..

6. Découper les plantes en morceaux d'une dizaine de centimètres.
7. Si la problématique requiert de distinguer les organes des plantes, séparer nettement les tiges et les feuilles.
8. Si nécessaire, laver les tiges et les feuilles à l'eau du robinet
9. Mettre les plantes préalablement lavées dans uneessoreuse (typeessoreuse à salade).
- 10.Essorer brièvement une première fois et vider l'excédent d'eau.
- 11.Essorer une seconde fois à un rythme soutenu
- 12.Enlever l'excédent d'eau et renouveler l'opération si nécessaire.

- 13.Remplir les bacs de séchage tarés avec la biomasse essorée, sans la tasser pour un séchage optimal.
- 14.Peser les bacs de séchage remplis de biomasse (« poids frais » + poids de « tare »).
- 15.La création d'un fichier pour répertorier les données et suivre plus facilement l'évolution des prélèvements est fortement conseillée. Un exemple de structure de tableur est fourni en annexe II



Figure 5 : Séparation des feuilles et tiges de *Phragmites australis*

5.3. Application aux macrophytes émergés (biomasse immergée).

Protocole de préparation : macrophytes émergés (biomasse immergée)

Nombre d'opérateur requis : 1

Durée: une demi-journée pour 2 de prélèvements

Liste du matériel : bacs destinés au séchage de 1 et/ou 2 litres, gants, blouse, cuves de nettoyage, brosse, tamis, sécateur,essoreuse, papier absorbant, une balance équilibrée avec précision (0,1 gramme), carnet de laboratoire, marqueur indélébile, fichier de nomenclature et de suivi des échantillons.

1. Organiser l'espace en deux parties : une zone de nettoyage proche de l'évier, et une zone d'essorage et de remplissage des bacs de séchage.
2. Placer le sac à traiter dans un évier pour qu'il s'égoutte.
3. Préparer le matériel:
 - o Numéroté plusieurs bacs de séchage au marqueur indélébile et peser leur poids à vide (poids de « tare »).
 - o Disposer les bacs pesés sur un coté du plan de travail.
4. Mettre un tamis au-dessus de l'évacuation de l'évier pour retenir les sédiments et débris de végétaux lors du lavage, afin d'éviter de boucher les canalisations.

5. Découper les plantes en morceaux d'une dizaine de centimètres.
6. Découper grossièrement les racines et rhizomes et tiges en morceaux d'une dizaine de centimètres.
7. . Brosser et nettoyer minutieusement pour enlever tous les résidus de sédiment
8. Laver les prélèvements à l'eau du robinet.
9. Essorer brièvement les végétaux une première fois et vider l'excédent d'eau.
10. Essorer une seconde fois pendant environ une minute à un rythme soutenu
11. Enlever l'excédent d'eau et renouveler l'opération si nécessaire.

12. Remplir les bacs de séchage tarés avec la biomasse essorée, sans la tasser pour un séchage optimal.
13. Peser les bacs de séchage remplis de biomasse (« poids frais » + poids de « tare »).
14. La création d'un fichier pour répertorier les données et suivre plus facilement l'évolution des prélèvements est fortement conseillée. Un exemple de structure de tableur est fourni en annexe II



Figure 6 : Biomasse immergée et souterraine de *Typha latifolia*

5.4 Protocole de mesure du poids sec de la biomasse végétale

Une fois leurs poids frais mesurés, les bacs de végétaux sont placés dans une étuve ventilée pour le séchage. Il est recommandé de directement placer les végétaux en étuve programmée à 70°C. Si des analyses chimiques sont envisagées, des adaptations sont à prévoir selon les paramètres analysés (ex : composés volatiles). Se référer alors au chapitre 6. Le temps de séchage jusqu'à l'obtention du poids sec (poids stabilisé après plusieurs mesures) varie selon les espèces, leur teneur en eau, et la quantité et nature des biomasses étudiées.



Figure 7 : Etuve de séchage

- ❖ Allumer les étuves et programmer la température requise (70°C) ;
- ❖ Placer dans l'étuve les bacs de séchage dont le poids a été préalablement déterminé.
- ❖ Peser les bacs tous les deux jours.
- ❖ Reporter les poids dans le fichier de suivi. Cela permet d'évaluer rapidement l'évolution du séchage au cours du temps.
- ❖ Lorsque le poids des bacs commence à se stabiliser, peser quotidiennement jusqu'à obtention d'un poids sec stable pendant au moins 2 jours consécutifs.
- ❖ Sortir alors les bacs de séchage et stocker si nécessaire leur contenu dans des sacs plastiques propres (vidés d'air au maximum).

- ❖ Nettoyer et réutiliser les bacs de séchage pour poursuivre le séchage d'autres prélèvements.

Si l'espace disponible en étuve n'est pas suffisant pour traiter simultanément l'ensemble des prélèvements, certains prélèvements devront subir une période de pré-séchage à l'air libre. Si on dispose de suffisamment d'espace, les bacs de séchage peuvent être simplement laissés à l'air libre en attente du passage en étuve. Sinon, le contenu lavé et essoré du sac de prélèvement peut être stocké dans une housse en tissu suspendue et pourvue d'une étiquette répertoriant précisément les informations sur son contenu : l'espèce, et la nature de la biomasse, les numéros des bacs de séchage associés et le poids frais qu'elle contient. Les échantillons en pré-séchage intégreront le séchage en étuve dans les bacs de séchage associés au fur et à mesure que l'espace en étuve sera libéré.

6. Adaptation de la préparation des prélèvements pour analyses de paramètres chimiques

Si des analyses chimiques sont à réaliser sur les végétaux prélevés, certaines précautions et adaptations doivent être appliquées lors de la préparation des tissus à analyser. La sélection d'un sous-échantillonnage, la température de séchage, la méthodologie de broyage, le conditionnement sont autant de paramètres qui, mal adaptés aux analyses ultérieures, peuvent entraîner une surestimation ou une sous-estimation des paramètres analysés en raison de contaminations accidentelles ou de perte lors de la préparation des tissus végétaux.

En fonction des paramètres à mesurer, les précautions de manipulations des échantillons doivent prendre en compte la nature des matériaux et ustensiles utilisés. En particulier pour la découpe, le séchage, le broyage des tissus végétaux.

- Pour les analyses de métaux : éviter le contact avec des matériaux/ustensiles en métal (ex : l'acier inoxydable, même neuf, peut induire des contaminations en nickel, chrome et fer, notamment).
- Pour les analyses de contaminants organiques : éviter le contact avec des matériaux en plastique.
- Le verre est un matériel adapté dans tous les cas. Le Téflon (PFA, FEP) est aussi acceptable, excepté dans le cas de l'analyse des composés perfluorés ; il a l'avantage d'être incassable et l'inconvénient d'être plus couteux que le verre.
- Une procédure de nettoyage adaptée doit être appliquée.
- La céramique peut convenir mais il faut en vérifier sa composition au préalable (risque de contamination pour certains métaux).

Le présent chapitre s'attache donc à fournir des consignes pour la réalisation d'un sous échantillonnage et sa préparation en vue d'analyses des paramètres majeurs, métaux et de contaminants organiques au sein des tissus de macrophyte prélevés en ZRV.

6.1 Sélection d'un échantillonnage de biomasse végétale en vue d'analyses chimiques

Il est nécessaire de déterminer la masse minimale de tissus (séchés et broyés) requise par les analyses chimiques afin de réaliser un sous-échantillonnage de biomasse parmi la biomasse totale récoltée lors d'un prélèvement. Cette masse minimale est définie en fonction de la méthode d'analyse employée, du nombre de réplicat envisagé par analyse, de la masse fraîche prélevée lors du prélèvement.

Pour des analyses de paramètres majeurs, de métaux et de contaminants organiques, une masse minimale de 20 grammes de matière séchée et broyée est à dédier aux analyses chimiques pour chaque prélèvement. Il peut être composé, selon les objectifs de l'étude, de plante entière ou bien exclusivement d'un type de tissus (tige, feuille, racine).

Ce sous-échantillon est réalisé à partir de biomasse lavée et essorée (étape 12 fiche protocole préparation 1, 2, 3). La connaissance du ratio poids frais/poids sec à partir de données antérieures ou bibliographiques pour les espèces étudiées permet de fournir une idée de la masse fraîche à prélever et à préparer. Il est important de multiplier cette masse fraîche par 2 par sécurité et de l'inclure dans le bilan de la biomasse totale du prélèvement.

- ❖ Pour chaque prélèvement, une fois la biomasse fraîche lavée (à l'eau du robinet) et essorée, mélanger et homogénéiser soigneusement le prélèvement.
- ❖ **Prélever au hasard le double de la masse requise.**
- ❖ Rincer ce sous échantillon de biomasse sélectionnée à l'**eau distillée**.
- ❖ Placer les plantes préalablement lavées dans uneessoreuse (typeessoreuse à salade).
- ❖ Essorer brièvement une première fois et vider l'excédent d'eau.
- ❖ Essorer une seconde fois à un rythme soutenu.
- ❖ Enlever l'excédent d'eau et renouveler l'opération si nécessaire.
- ❖ Remplir des bacs de séchage (adaptés aux analyses) tarés avec la biomasse essorée, sans tasser pour un séchage optimal.
- ❖ Peser les bacs de séchage remplis de biomasse (« poids frais » + poids de « tare »).
- ❖ Identifier clairement ces bacs destinés à l'analyse
- ❖ Remplir les informations requises dans le fichier répertoriant les données de biomasse
- ❖ Poursuivre avec le séchage.

6.2 Séchage

La température de séchage requise pour les analyses

- des paramètres majeurs,
- des métaux,
- des contaminants organiques

est de **40°C**. En effet, la température de séchage a un impact direct sur la perte de certains éléments au sein des tissus, notamment pour les composés volatils risquant de s'évaporer à des températures trop élevées (ex : mercure, HAP – hydrocarbures aromatiques polycycliques).

Le protocole de séchage est le même que celui présenté en partie 5.3, mais à la température de **40°C**.

6.3 Broyage

Une fois le poids sec déterminé, le contenu de chaque bac séché à 40°C doit être préalablement broyé. Plusieurs méthodes et appareils de broyage sont disponibles. Cependant, le broyage de certains végétaux peut s'avérer compliqué, notamment dans le cas de tissus particulièrement fibreux ou pourvu d'un réseau aérifère développé. De plus, les risques de contamination liés à la composition des outils de broyage sont parfois importants et doivent donc être pris en considération.

Le tableau ci-dessous présente certaines méthodes couramment utilisées dans le cadre du broyage de végétaux. Il convient de sélectionner celle qui sera la plus adaptée à la problématique étudiée et aux paramètres à mesurer, selon ses avantages et inconvénients.

Certaines méthodes nécessitent une découpe préalable des tissus (comme le broyage manuel ou à l'aide d'un petit broyeur). Tout le travail de découpe doit alors être réalisé avec des outils non contaminants : un couteau ou une paire de ciseaux en céramique composée d'oxyde de zirconium (pureté >99%) est une bonne alternative à l'acier inox dans le cas de l'analyse des métaux.

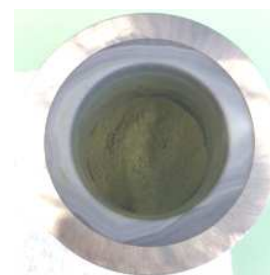


Figure 8 :
Macrophytes à feuilles
flottantes broyées

Méthode de broyage	Avantages	Inconvénients
Broyeur à billes avec ensemble de cuve et billes en agate ou en oxyde de zirconium	➤ Fonctionne bien sur les espèces de petites tailles et submergées ➤ Broyage rapide ➤ Pas de contamination ➤ Bonne homogénéisation de l'échantillon ➤ Obtention d'une poudre fine	➤ Fonctionne très difficilement sur les espèces de grande taille, type massette ou roseaux ➤ Pas efficace sur tissus fibreux
Broyeur à lame en acier inoxydable	➤ Efficace sur la majorité des espèces ➤ Broyage rapide ➤ Homogénéisation de l'échantillon	Problème de contamination pour les métaux, notamment chrome et nickel (composants de l'acier inox) et possiblement du cuivre et d'autres métaux
Broyage manuel avec mortier en agate	➤ Efficace sur la majorité des espèces ➤ Pas de contamination	➤ Pré-découpage nécessaire avec ustensile non contaminant ➤ Temps de broyage important ➤ Moins bonne homogénéisation de l'échantillon car poudre moins fine.
Broyeur avec meule en céramique	➤ Peu de contamination si le type de céramique est adapté aux analyses ➤ Homogénéisation de l'échantillon	➤ Pré-découpage nécessaire avec ustensile non contaminant

Tableau 1 : Avantages et inconvénients des principales méthodes de broyage pour les végétaux

6.4 Conditionnement avant analyse

Une fois broyés, les échantillons doivent être stockés dans des conditions optimales jusqu'à la date d'analyse. De même que pour le broyage, les matériaux employés pour le conditionnement des échantillons broyés sont susceptibles d'induire des contaminations. Le conditionnement dans des flacons en verre de contenance suffisante (125 ml) est l'alternative la plus recommandable lorsque tous les paramètres sont analysés.

Ces derniers doivent préalablement subir un nettoyage adapté aux analyses réalisées. Par exemple, un lavage au détergent (à la main ou en machine), suivi d'un rinçage à l'acide puis à l'eau ultra pure. Ou encore un lavage aux solvants, ou décontamination par calcination (500°C) pour les contaminants organiques.

Une fois remplis, ces flacons sont ensuite placés au dessiccateur (humidité contrôlée et à l'abri de la lumière) et à température ambiante, jusqu'à l'application du protocole d'analyse.

7. Cas d'application : travaux réalisés lors de la campagne d'octobre 2015

7.1 Présentation du site de Marguerittes

Le site de Margueritte (30) est une ZRV de type bassin d'une superficie proche de 1.1 ha inaugurée le 16 septembre 2013 et dont le Maître d'ouvrage est la communauté d'agglomération de Nîmes Métropole. Le site est décrit de façon détaillée dans le livrable « Zone de rejet végétalisée de Marguerittes (30) Contexte général », Rapport Irstea, décembre 2014.

La ZRV s'organise autour de deux bassins (Figure 10). Le premier bassin, dit « bassin à microphytes », a un volume de 3575 m³. C'est dans ce premier bassin que l'eau traitée par la station de traitement des eaux résiduaires (STEP) est introduite dans la ZRV grâce à une canalisation sous pression. Le volume du second bassin est de 3819 m³. Ce deuxième bassin est divisée en 6 habitats différenciés (une roselière, 2 zones en eau libre, une zone libre à herbier, une zone « delta » et un bassin à macrophyte), aux travers desquels l'eau chemine jusqu'à la sortie de la ZRV vers le milieu récepteur : le Canabou (un affluent du Vistre).

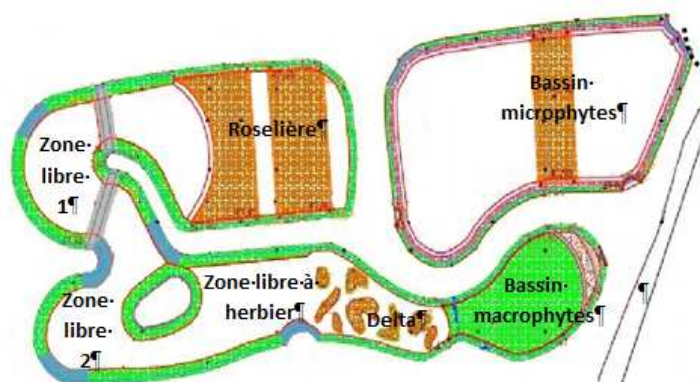


Figure 9 : Plan de la ZRV de Marguerittes

L'instrumentation de la ZRV de Marguerittes par Irstea a débuté en aout 2013. Elle permet d'assurer un suivi scientifique et la collecte de données sur plusieurs années. Afin d'estimer le rôle du compartiment végétal dans le fonctionnement de la ZRV de Marguerittes, plusieurs points sont en cours d'étude :

- 1 Un suivi sur le long terme de la composition spécifique et de la dynamique de colonisation des communautés végétales.
- 2 Une estimation de la biomasse végétale exportable de ces espèces lors des mesures d'entretien régulières de la végétation (faucardage annuel, récolte régulière des espèces flottantes).
- 3 Une analyse des teneurs de certaines substances d'origine anthropique (métaux, substances azotées, phosphorées) dans les végétaux aquatiques les plus abondants.
- 4 Une estimation de la masse de certains polluants exportable par des actions d'entretien annuel des végétaux.

7.2 Campagne d'octobre 2015 : volet végétal

Lors de la campagne de mesures et de prélèvement qui s'est déroulée du 12 au 17 octobre 2015 sur le site de Marguerittes, une étude sur le rôle des végétaux dans la ZRV a été organisée.

Les objectifs de cette étude étaient les suivants :

- Tester l'application du protocole présenté dans les chapitres précédents.
- Réaliser à partir de ces prélèvements, une estimation de la biomasse exportable de végétaux lors des mesures d'entretien de la ZRV.
- Effectuer une estimation de la masse de certains polluants exportables par des actions d'entretien annuel.

7.2.1 Espèces étudiées

Les espèces étudiées lors de cette campagne sont les espèces les plus abondantes sur la ZRV. Elles font l'objet pour la plupart de mesures d'entretien qui aboutissent à l'exportation de biomasse en dehors de la ZRV.

Lemna minor et ***Lemna gibba***, ainsi que ***Azolla filiculoides*** sont des plantes aquatiques à feuilles flottantes. Ces espèces se développent sur l'ensemble des bassins, et occasionnent des envahissements en recouvrant parfois toute presque toute la surface en eau.

Des mesures d'entretien ont été organisées sur la ZRV, notamment lors des périodes estivales de fort recouvrement. Ces végétaux sont alors récoltés et exportés hors de la ZRV. A titre d'exemple, en août 2015, 18 000 kilogrammes de poids frais de macrophyte à feuilles flottantes ont été évacués de la ZRV.

Ceratophyllum demersum est une plante aquatique submergée et non enracinée. Cette espèce, importée lors de la création de la ZRV, se développe aujourd'hui sur le second bassin, au niveau des zones libres et de la zone libre à herbier (Cf. Figure 10). Elle forme aujourd'hui des herbiers très denses, occupant des surfaces importantes, et se développe sur l'ensemble de la colonne d'eau. Au regard de son développement important, cette espèce pourrait à terme nécessiter des mesures d'entretien entraînant un export de matière en dehors de la ZRV. De plus, plusieurs études témoignent de sa capacité d'absorption intéressante de certains éléments (Garg, 1990) (Keskinkan, 2004), il s'agirait donc de conserver tout de même des herbiers de cette espèce pour conserver la présence de cette plante sur site.

Phragmites australis et ***Typha latifolia*** sont les deux espèces aquatiques dominantes sur la ZRV. Elles se retrouvent au niveau des berges et dans le second bassin, au sein des zones dénommées « roselière » et « bassin à macrophytes ». Ces deux espèces sont fauchées une fois par an et la partie aérienne est exportée hors de la ZRV.

Compte tenu de leur importante surface de développement sur ce site, de leur capacité de production annuelle de biomasse importante et des exports réguliers (ou potentiels) de matière réalisés, ces espèces sont donc les plus pertinentes à prendre en considération dans le cadre de la réalisation d'un bilan massique sur la ZRV de Marguerittes.

7.2.2 Organisation des prélèvements

Le tableau 2 résume les prélèvements réalisés par la méthode des quadrats lors de la campagne. Ils sont schématisés sur la Figure 11.

Prélèvement Végétaux Marguerittes	Dates	Méthode de prélèvement	Lieux	Prélèvements		Nombre d'opérateurs
				Biomasse aérienne	Biomasse immergée	
<i>Phragmites australis</i>	12/10/15 après-midi et 13/10/15 après midi	Quadrat (50*50cm)	Roselière	5	3	1 à 3
<i>Typha latifolia</i>	13/10/15 matin	Quadrat (50*50cm)	Bassin macrophyte	3	3	2
<i>Ceratophyllum demersum</i>	12/10/15 matin	Quadrat (30*30cm)	Zone libre à herbier		3	3
			Sortie de roselière		3	3
Mélange <i>Lemna minor</i> <i>Lemna gibba</i> et <i>Azolla filiculoides</i>	12/10/15 matin	Quadrat (30*30cm)	Sortie de roselière	3		2

Tableau 2 : Organisation des prélèvements de biomasse végétale lors de la campagne d'octobre 2015 sur la ZRV de Marguerittes

Entre le 12 et le 13 octobre 2015, 23 prélèvements ont été réalisés, mobilisant jusqu'à 3 opérateurs. Ils se répartissent en :

- 8 prélèvements de biomasse aérienne de macrophytes émergés ;
- 6 prélèvements de biomasse immergée et souterraine pour les macrophytes émergés ;
- 9 prélèvements de macrophyte à feuilles flottantes ou submergés.

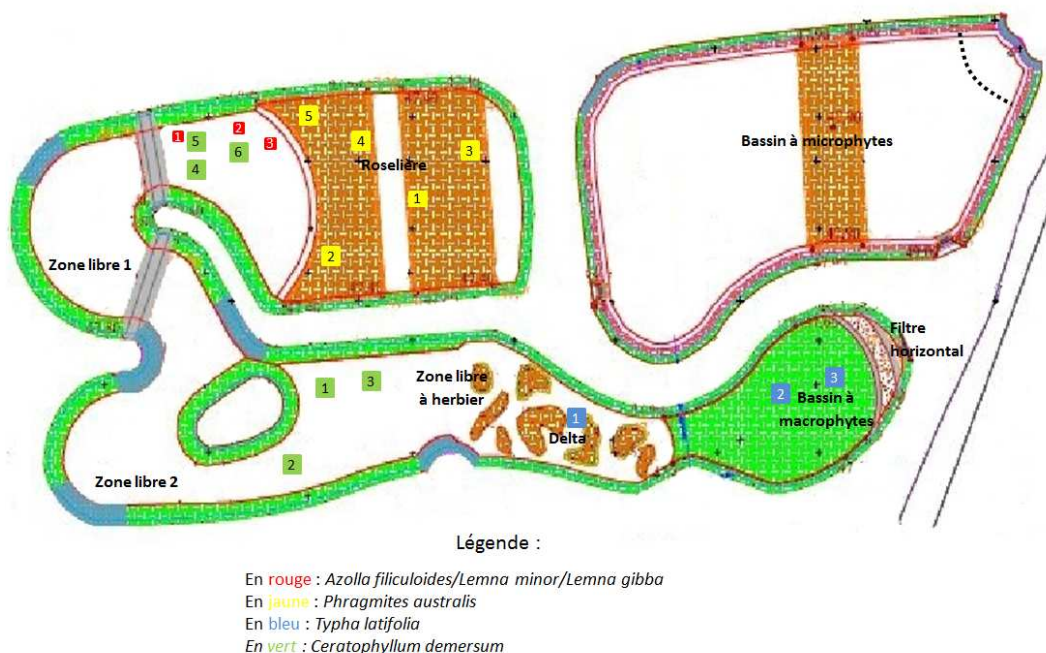


Figure 10 : Cartographie des prélèvements de végétaux sur la ZRV de Marguerittes lors de la campagne d'octobre 2015

7.2.3 Préparation des prélèvements réalisés à Marguerittes en octobre 2015

La préparation des prélèvements a été effectuée par un opérateur. Les tiges et feuilles des macrophytes émergés ont été distinctement séparées avant séchage pour estimer leur biomasse respective, et réaliser les analyses chimiques de façon distincte. Les biomasses immergées et souterraines de macrophytes émergés n'ont pas été séparées (en tant que tige, racine, rhizome). Les macrophytes à feuilles flottantes et les macrophytes submergés ont été préparés en tant que plante entière (sans distinction d'organe).

Le séchage des végétaux a été réalisé en utilisant 4 étuves (2 programmées à 70°C et 2 à 40°C). En tant que bacs de séchage des végétaux, 80 barquettes d'aluminium ont été utilisées. Le temps de séchage a été en moyenne de 7 à 10 jours à 70°C, et a varié selon les espèces et la nature de la biomasse. Tous les prélèvements de macrophytes émergés sont passés par une étape de séchage en air libre (avant de passer en étuve ventilée), ce qui a requis 23 housses en tissus.

Du fait de certaines difficultés et contraintes (Cf. tableau 1), plusieurs méthodes de broyage ont été envisagées et testées lors de la préparation des échantillons destinés aux analyses chimiques.

Les échantillons de mélange *Lemna*/*Azolla* et de *Ceratophyllum demersum* ont été broyés à l'aide d'un broyeur à billes en 2 cycles de 6 minutes (ensemble de cuve et billes en agate). Cette configuration permet d'obtenir pour ces espèces des échantillons fins et homogènes, et sans risque de contamination en métaux.

Néanmoins, le broyeur à billes s'est avéré non adapté pour le broyage de *Phragmites australis* et *Typha latifolia* (même totalement inefficace pour le broyage de feuilles). Un broyeur à lame a été testé sur des échantillons de racine, tige et feuille de *Phragmites*. Cette méthode fournit des échantillons de texture suffisamment fine et homogène pour la réalisation d'analyses. Néanmoins, elle présente un risque de contamination non négligeable pour la mesure des teneurs en métaux dans les végétaux.

Le broyage manuel à l'aide d'un mortier en agate a également été testé sur des feuilles de *Typha latifolia*, ainsi que sur des tiges et feuilles de *Phragmites*. Cette méthode requiert beaucoup de temps pour fournir la masse minimale nécessaire aux analyses, et nécessite un pré-découpage fin des tissus

notamment pour les feuilles. Les outils de découpe doivent donc être non contaminant vis-à-vis des micropolluants à analyser.

Au regard des problématiques de contamination et de temps nécessaire selon les méthodes de broyage, l'alternative d'employer un broyeur à meule de céramique a été envisagée. Associé à un pré-découpage des végétaux à l'aide d'outils en céramique (couteau ou ciseaux), cette méthode pourrait permettre d'optimiser le protocole de broyage des macrophytes émergés.

Une série d'analyses préliminaires sera réalisée en Février 2016 pour comparer le risque de contamination en métaux résultant des procédures de broyage manuel (mortier en agate), broyeur avec lame (inox) et au broyeur à lame en céramique. Les résultats de ces tests devraient nous permettre de finaliser le choix de la méthode de broyage la plus adaptée pour chaque type de végétaux et selon les analyses chimiques ciblées.

8. Conclusion

Ce document méthodologique propose un protocole expérimental de prélèvement et de préparation des végétaux, en vue d'estimations quantitatives de la biomasse végétale totale à l'échelle de la ZRV et de la biomasse végétale exportable lors des opérations d'entretien du site, ainsi que l'analyse conjointe (ou non) de certains paramètres chimiques dans les tissus végétaux prélevés.

Développée pour l'étude de la ZRV de type « bassin » de Marguerittes (30), cette méthodologie est théoriquement applicable aux autres ZRV.

Le prélèvement de plante dans les zones de pleine eau à l'aide d'une embarcation et d'un râteau n'a pas été testé dans le cadre de cette étude. Cette technique devrait faire l'objet de tests supplémentaires dans l'avenir afin de définir au mieux ses modalités et son applicabilité. La mise en œuvre de ce protocole nécessitera éventuellement des adaptations s'il devait faire l'objet d'une application sur des ZRV de types différents que celui de Marguerittes.

Néanmoins, l'application de ce protocole au sein de la ZRV de Marguerittes a permis de mettre en évidence que le prélèvement de végétaux aquatiques demeure un exercice long, parfois difficile et contraignant. De plus, et essentiellement lorsque les paramètres de prélèvement s'avèrent difficiles, s'ajoutent naturellement des adaptations de bon sens. C'est notamment le cas des prélèvements de biomasse souterraine.

La préparation des prélèvements après récolte est souvent un aspect peu détaillé de la littérature. Cette étape, essentielle pour l'obtention d'une valeur la plus fiable possible requiert un temps de manipulation important et une organisation fiable.

Si une analyse chimique de tout ou partie de plante est requise, il est nécessaire de suivre une méthodologie adaptée permettant d'éviter tout particulièrement des pertes par volatilisation et des contaminations par des outils ou des contenants inappropriés

Ces travaux donnent la possibilité d'acquérir les valeurs afin d'établir les masses de polluants contenus dans les végétaux ainsi que les masses exportables par faucardage. L'étape suivante consiste à identifier les surfaces correspondantes à chaque espèce prélevée pour définir les masses totales de biomasse en poids sec ou en poids frais. Les connaissances des concentrations d'un polluant donné (mg/gPS) appliquées à cette biomasse de poids sec fournissent le résultat attendu c'est-à-dire la masse de polluant contenu dans la biomasse.

L'analyse des résultats issus des campagnes de prélèvement sur le site de Marguerittes fait l'objet d'un rapport séparé.

9. Glossaire

Biomasse émergée : cette appellation désigne dans le présent document toute biomasse se situant au-dessus de la hauteur de fauche (soit 15 cm au-dessus de la surface). Cette biomasse est considérée comme exportable hors du système.

Biomasse immergée : cette appellation désigne dans le présent document toute biomasse située en dessous de la hauteur de fauche.

Macrophyte : désigne toutes plantes aquatiques visible à l'œil nu

Zone de rejet végétalisée : espace aménagé entre la station de traitement des eaux usées et le milieu récepteur superficiel de rejets des eaux usées traitées. Cet aménagement ne fait pas partie du dispositif de traitement des eaux usées mais est inclus dans le périmètre de la station.

10. Bibliographie

Boutin C, Dutartre A, 2014 : Des macrophytes pour épurer les eaux ?, Sciences Eaux et Territoires 2014, 70 - 73.

Boutin C, Prost Boucle S, 2012 : Note de présentation : les zones de rejet végétalisées, Sciences eaux & territoire n°9 2012 p 36 à 43

Boutin C, Prost Boucle S, 2013 : Etat des lieux national des Zones de Rejet Végétalisées

Brix H., 1997: Do macrophytes play a role in constructed treatment wetlands? Water Science and Technology, 35, (5): 11-17, 61, 616-626.

Desalme S, Dalix T & al. , 2011 : Choix du broyeur en vue de l'analyse d'éléments en traces dans les plantes, Cah. Tech. Inra, 72, 19-30.

Garg P & al., 1995: Toxicity and Accumulation of Chromium in *Ceratophyllum demersum* L, Bulletin of environmental contamination and toxicity, 44, 473-478.

Johnson Jane M- P, Morgan J, 2010 : Sampling Protocols. Chapter 2. Plant Sampling, Sampling Protocols, R.F Follet, 2-1 _ 2-10.

Keskinkan O & al., 2004 : Heavy metal adsorption properties of a submerged aquatic plant (*Ceratophyllum demersum*), Bioresource Technology, 92 ,197–200.

Membres de l'atelier ZRV du groupe de travail EPNAC, 2014 : Lumière sur le véritable rôle des végétaux dans le traitement des eaux usées »,4p. http://epnac.irstea.fr/wp-content/uploads/2015/01/Role-des-vegetaux-dans-le-traitement-des-eaux-usees_EPNAC_2014.pdf

Membres de l'atelier ZRV du groupe de travail EPNAC, 2015 : Classification des zones de Rejet Végétalisées (ZRV),1p. http://epnac.irstea.fr/wp-content/uploads/2015/10/20151009_Classification-des-ZRV_EPNAC_2015.pdf

Ministre de l'écologie, du développement durable et de l'énergie, Arrêté du 21 juillet 2015 relatif aux systèmes d'assainissement collectif et aux installations d'assainissement non collectif, à l'exception des installations d'assainissement non collectif recevant une charge brute de pollution organique inférieure ou égale à 1,2 kg/j de DBO₅, JORF n°0190 du 19 août 2015, page 14457
<http://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2015/7/21/DEVL1429608A/jo>

Liste des illustrations

Figure 1 : Les différents types de ZRV selon la classification EPNAC (atelier ZRV EPNAC, 2015).	7
Figure 2 : Prélèvement d' <i>Azolla filiculoides</i> à l'aide d'un quadrat flottant.....	11
Figure 3 : <i>Ceratophyllum demersum</i>	12
Figure 4 : prélèvement de <i>Phragmites australis</i>	13
Figure 5 : Séparation des feuilles et tiges de <i>Phragmites australis</i>	18
Figure 6 : Biomasse immergée et souterraine de <i>Typha latifolia</i>	19
Figure 7 : Etuve de séchage.....	20
Figure 8 : Macrophytes à feuilles flottantes broyés	22
Figure 9 : Plan de la ZRV de Marguerittes	23
Figure 10 : Cartographie des prélèvements de végétaux sur la ZRV de Marguerittes lors de la campagne d'octobre 2015	25
Tableau 1 : Avantages et inconvénients des principales méthodes de broyage pour les végétaux.....	22
Tableau 2 : Organisation des prélèvements de biomasse végétale lors de la campagne d'octobre 2015 sur la ZRV de Marguerittes.....	24

Annexes

Annexe I : Liste du matériel nécessaire pour réaliser des prélèvements de végétaux sur une ZRV en vue de l'estimation de la biomasse exportable.

In situ :

- Carte de la ZRV
- Waders
- Gants montants
- Jalons de fer (4)
- Quadrat flottant PVC de dimension adapté (et de préférence démontable)
- Épuisette d'aquarium
- Tasseau gradué
- Cisaille
- Bêche de jardinier
- Sécateur
- Papier absorbant
- Seau
- Brosse
- Sacs plastiques (110 L)
- Etiquettes
- Fiches de terrain
- Marqueur indélébile
- Poubelle (transport)
- GPS
- Embarcation légère
- Râteau
- Appareil photo

Ex situ :

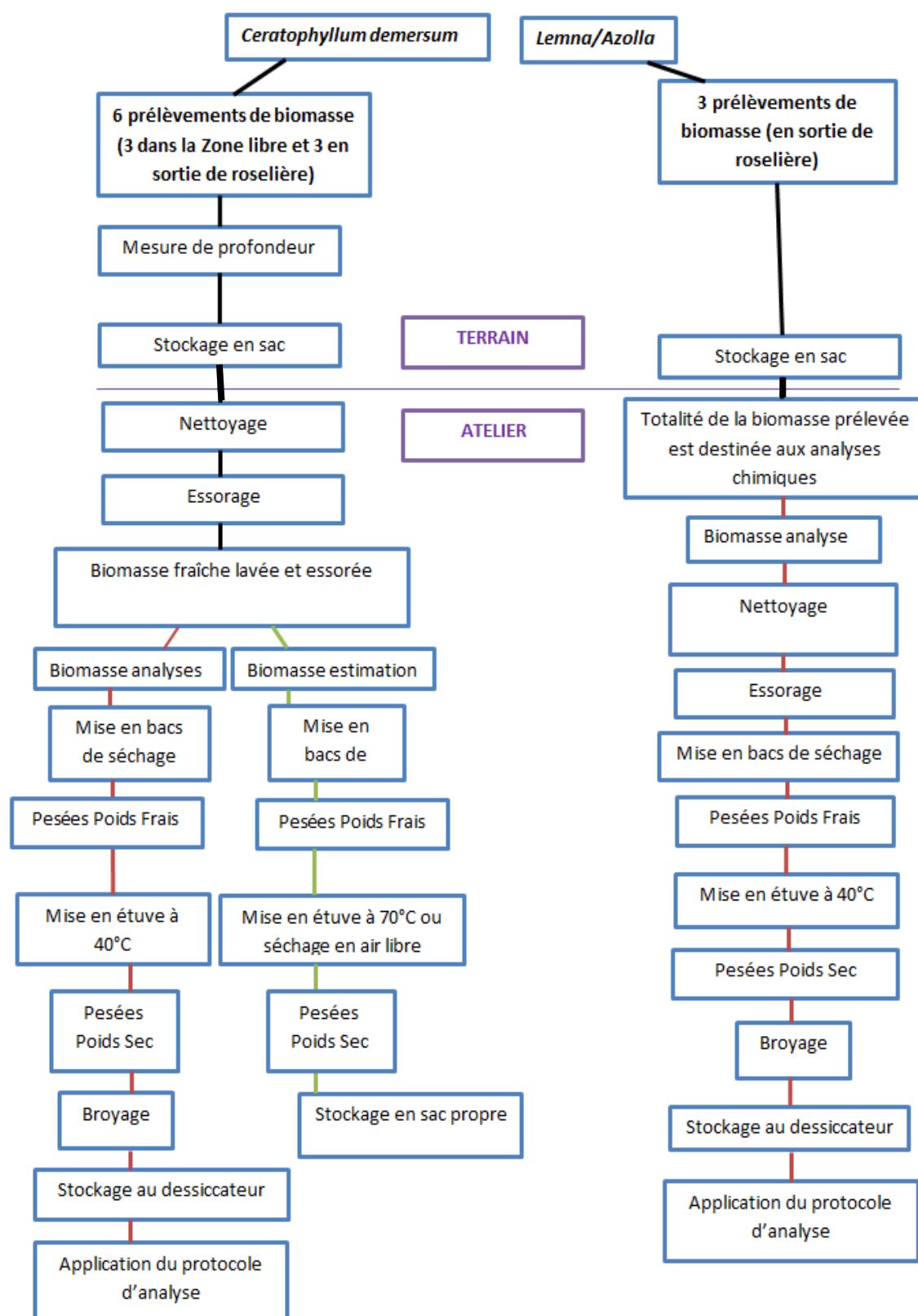
- Gant de laboratoire
- Bacs de séchage (1 ou 2 L)
- Épuisette d'aquarium
- Sécateur
- Ciseau et couteau (inox ou matériau non contaminant)
- Tamis
- Bac de lavage
- Essoreuse (type essoreuse à salade)
- Housses en tissus
- Étuves ventilées
- Marqueur indélébile
- Eau distillée
- Papier absorbant
- Etiquettes
- Balance (de précision au 0,1 gramme)
- Sacs plastiques propres
- Broyeur adapté aux analyses
- Brosse
- Flacons en verre 125 ml
- Dessiccateurs

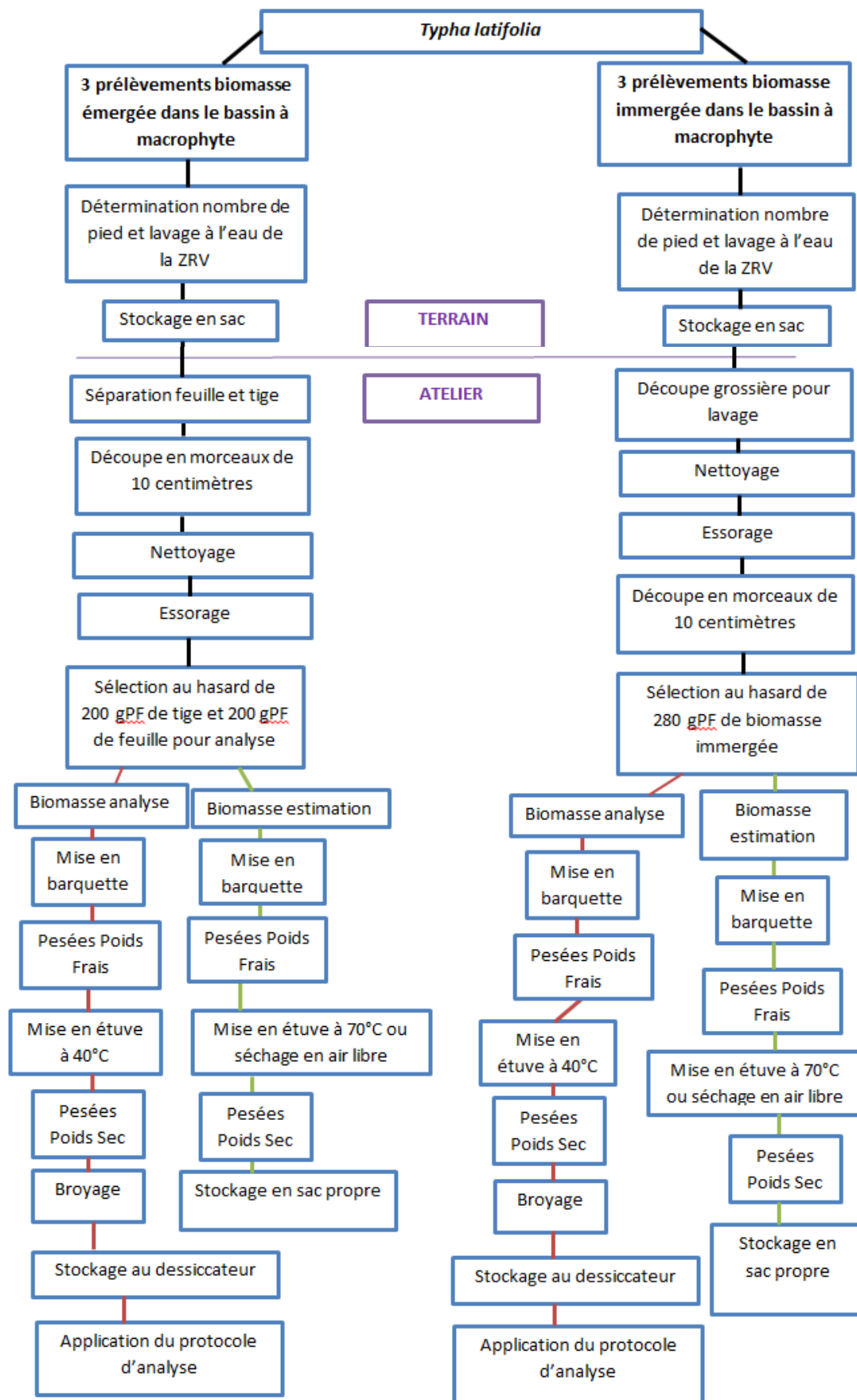
Annexe II : Exemple de tableur de traitement des données de séchage et d'estimation de biomasse.

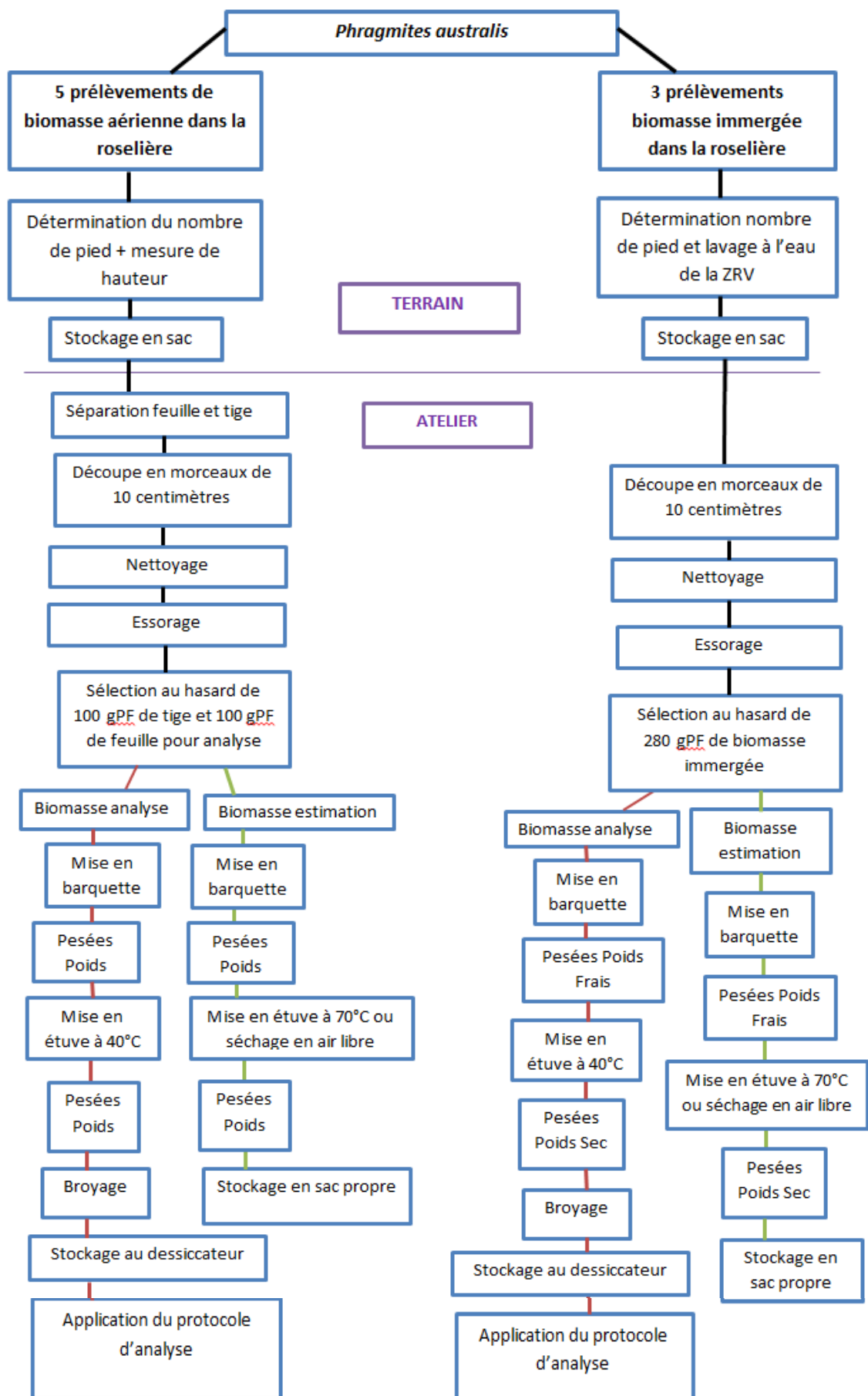
N°bac	Tare (g)	PF (g)	espèce	nature de la biomasse	prélèvement	T°C	analyse	début séchage	Pesée 1 : 20/10/2015		Pesée 2 : 26/10/2015	
									a*	b*	a	b
1	12,67	114,86	CD	plante entière	6	70	BIO	15/10/2015	25,76	25,76	25,62	25,63
2	12,73	127,58	CD	plante entière	3	70	BIO	15/10/2015	24,12	24,13	24,20	24,21
3	12,58	118,81	CD	plante entière	6	70	BIO	15/10/2015	26,71	26,72	26,69	26,70
55	12,39	156,87	TL	feuilles	1	40	CHIMIE	19/10/2015	70,33	70,33	41,61	41,62
56	12,43	218,71	TL	tiges	1	40	CHIMIE	19/10/2015	113,57	113,58	56,99	56,99
76	12,56	117,65	PA	tiges	3	40	CHIMIE	20/10/2015	115,92	115,91	50,35	50,34

**Le poids de chaque barquette de séchage est ici mesuré 2 fois à chaque pesée.*

Annexe III: Organisation des travaux réalisés lors de la campagne d'octobre 2015 sur la ZRV de type bassin de Marguerittes (30).







Onema

Hall C – Le Nadar
5, square Félix Nadar
94300 Vincennes

01 45 14 36 00

www.onema.fr

Irstea – Centre de Lyon-
Villeurbanne

5, rue de la Doua
CS 70077
92626 Villeurbanne Cedex

04 72 20 87 87

<http://www.irstea.fr/>