

## 4.1.2.-4.2.1. Systèmes d'estimation intégrative de la contamination par les micropolluants et de leur biodisponibilité

M.-H. Tusseau-Vuillemin<sup>1</sup>, Cécile Miège<sup>2</sup>, Catherine Gourlay<sup>3</sup>, Rodolphe Gilbin<sup>1</sup>, Corinne Ravelet<sup>2</sup>, Françoise Elbaz-Poulichet<sup>4</sup>, Jean-Luc Seidel<sup>4</sup>, Jeanne Garric<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Cemagref - QHAN, Parc de Tourvoie, BP 44, 92 163 Antony cedex ( <mailto:marie-helene.tusseau@cemagref.fr> )

<sup>2</sup> Cemagref - QELY 3 bis quai Chauveau, CP 22, 69 364 Lyon cedex 9

<sup>3</sup> ENPC-CEREVE, 6-8 avenue B. Pascal, cité Descartes 77455 Marne la vallée cedex 02

<sup>4</sup> Hydrosociences, UMR 5569 CNRS-UM2-IRD, Maison des Sciences de l'Eau de Montpellier, ISTEEM-UM2 c.c. MSE 34095 MONTPELLIER Cedex 5

Piren-Rapport-Tusseau-412-421-2003-03-11.doc

4.1.2.-4.2.1. Systèmes d'estimation intégrative de la contamination par les micro-polluants et de leur biodisponibilité.....	1
1. Contexte .....	1
2. Mesure intégrative des métaux biodisponibles par DGT (Diffusion Gradient in Thin Films).....	2
2.1. Mise en œuvre au laboratoire de la mesure DGT .....	2
2.2. Evaluation de la pertinence biologique de la mesure DGT (cas du cuivre) .....	4
2.2.1 Protocole des biotests .....	4
2.2.2 Croisement des informations chimiques et biologiques .....	5
2.2.3 Résultats obtenus avec de la matière organique d'origine naturelle.....	6
2.3. Premiers essais de mesure en Seine (juillet 2002).....	8
3. Évaluation des contaminants organiques biodisponibles dans l'eau : mesure in situ et analyse de l'influence de la matière organique du milieu.....	12
3.1. Contexte de l'étude: le modèle du polluant libre.....	12
3.2. Mesure de biodisponibilité in situ: mise en œuvre de la technique SPMD (Semi-Permeable membrane Device) .....	13
3.2.1 Principe de la SPMD .....	13
3.2.2 Expérimentations en laboratoire : calibration de la technique SPMD.....	14
3.2.3 Expérimentations in situ : état de l'art.....	16
3.2.4 Nos premières mesures de terrain.....	19
3.3. Rôle de la matière organique dissoute sur la biodisponibilité des HAP.....	21
3.3.1 Problématique et démarche .....	21
3.3.2 Matériel et méthodes .....	21
3.3.3 Capacité de diverses MO à influencer la bioaccumulation des HAP .....	22
3.3.4 Evolution de $K_{DOC}(biol)$ au cours de la dégradation des matières organiques .....	23
3.3.5 Conclusions et perspectives.....	24
3.4. Evaluation de la représentativité de la mesure de la fraction biodisponible par SPMD.....	24
3.4.1 Principe de la comparaison.....	24
3.4.2 Résultats .....	25
3.5. Perspectives pour l'étude du rôle de la MOD .....	25
4. Bibliographie.....	26

### 1. Contexte

Il est désormais bien connu que l'effet biologique des contaminants diffère, à concentration équivalente, d'un environnement à un autre, notamment en présence de matière organique. Les premières observations de ce type ont été réalisées sur les métaux (voir la synthèse de Campbell, 1995

sur le sujet), mais plus récemment, il est apparu que la biodisponibilité des micro-polluants organiques était également affectée par la matière organique en solution (Haitzer et al., 1998).

Les deux graphes de la Figure 1 illustrent, pour le cuivre et le Benzo(a)pyrène, la variation de la toxicité aiguë ou de la bioaccumulation du contaminant pour *daphna magna* (Gourlay et al., 2003 et résultats Cemagref).

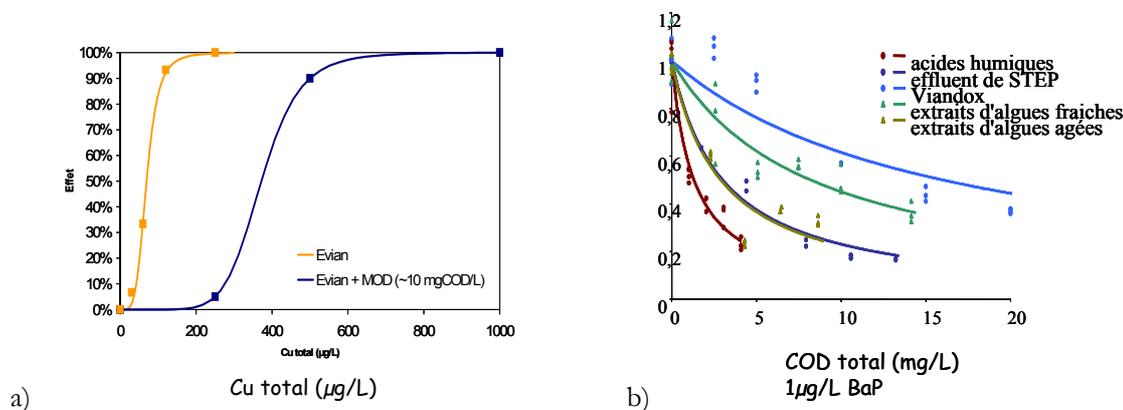


Figure 1. Modification de la biodisponibilité du cuivre et du benzo(a)pyrène en présence de matières organiques dissoutes de différentes origines. A) toxicité aiguë du cuivre pour *daphna magna*, b) bioaccumulation relative du B(a)P par *daphna magna*.

Il apparaît, sur ces expériences de laboratoire, qu'une même teneur en contaminant peut entraîner de 0 à 100% de mortalité, ou bien une bioaccumulation variant de 80% en fonction de la présence de matière organique (dissoute dans ce cas). La concentration en contaminant ne peut donc être considérée comme un bon indicateur de la capacité d'un milieu aquatique à soutenir une activité biologique, voire à engendrer un bon état écologique. Ce paramètre global ne peut donc pas non plus être retenu pour fixer les normes de rejet visant à garantir un niveau d'état écologique.

Dans le but de définir des critères physico-chimiques cohérents avec les critères biologiques permettant de définir l'état écologique d'un cours d'eau (cf. Directive Cadre Européenne), nous avons évalué deux techniques récentes permettant de séparer et de concentrer in situ les espèces réputées biodisponibles des micro-polluants métalliques et organiques hydrophobes. Les techniques ont été testées en laboratoire pour leur fiabilité et leur reproductibilité, ainsi que pour leur pertinence par rapport à un effet biologique. Pour bien connaître la représentativité de ces techniques chimiques en relation avec les teneurs dissoutes totales et avec la biodisponibilité des polluants, il a été nécessaire d'évaluer la réponse des organismes aux polluants en présence de différents types de matières organiques que l'on rencontre dans le bassin de la Seine.

De plus, un premier déploiement dans la Seine a permis de mettre en évidence les éventuelles difficultés rencontrés lors du passage dans le milieu naturel et de mettre en place les collaborations nécessaires à la poursuite des expériences.

## 2. Mesure intégrative des métaux biodisponibles par DGT (Diffusion Gradient in Thin Films)

Les premiers essais au laboratoire sont tout d'abord présentés, puis viennent les premiers résultats obtenus sur la Seine au cours d'une campagne exploratoire.

### 2.1. Mise en œuvre au laboratoire de la mesure DGT

La DGT est composée d'un gel de résine chélatante (Chelex) qui piège les métaux parvenant à son voisinage, et un gel de diffusion qui contraint cinétiquement le transfert des métaux depuis la solution vers la résine (Figure 2).

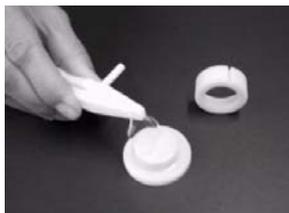


Figure 2. Mise en place des différents gels sur une DGT.

Les métaux s'accumulent sur la résine à une vitesse proportionnelle à la concentration en métaux labiles dans la solution. On calcule cette concentration à partir de l'analyse du contenu en métaux accumulés pour un temps donné (eq. ci-dessous). C'est l'un des grands avantages de la DGT qui permet de détecter des métaux en très faibles concentrations en laissant le système accumuler suffisamment longtemps pour dépasser les limites de détection. De plus, l'analyse se faisant après élution de la résine dans l'acide, on s'affranchit des difficultés induites par la matrice organique présente dans les eaux naturelles. L'accumulation linéaire en fonction du temps est représentée sur la Figure 3. La masse de métal fixée dans la résine est obtenue par le calcul suivant, après élution dans l'acide nitrique molaire :

$$M = \frac{C_e (V_{HNO3} + V_{res})}{f_e}$$

où  $C_e$  est la concentration en cuivre dans l'éluat,  $V_{HNO3}$  le volume d'acide

ajouté,  $V_{res}$  le volume de la résine, estimé à 0,16 mL, et  $f_e$  le rendement de l'élution, typiquement 0,8 (Zhang and Davison, 1995). La concentration en métal labile mesurée par la technique DGT peut être déterminée avec la formule suivante, en reprenant les notations vues précédemment :

$$Cu_{DGT} = \frac{M \Delta g}{tAD}$$

avec  $\Delta g = 0,8$  mm pour la plupart des gels utilisés (+ 0,13 mm : filtre posé devant le gel),  $A = 3,14$  cm<sup>2</sup>, et  $D$  fourni par DGT Research Ltd. ( $5,42 \cdot 10^{-6}$  cm<sup>2</sup>/s pour Cu à 20 °C).

En pratique, les concentrations  $Cu_{DGT}$  ont été calculées de manière plus précise en prenant en compte trois mesures à trois durées d'immersion différentes (Figure 3), ce qui permet d'éliminer, le cas échéant, les valeurs aberrantes assez facilement.

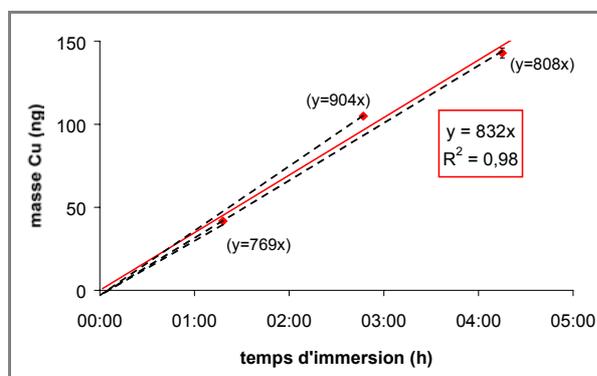


Figure 3. Exemple d'accumulation de métal sur la résine en fonction du temps

Le cuivre et le cadmium ont été testés sur des eaux minérales simples avec succès. Pour l'évaluation de la pertinence biologique, nous n'avons travaillé jusqu'à présent qu'avec le cuivre, qui est un métal particulièrement adapté à cette problématique (toxique à faibles doses et facilement complexé par la matière organique). L'eau minérale d'Evian a été spécialement utilisée pour ces tests dans la mesure où elle est compatible avec les biotests. Les résultats de la Figure 4 montrent que le cuivre est labile à 90% +/- 10% dans l'eau d'Evian. Dans cette eau minérale, aux concentrations utilisées, le cuivre se trouve à 75% sous forme de complexes de carbonates, et seulement 6% sous forme de cuivre libre.

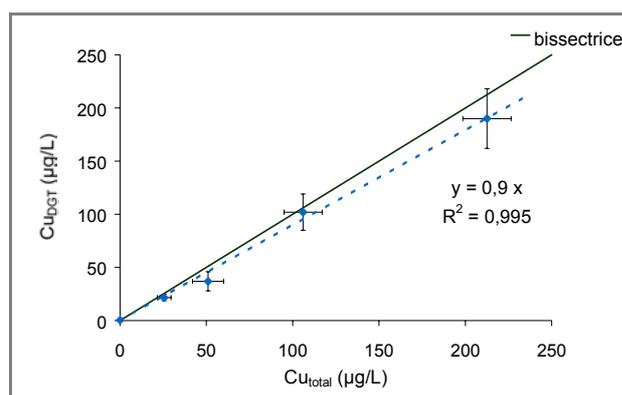


Figure 4. Corrélation entre le cuivre labile et le cuivre total dissous dans l'eau d'Evian.

Des gels de diffusion restrictifs, à taille de pores réduite, ont été utilisés en comparaison avec les gels utilisés classiquement, dans le cas des matrices organiques (acides humiques ou extraits d'algues). En effet, l'utilisation de ce type de gels dans le dispositif DGT permet d'isoler une fraction qui se rapproche de la fraction inorganique : les pores, plus petits (< 1 nm), laissent diffuser moins facilement les molécules organiques de grande taille (Zhang and Davison, 2000 ; Zhang and Davison, 2001), ce qui réduit considérablement leur potentiel de labilité (Tusseau-Vuillemin et al., 2003).

## 2.2. Evaluation de la pertinence biologique de la mesure DGT (cas du cuivre)

Depuis une vingtaine d'années, on considère que le paramètre explicatif de la biodisponibilité d'une solution métallique est la concentration en métal cationique libre, sauf exceptions notoires (e.g. le méthyl-mercure, les complexes de la glycine). Le FIAM (« Free Ion Activity Model », Morel, 1985), puis le BLM (« Biotic Ligand Model », ), fournissent le cadre conceptuel d'interprétation de très nombreuses expériences portant sur la biodisponibilité des métaux en présence de ligands. La concentration en ion libre représente en fait la réactivité du métal par rapport à des ligands potentiels, parmi lesquels la membrane biologique. C'est ainsi que le formalisme de l'ion libre a pu être étendu à celui du modèle du ligand biologique qui représente l'organisme comme une collection de sites de complexation pour le métal. Ce modèle permet d'expliquer pourquoi les métaux sont également moins toxiques en présence de calcium, car le calcium entre en compétition avec le métal pour les sites biologiques.

La question de la pertinence biologique de la mesure DGT repose donc sur deux enjeux scientifiques : le modèle de l'ion libre est-il respecté et la fraction labile de métaux mesurée par la DGT est-elle éloignée ou non de la fraction libre ? Nous avons choisi, dans un premier temps, un modèle biologique (daphnie) et un métal réputés pour généralement respecter le modèle de l'ion libre (Campbell, 1995).

### 2.2.1 Protocole des biotests

Les essais de toxicité du cuivre ont été réalisés dans les conditions définies par la norme ISO (ISO, 1993). L'effet mesuré est l'inhibition de la mobilité des daphnies au bout de 24 h d'exposition, et on cherche à déterminer la concentration à 50 % d'effet (CE<sub>50</sub>-24h). Les daphnies utilisées doivent être des jeunes âgées de moins de 24 h ; elles ont été exposées à une gamme croissante de concentrations en cuivre, ainsi qu'à un témoin d'Evian, en 4 réplicats (bêchers + 3 tubes à essais contenant la même solution). L'effet inhibiteur a été déterminé visuellement en observant le nombre de daphnies incapables de se déplacer dans les 15 secondes qui suivent une légère agitation du récipient. Les résultats d'un test sont considérés comme valides si le pourcentage d'inhibition observé dans les récipients témoins est inférieur ou égal à 10 %. Par ailleurs, pour un contrôle de la sensibilité de la souche de *Daphnia magna* utilisée, on détermine périodiquement la CE<sub>50</sub>-24h du dichromate de potassium, qui doit être comprise entre 0,9 et 2,4 mg/L. Les résultats sont exprimés sous la forme d'une courbe dose-réponse ajustée aux données selon un modèle de Hill grâce au logiciel

d'optimisation non linéaire Regtox (aimablement fourni par Eric Vindimian, INERIS). La courbe dose-réponse obtenue avec le cuivre dans l'eau d'Evian figure ci-dessous.

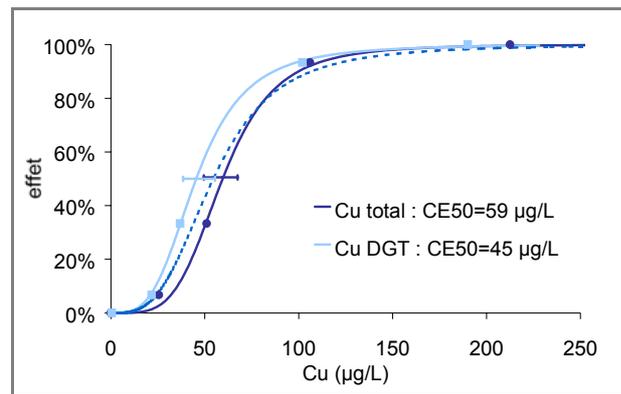


Figure 5. Courbes dose-réponse obtenues avec le cuivre dans l'eau d'Evian, exprimées en cuivre labile ou total. Le pointillé représente la courbe ajustée obtenue en mêlant les deux jeux de données (labile et total dissous).

### 2.2.2 Croisement des informations chimiques et biologiques

La  $DL_{50}$  dans l'eau d'Evian est de l'ordre de 50 µg/L, ce qui correspond à environ 3µg/L de cuivre libre (selon la spéciation évaluée avec le logiciel MINTEQ). Dans la suite, nous allons comparer les courbes dose-réponse obtenues avec le cuivre dans de l'eau d'Evian additionnée de différents ligands avec la courbe de référence (Figure 5) en faisant l'hypothèse qu'un même effet observé est déclenché par une même concentration en cuivre libre. Par exemple, on fait l'hypothèse que l'effet 50% de mortalité est obtenu avec environ 3µg/L de cuivre libre, en présence ou en absence de ligands organiques.

En comparant les courbes exprimées en cuivre total dissous, on observe si le ligand ajouté a un effet protecteur (même effet obtenu avec une concentration supérieure à celle de la courbe de référence). En comparant les courbes exprimées en cuivre labile, on observe si les complexes de cuivre avec le ligand ajouté sont labiles ou non. Si la courbe dose-réponse exprimée en cuivre labile se rapproche sensiblement de la courbe de référence, cela signifie que la mesure chimique permet de rendre compte d'un effet biologique en utilisant uniquement la courbe de référence. Les trois exemples ci-dessous permettent d'illustrer la méthodologie (Figure 6 et Figure 7).

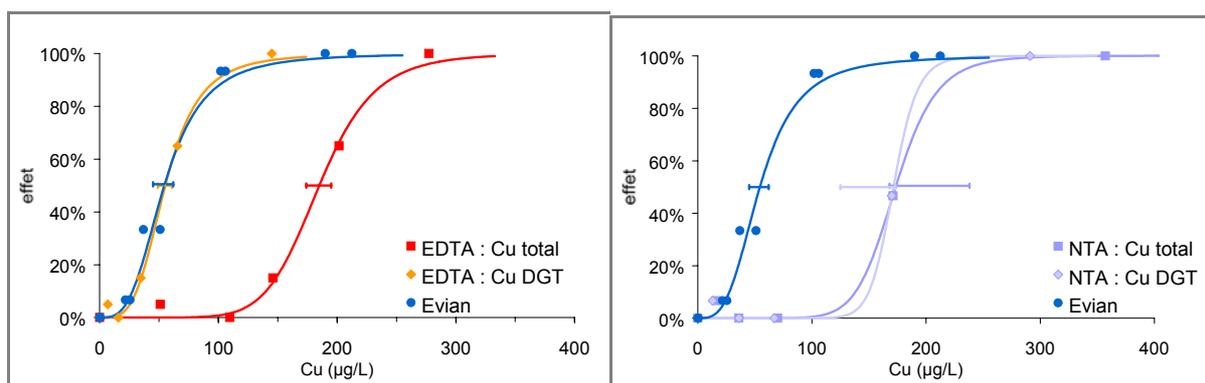


Figure 6. Courbes dose-réponse obtenues en présence de cuivre et d'EDTA (gauche) ou de NTA (droite), exprimées en cuivre labile et en cuivre total dissous et comparées à la courbe de référence dans l'eau d'Evian.

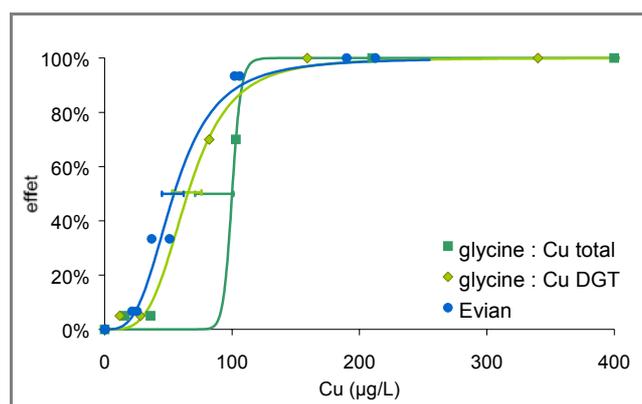


Figure 7. Courbes dose-réponse obtenues en présence de cuivre et de glycine, exprimées en cuivre labile et en cuivre dissous et comparées à la courbe de référence dans l'eau d'Evian.

La Figure 6 illustre deux cas de ligands artificiels complexant le cuivre et ayant un effet protecteur : les courbes dose-réponse exprimées en cuivre dissous sont décalées vers les fortes concentrations. Cet effet est bien connu pour ces deux ligands (Campbell, 1995), qui diffèrent radicalement par la labilité de leurs complexes avec le cuivre. On observe en effet que ces mêmes courbes dose-réponse exprimées en cuivre labile se recoupe avec celle de référence (cas de l'EDTA) ou au contraire reste superposée à celle exprimée en cuivre dissous (cas du NTA). Les complexes de l'EDTA sont inertes, alors que ceux du NTA sont complètement labiles. Ces différences de comportement s'expliquent à partir des constantes cinétiques de dissociation de ces complexes et des caractéristiques physiques du gel (Tusseau-Vuillemin et al., 2003). La mesure DGT permet de prévoir la toxicité d'une solution de cuivre et d'EDTA, alors qu'elle ne donne pas plus d'information que la mesure du cuivre dissous dans le cas du NTA.

La Figure 7 illustre encore un autre cas : l'ajout de glycine n'a que peu d'effet sur la toxicité du mélange. On peut même, sur la base des calculs de spéciation, supposer que les complexes du cuivre avec la glycine sont toxiques : un effet de 70% et obtenu avec une concentration de cuivre libre calculée inférieure à 0,5 µg/L, alors qu'en eau d'Evian, le même effet est obtenu avec une concentration en ion libre évaluée à environ 4 µg/L. La DGT mesure une partie des complexes du cuivre avec la glycine, mais l'interprétation biologique est impossible du fait que nous sortons du cadre de l'ion libre.

### 2.2.3 Résultats obtenus avec de la matière organique d'origine naturelle

La matière organique d'origine naturelle se compose d'un mélange de molécules diverses par leurs propriétés physico-chimiques. On s'attend donc à obtenir des réponses intermédiaires aux cas exposés ci-dessus. Les molécules naturelles étant souvent de taille importante, nous avons utilisé, en plus des gels classiques, des DGT montées avec des gels restrictifs, qui limitent la contribution des complexes de grande taille à la mesure (Zhang and Davison, 2001).

Les acides humiques ont été préparés à partir d'extraits de sol commercialisés (Aldrich ; préparation de la solution-mère : 250 mg/L dans de l'eau ultrapure sous agitation, puis filtration sur 0,45 µm après 72 h ; dilution au 1/10 de cette solution dans l'eau d'Evian). La matière organique issue des exsudats d'algues a été obtenue en autoclavant à 120 °C pendant 90 minutes des cultures de *Selenastrum capricornutum* (algues chlorophycées servant de nourriture aux daphnies) puis en filtrant sur 0,45 µm ; ces filtrats ont ensuite été dilués 2 ou 3 fois dans l'eau d'Evian. Deux sortes de matières organiques ont été testées à partir de deux cultures d'algues : une culture fraîche (densité 1,5 à 2 10<sup>7</sup> cellules/mL) d'une part, et une culture d'algues fanées d'autre part (cultivées pendant 2 à 3 semaines jusqu'à dégradation).

Les tests ont été réalisés dans de l'eau d'Evian additionnée de ces trois sortes de matière organique naturelle de manière à maintenir une concentration de carbone organique dissous de l'ordre de 10 mg/L. la Figure 8 reprend les concentrations de cuivre mesurées avec les différentes méthodes au cours des trois expériences. On observe que les concentrations en cuivre labile sont toujours

inférieures aux concentrations de cuivre total dissous et toujours supérieures aux concentrations en cuivre labile mesurées avec des gels restrictifs. Ces différences sont plus marquées pour les solutions d'acides humiques que pour les solutions d'exsudats d'algues. Les concentrations en COD sont un peu différentes d'une solution et d'un biotest à l'autre. On a pu observer un début de précipitation de la solution d'acides humiques à la plus forte concentration en cuivre (2000 µgCu/L), la concentration en COD diminuant de moitié. Cette solution n'a pas été retenue pour la suite de l'interprétation.

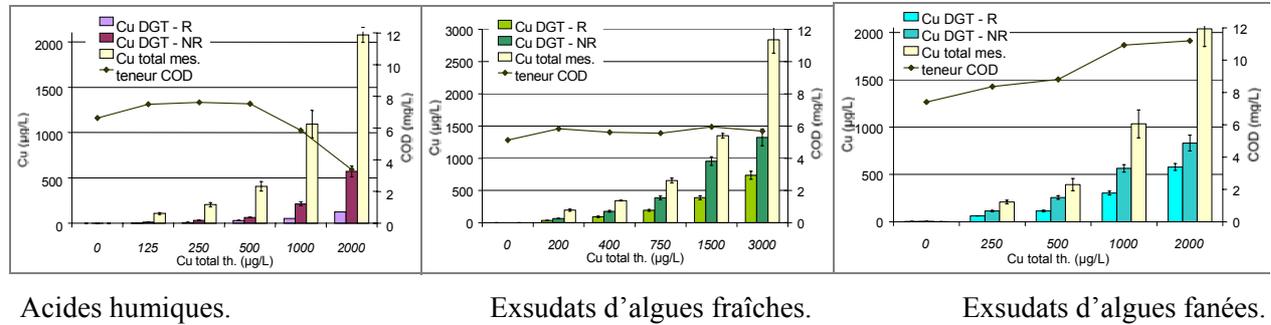


Figure 8. Comparaison des concentrations de cuivre total dissous, labile en DGT et labile en DGT restrictive (µgCu/L) mesurées dans les solutions utilisées pour le biotest. Concentrations de carbone organique dissous en mgC/L.

Sur la Figure 9, on a représenté les trois courbes dose-réponse issues de ces trois expériences (acides humiques, exsudats d'algues fraîches et fanées), ainsi que la courbe de référence obtenue dans l'eau d'Evian. Ces trois courbes sont exprimées en cuivre total dissous, labile et labile en gels restrictifs. On observe sur la figure de gauche que, pour des concentrations à peu près équivalentes de COD, les acides humiques sont les plus protecteurs vis à vis des daphnies, les exsudats d'algues fraîches ou fanées ayant à peu près le même effet. Les complexes du cuivre avec les acides humiques sont peu labiles (voire pas du tout en gels restrictifs). En revanche, les complexes du cuivre avec les exsudats d'algues sont assez labiles, surtout pour les algues fraîches. L'utilisation de gels restrictifs permet de mesurer moins de formes complexées (Figure de droite), mais l'efficacité est moindre envers les exsudats d'algues fraîches.

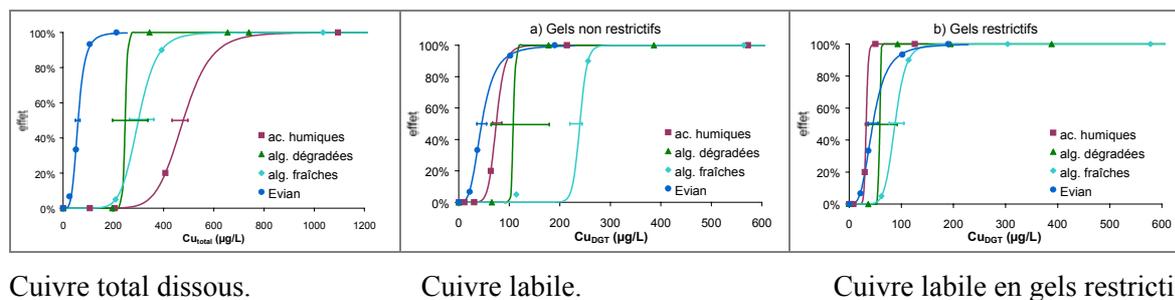


Figure 9. Courbes dose-réponse obtenues en présence d'acides humiques et d'exsudats d'algues, comparées à la courbe de référence dans l'eau d'Evian seule.

Ces essais in vitro confirment que la mesure des métaux avec la DGT permet de prévoir la toxicité d'une solution, dans la mesure où les complexes formés sont inertes (cas de l'EDTA et des acides humiques en gels restrictifs). Lorsque les complexes sont labiles, la mesure DGT est équivalente à la mesure du total dissous. Pour les molécules organiques artificielles, on dispose d'informations (constantes de stabilité thermodynamique et cinétiques) qui permettent d'estimer a priori la labilité des complexes. La matière organique que l'on trouve dans le milieu naturel est composée d'une grande variété de molécules pour lesquelles il est impossible de prévoir la labilité. Les essais réalisés au laboratoire avec des gels restrictifs montrent que les complexes du cuivre avec les acides humiques et les exsudats d'algues fanées sont très peu labiles. En revanche, les exsudats d'algues fraîches sont partiellement labiles. On utilisera donc ces derniers gels in situ pour mesurer les

métaux labiles, en sachant qu'en période de bloom algal, les concentrations mesurées surestimeront probablement la fraction biodisponible du cuivre.

### 2.3. Premiers essais de mesure en Seine (juillet 2002)

Des DGT ont été déployées (conjointement avec les SPMD, voir ci-dessous) en amont et en aval de Paris, au niveau des barrages du SNS de St Maurice (Marne) et d'Andrésy (Seine, aval de Seine aval). Trois séries de trois DGT ont été déployées, sur des périodes de 3, 5 et 8 jours, avec une sonde à température. Les objectifs de ce premier essai étaient d'évaluer la faisabilité de la mesure en termes de limite de détection, de durée de déploiement et de répétabilité. La Figure 10 montre par exemple l'importance du biofouling en été, après une semaine d'exposition. Il s'agissait également de mettre en place la collaboration avec le laboratoire Hydrosciences de Montpellier, qui s'est chargé de l'analyse des métaux dissous et labiles en ICP-MS.



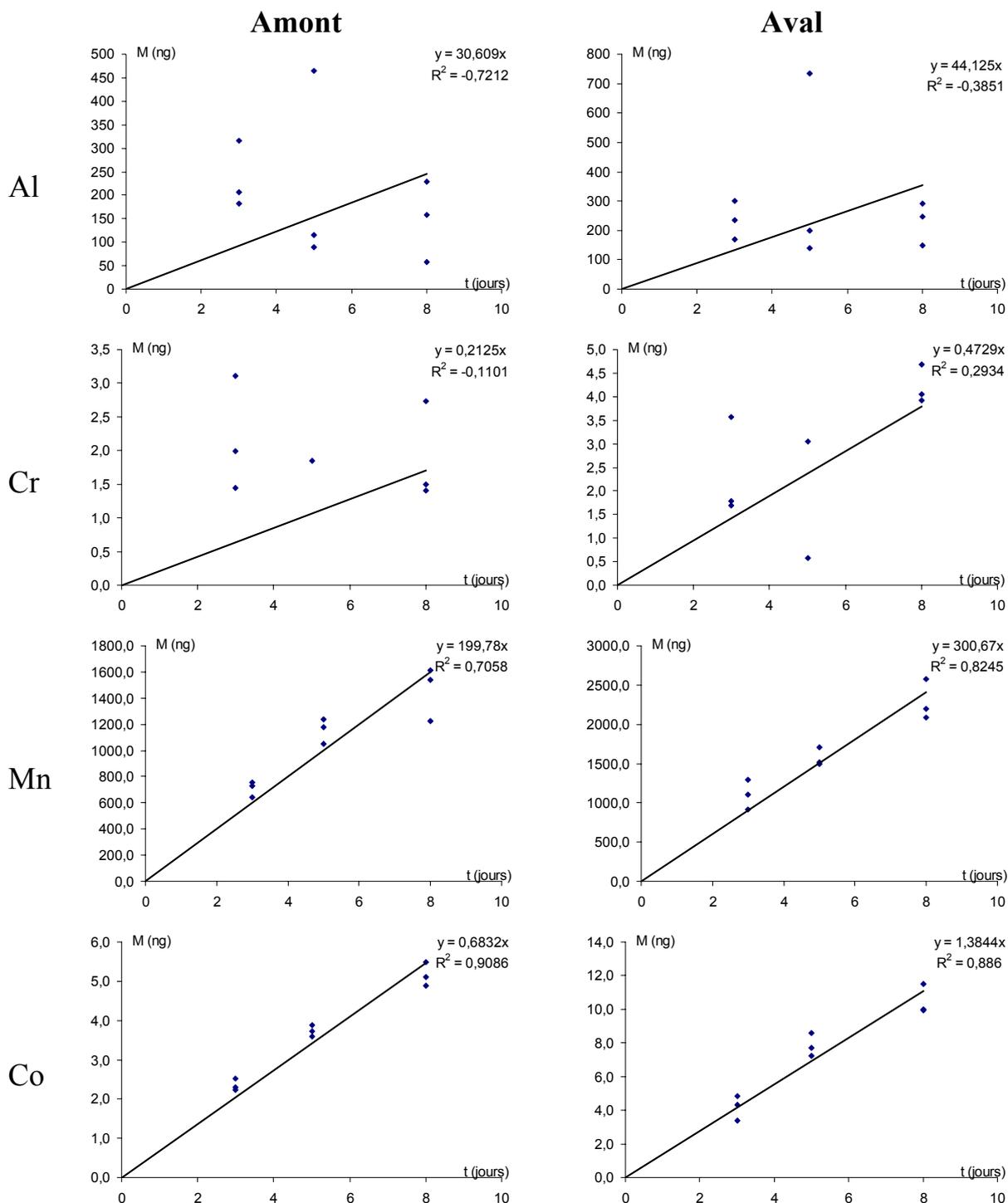
Figure 10. Photographies des dispositifs DGT et SPMD, avant et après déploiement d'une semaine dans la Seine.

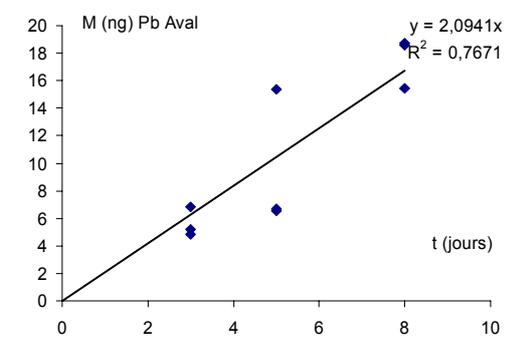
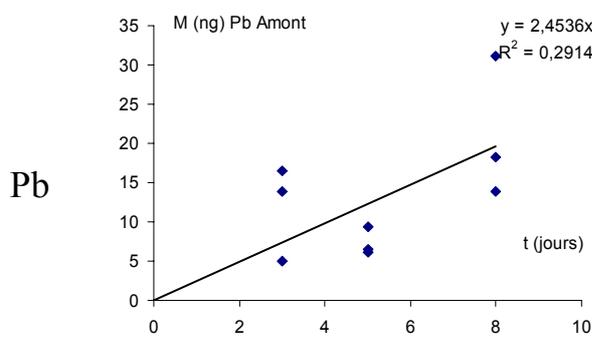
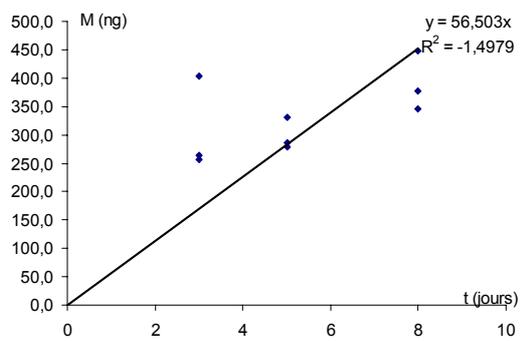
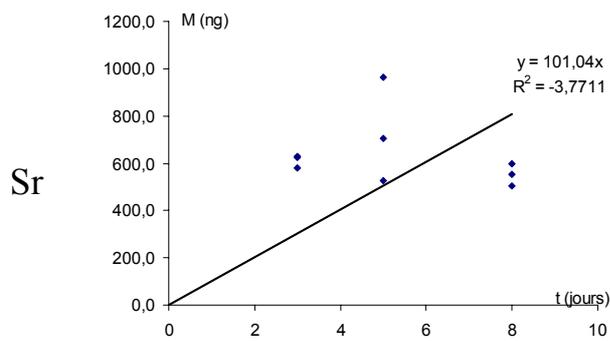
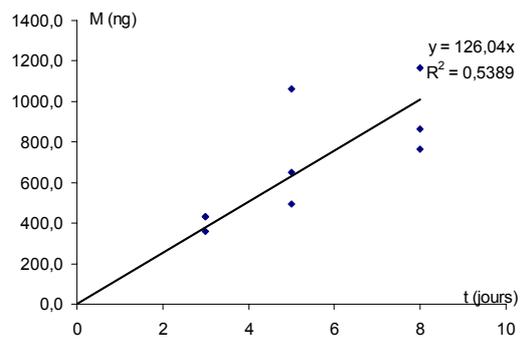
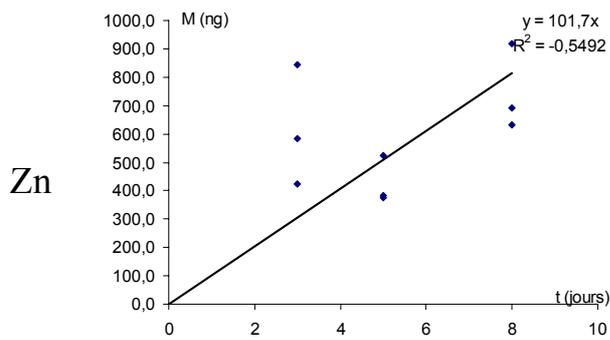
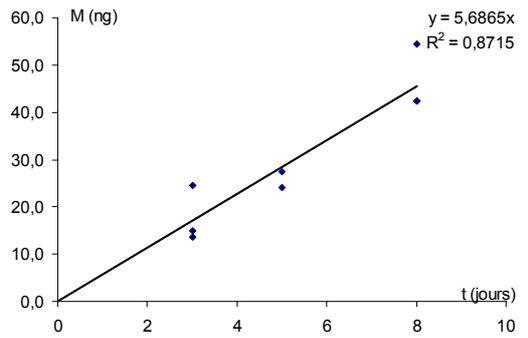
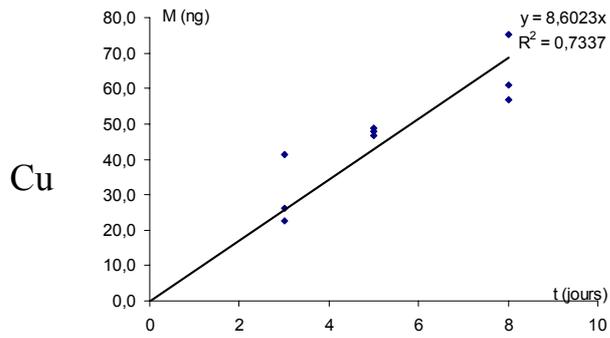
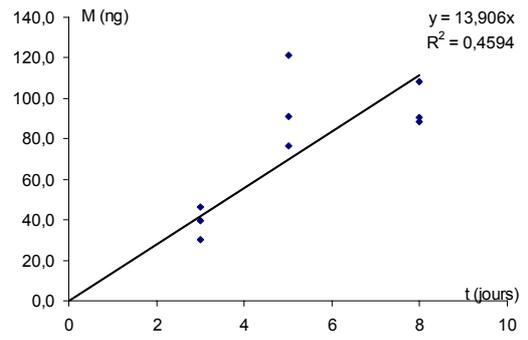
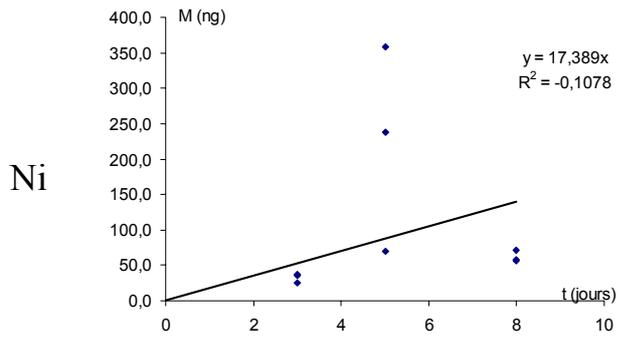
Une partie des mesures de métaux totaux dissous est comparée ci-dessous (Tableau 1) aux résultats obtenus lors des deux campagnes de 1993 et 1994 par le PIREN Seine (Meybeck et al., 1998). Les ordres de grandeur sont tout à fait similaires à pratiquement dix ans d'intervalle. Ce tableau permet en outre d'apprécier la répétabilité des résultats obtenus en 2002 ainsi que la variation amont-aval de Paris des éléments.

	Marne(Noisiel)		Seine(Ablon)		Seine(M. Laffite)		Seine(Poissy)		10/07/02		15/07/02		18/07/02	
	déc.93	mai 94	déc.93	mai 94	déc.93	mai 94	déc.93	mai 94	Amont	Aval	Amont	Aval	Amont	Aval
Li									6,81	6,02	5,36	5,79	5,53	5,64
B									62,8	98,1	55,9	95,2	54,8	93,0
V									2,13	2,03	2,05	2,14		
Cr													1,09	1,06
Mn													11,63	17,59
Co													0,22	0,33
Ni	1.35	0.78	0.83	0.68	1.34	0.88	1.81	2.54	2,1	2,4	1,4	3,8	1,2	15,5
Cu	1.07	1.72	2.64	2.76	1.10	1.38	2.54	1.90	1,88	2,20	1,89	1,72	1,60	2,57
Zn	4.47	1.12	5.58	1.52	3.90	1.85	5.68	4.79	4,4	10,1	5,4	14,0	6,4	10,0
As									1,30	1,46	1,19	1,47	1,12	1,28
Rb									2,13	3,78	2,10	3,84	1,91	3,65
Sr									1227,00	734,37	1125,70	738,96	1045,30	765,41
Mo									1,30	1,48	1,32	1,40	1,18	1,30
Cd	0.019	0.007	0.013	0.009	0.054	0.014	0.074	0.062	0,03	0,02	0,02	0,017		
Ba									39,33	32,85	33,03	36,44	37,95	32,39
Pb	0.170	0.026	0.100	0.104	0.170	0.103	0.250	0.348	0,12	0,27	0,14	0,34	0,14	0,41
U									0,91	1,02	0,85	1,08	0,86	1,03

Tableau 1. Métaux totaux dissous dans la Seine, d'après Meybeck et al., 1998 et cette étude.

L'ensemble des mesure du contenu des résines DGT est illustré sur la Figure 11. Onze métaux ont pu être analysés simultanément grâce à la collaboration avec le laboratoire Hydrosiences. Certains métaux ne sont pas facilement mesurables en DGT (ex. Sr, qui a une plus faible affinité pour la résine Chelex). D'autres sont sujets à des contaminations très faciles (Ni, Zn, Pb) auxquelles nous pouvons remédier. Les résultats de l'aluminium, du chrome et de l'uranium ne sont pas satisfaisants, sans que nous ayions pour l'instant d'interprétation complète à présenter. En revanche, les résultats obtenus pour le manganèse, le cobalt, le cuivre et le cadmium sont, dès la première campagne, très satisfaisants.





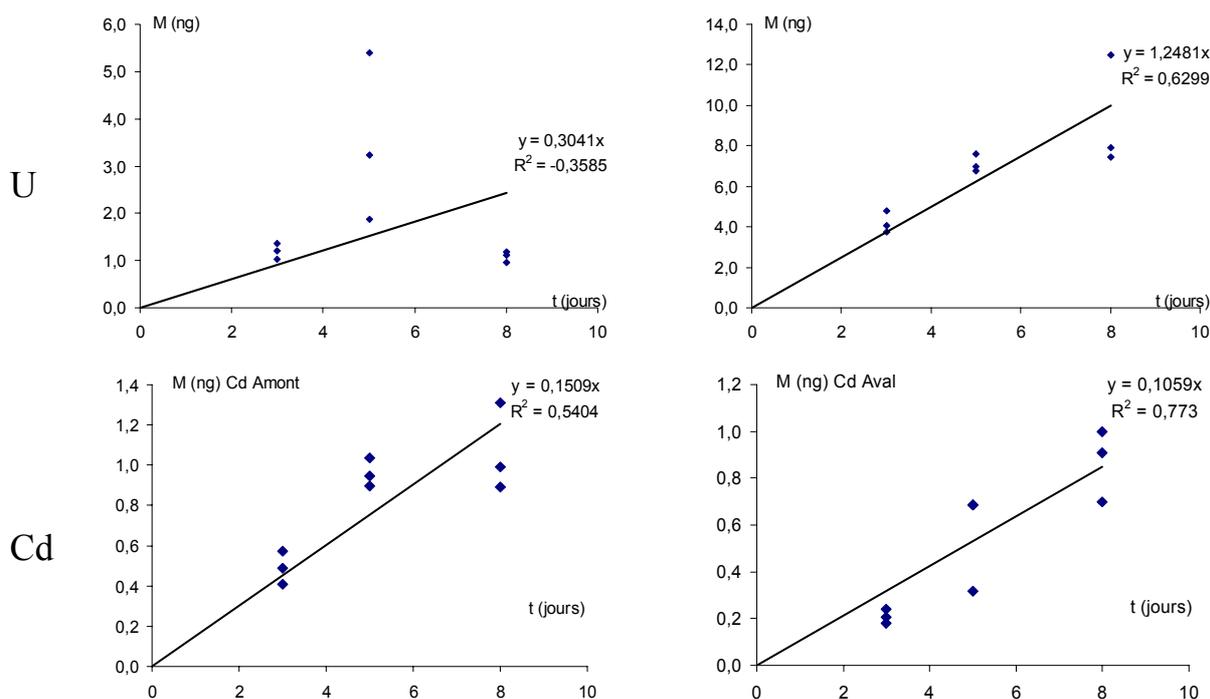


Figure 11. Masses de métaux accumulées sur les résines DGT en fonction de la durée de déploiement dans la Marne (amont) et dans la Seine (aval).

Sur la base de ces profils d'accumulation, les concentrations en métaux labiles ont été calculées, et comparées aux concentrations en métaux totaux dissous. Rappelons qu'en disposant d'une absorption atomique en four, dans des conditions standard de préparation des échantillons (c'est à dire sans salle blanche), on ne peut espérer mesurer de façon fiable des concentrations métalliques inférieures à 1 µg/L (les limites de détection varient selon les métaux, mais les problèmes de contamination prennent le relais de ces contraintes aux faibles concentrations). La pré-concentration *in situ* réalisée avec les DGT permet de gagner un ordre de grandeur par rapport à cette limite (conditions estivales, température de l'ordre de 18°C), et de ne mesurer que les métaux labiles. Ces mesures ont également été réalisées avec un ICP-MS, dont les limites de détection sont environ cent fois plus faibles que celles de l'absorption atomique, afin pouvoir détecter tous les métaux en une seule analyse et les comparer aux concentrations en métaux dissous.

		Al	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	Cd	Pb	
<b>Amont</b>										
Métal total dissous (<0.22µm)	10-juil	47	(6,01)	0,48	2,1	1,9	4,4	0,04	0,12	
	15-juil	58	15,46	0,55	1,4	1,9	5,4	0,04	0,14	
	18-juil	56	11,63	0,44				0,03		
	Moyenne	54	<b>13,54</b>	<b>0,49</b>	<b>1,7</b>	<b>1,9</b>	<b>4,9</b>	<b>0,04</b>	<b>0,13</b>	
	écart- type (n=3)	6		0,05	0,5	0,0	0,7	0,01	0,01	
Métal labile par DGT	3 jours	5	17,1	0,05	0,6	0,5	9,5	0,01	0,07	
		6	17,7	0,06	0,9	0,6	18,9	0,01	0,22	
		9	15,0	0,05	0,8	0,9	13,1	0,01	0,26	
	5 jours	8	16,7	0,05	5,1	0,6	5,1	0,01	0,09	
		2	17,5	0,05	1,0	0,6	5,2	0,01	0,05	
		2	14,8	0,05	3,4	0,6	7,1	0,01	0,05	
	8 jours	2	14,2	0,05	0,6	0,6	7,8	0,01	0,19	
		1	13,5	0,04	0,5	0,5	5,8	0,01	0,08	
		2	10,7	0,04	0,5	0,5	5,3	0,01	0,11	
		moyenne (*)		<b>12,0</b>	<b>0,04</b>	<b>0,6</b>	<b>0,5</b>	<b>4,4</b>	<b>0,01</b>	<b>0,11</b>
		Ecart- type (n=9)		2,3	0,005	1,6	0,1	4,6	0,002	0,08
		% tot		89%	8%	35%	27%	89%	31%	86%

		Al	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	Cd	Pb
<b>Aval</b>									
Métal total dissous (<0,22µm)	10-juil	37	(0,84)	0,515	2,4	2,2	10,1	0,03	0,27
	15-juil	31	10,93	0,430	3,8	1,7	14,0	0,02	0,34
	18-juil	46	17,65	0,554				0,04	
	moyenne	<b>38</b>	<b>14,29</b>	<b>0,500</b>	<b>3,1</b>	<b>2,0</b>	<b>12,0</b>	<b>0,03</b>	<b>0,30</b>
	écart- type (n=3)	8		0,063	1,0	0,3	2,7	0,01	0,05
Métal labile par DGT	3 jours	9	30,5	0,113	1,1	0,5	9,8	0,005	0,10
		5	26,2	0,101	1,0	0,3	9,9	0,005	0,06
		7	21,7	0,079	0,7	0,3	8,1	0,004	0,07
	5 jours	4	21,8	0,103	1,8	0,3	6,8	0,004	0,06
		2	21,4	0,109	1,3	0,4	14,7	0,009	0,06
		13	24,5	0,122	1,1	err.	9,0	0,009	0,15
	8 jours	3	18,6	0,088	0,8	0,4	7,4	0,009	0,11
		3	23,0	0,101	1,0	0,5	6,6	0,008	0,09
		2	19,5	0,087	0,8	0,4	10,0	0,006	0,11
	moyenne (*)		<b>19,0</b>	<b>0,091</b>	<b>0,9</b>	<b>0,4</b>	<b>7,7</b>	<b>0,007</b>	<b>0,11</b>
	écart- type (n=9)		3,6	0,014	0,3	0,1	2,4	0,002	0,03
	% tot		130%	21%	28%	20%	64%	23%	37%

(\*) C DGT moyenne calculée à partir de la pente de  $M=f(t)$  ; écart-type sur les 9 mesures (trois temps x triplicats) ; % tot = métal labile / métal total dissous.

Tableau 2. Concentrations en métaux totaux dissous et labiles mesurés en Marne (amont) et en Seine (aval) lors de la campagne de juillet 2002.

La spéciation entre labile et total dissous est extrêmement variable d'un métal à un autre (Tableau 2). Cobalt, cuivre et cadmium sont les éléments les moins labiles. Le manganèse, au contraire, apparaît très fortement labile. Enfin, le plomb apparaît très fortement labile en amont, et bien moins en aval. La concentration en plomb labile est en effet équivalente en amont et en aval de Paris, alors que le total dissous augmente nettement. Ces résultats de spéciation ont été obtenus alors que la concentration en carbone organique dissous de la Seine était peu variable d'un site et d'un jour à l'autre, de l'ordre de 3 mgC/L. Les concentrations en chlorophylle signaient un léger bloom sur la Marne (~4 mg/L), atténué au niveau d'Andrésey (~2 mg/L).

Ces comportements variables, ainsi que la signification des concentrations labiles en terme de biodisponibilité in situ seront examinés dans le détail au cours de l'année 2003. Un suivi saisonnier en trois points (St Maurice, Andrésey et le bassin de l'Orgeval, comme référence forestière) permettra d'évaluer la variabilité. De plus, la qualité de la matière organique dissoute sera étudiée dans le détail au moyen de fractionnements sur résines et d'analyse élémentaire.

### 3. Évaluation des contaminants organiques biodisponibles dans l'eau : mesure in situ et analyse de l'influence de la matière organique du milieu

#### 3.1. Contexte de l'étude: le modèle du polluant libre

De même que pour les métaux, La biodisponibilité des polluants organiques hydrophobes dépend des caractéristiques physico-chimiques du milieu. La Figure 1 nous montre que, pour une même concentration totale dans un milieu, la bioaccumulation de benzo[a]pyrene peut diminuer de 80 % en présence de matière organique dissoute.

Il a été montré par ailleurs que le paramètre « matière organiques dissoute » était le principal facteur d'influence de la biodisponibilité des contaminants organiques dans l'eau (Haitzer et al, 1998). L'hypothèse généralement formulée est que les micro-polluants associés à la matière organique dissoute forment des structures trop importantes pour traverser les membranes biologiques (Landrum P.F., 1985). Ainsi, seul le micro-polluant organique "libre" ou associé à des structures organiques de

petite taille pouvant traverser la membrane biologique serait biodisponible (seuil de coupure de l'ordre de 10 Å ou 1000 daltons). Par analogie avec le modèle développé pour les métaux, nous appelons cette hypothèse, le modèle "du polluant libre".

Dans cette première partie de l'étude, nous avons cherché à la fois à mieux comprendre le rôle des matières organiques susceptible d'être présentes dans la Seine sur la biodisponibilité des polluants organiques hydrophobes, et à développer un outils opérationnel de mesure in situ des concentrations biodisponibles de ces contaminants. Les contaminants organiques étudiés dans un premier temps sont des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) : le fluoranthène, le pyrène, le benzo(b)fluoranthène, le benzo(a)pyrène et le benzo(e)pyrène. Les HAP sont des contaminants ubiquistes dont la toxicité est aujourd'hui avérée (contaminants cancérogènes et mutagènes). Constitués de cycles benzéniques, les HAP sont très hydrophobes, (coefficient de partage eau-octanol :  $\log K_{OW}$  de 5,2 à 6,4 pour les 5 HAP sélectionnés), ce qui leur confère une forte tendance à s'adsorber sur les MOD et contaminer les organismes biologiques. Cependant et bien que nous nous limitons à cette classe de polluants organiques pour la mise au point méthodologique, les techniques développées ont pour but l'étude des polluants organiques hydrophobes de façon plus large.

### 3.2. Mesure de biodisponibilité in situ: mise en œuvre de la technique SPMD (Semi-Permeable membrane Device)

#### 3.2.1 Principe de la SPMD

Nous avons mis en œuvre la technique de Semi-Permeable Membrane Device (SPMD). Développée par Huckins en 1990, la SPMD est un outil de mesure chimique qui vise à mesurer simplement les fractions biodisponibles de polluants organiques in situ. C'est également une technique intégrative d'échantillonnage permettant de déceler la trace de pics de pollution et de concentrer les polluants améliorant ainsi leur détection (les seuils analytiques usuels sont dépassés).

Un SPMD consiste en un sac membranaire semi-perméable renfermant une masse lipidique (Huckins J.N. et al, 1990; Huckins J.N. et al 1993). Les pores de la membrane ont un diamètre de l'ordre de 10 Å, 1000 daltons, voisin du diamètre des pores des membranes biologiques. Le dispositif, assimilé à un organisme synthétique, est immergé dans le milieu aquatique et accumule les contaminants organiques non ioniques, de taille inférieure à 10 Å ou 1000 daltons (fraction supposée être la fraction biodisponible) et de  $\log K_{OW} > 1$ , Figure 12. Après exposition, les SPMD sont prélevés, la membrane extérieure est rincée pour éliminer la fraction de contaminants adsorbée. Les dispositifs sont alors soumis à une extraction par dialyse puis une analyse chromatographique pour le dosage des contaminants accumulés.

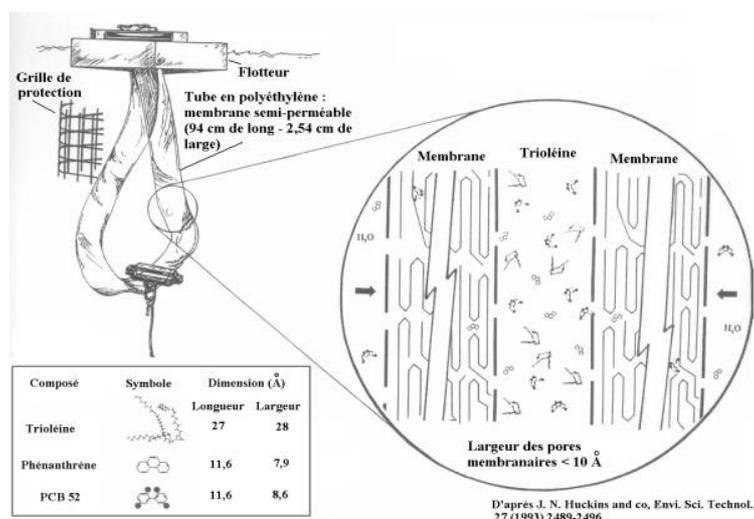


Figure 12 : Principe de la SPMD, d'après (Huckins, J.N. et al, 1993)

L'accumulation dans les dispositifs est principalement un phénomène de diffusion passive et correspond à un modèle à 1 compartiment (Huckins, J.N. et al, 1993), modèle selon lequel l'entrée des contaminants dans le dispositif est supposée proportionnelle à la concentration externe et la sortie est supposée proportionnelle à la concentration interne.

$$\frac{dC_{HAP}^{SPMD}}{dt} = k_u C_{HAP}^{eau} - k_e C_{HAP}^{SPMD} = \frac{R_s}{M_{SPMD}} C_{HAP}^{eau} - k_e C_{HAP}^{SPMD} \quad \text{Équation 1}$$

Avec :

- **Erreur! Des objets ne peuvent pas être créés à partir des codes de champs de mise en forme.** : la concentration moyenne des HAP dans le SPMD,
- **Erreur! Des objets ne peuvent pas être créés à partir des codes de champs de mise en forme.** : la concentration moyenne des HAP dans l'eau,
- $M_{SPMD}$  : la masse du SPMD (g),
- $k_u$  : la constante d'accumulation (mL.j-1.g-1),
- $k_e$  : la constante d'élimination (j-1),
- $R_s$  : le taux d'échantillonnage (mL.j-1) ou volume d'eau épuré par unité temps.

Pendant une première phase d'accumulation, l'élimination est négligeable et l'accumulation augmente linéairement avec le temps. Après une seconde phase intermédiaire, l'équilibre est atteint (phase 3). Toutes nos mesures de fraction (bio)disponible sont effectuées pendant la phase d'accumulation linéaire, qui peut durer plusieurs semaines. Pendant cette phase, on peut calculer les constantes cinétiques  $R_s$  et  $k_u$ . L'estimation des concentrations externes disponibles pour le SPMD est faite à partir de l'une ou l'autre de ces constantes cinétiques.

### 3.2.2 Expérimentations en laboratoire : calibration de la technique SPMD

Dans un premier temps, nous avons cherché à développer la technique SPMD en laboratoire. La calibration de la SPMD nous a permis de déterminer les cinétiques d'accumulation pour chaque HAP utilisé afin de pouvoir, estimer les fractions biodisponibles à partir des quantités de HAP accumulés dans les SPMD. Les expositions des SPMD pour la calibration ont été faites en conditions contrôlées d'agitation et de température.

Au Cemagref de Lyon, nous avons utilisé des dispositifs adaptés à nos mesures quantitatives en laboratoire. Ce sont des SPMD de 5 cm de long, 20 fois plus petits que le dispositif standard (Figure 10). En théorie, il est possible de comparer l'accumulation dans des dispositifs de tailles différentes si, à épaisseur de membrane égale, on conserve un ratio (masse de lipide / masse de membrane) égal à 0.2 (soit une teneur en lipide de l'ordre de 20 %) car l'accumulation se fait alors proportionnellement à la surface spécifique.

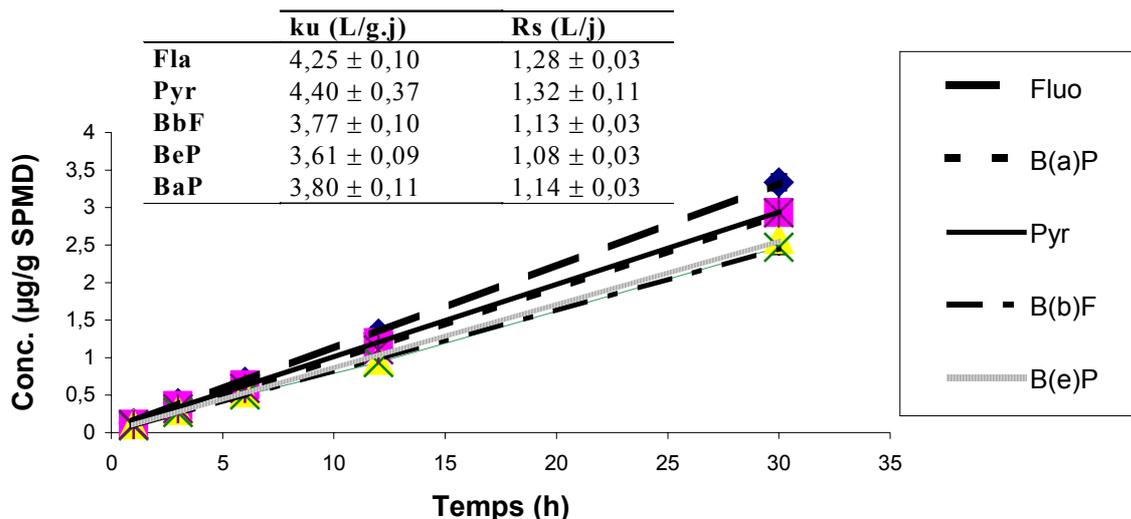
*Vérification de la linéarité de l'accumulation en fonction du temps : courbes cinétiques*

Figure 13 : Courbes cinétiques, ( $n = 3$  pour chaque durée d'exposition, concentration en HAP de l'ordre de  $1 \mu\text{g/L}$ )

Les SPMD ont été exposés dans le milieu contaminés en HAP pendant des durées croissantes de 1, 3, 6, 12 et 30 h. On obtient ainsi les courbes cinétiques d'accumulation pour les 5 HAP (Figure 13). On vérifie que l'accumulation est bien linéaire ( $R^2 > 0,99$ ), au moins jusqu'à 30 h d'exposition. D'après la bibliographie, on sait que, suivant les analytes, cette phase linéaire peut durer au delà d'un mois. On calcule, à partir de ces courbes, les valeurs des constantes cinétiques ( $k_u$  et  $R_s$ ) qui vont nous permettre de déduire la concentration externe disponible en fonction de la concentration interne accumulée.

*Vérification de la linéarité de l'accumulation en fonction de la concentration externe en HAP*

Les SPMD ont été exposés pendant 3 heures à des concentrations croissantes en HAP ( $0,2$  à  $7 \mu\text{g/L}$ ). En haut de la Figure 14, sont présentées les courbes sur une gamme de  $0,2$  à  $7 \mu\text{g/L}$ . En bas de la Figure 14, sont présentées les courbes sur une gamme plus étroite de concentration, de  $0,2$  à  $1 \mu\text{g/L}$ . Dans les 2 cas et pour les 5 HAP, on vérifie que la linéarité est bonne avec des coefficients de corrélation toujours supérieurs à  $0,9$ . A partir de cet étalonnage, nous avons estimé les limites de détection dans le milieu d'exposition. Elles varient entre  $2$  et  $50 \text{ ng/L}$  suivant les HAP, mais peuvent bien sûr être abaissées en augmentant la durée d'exposition.

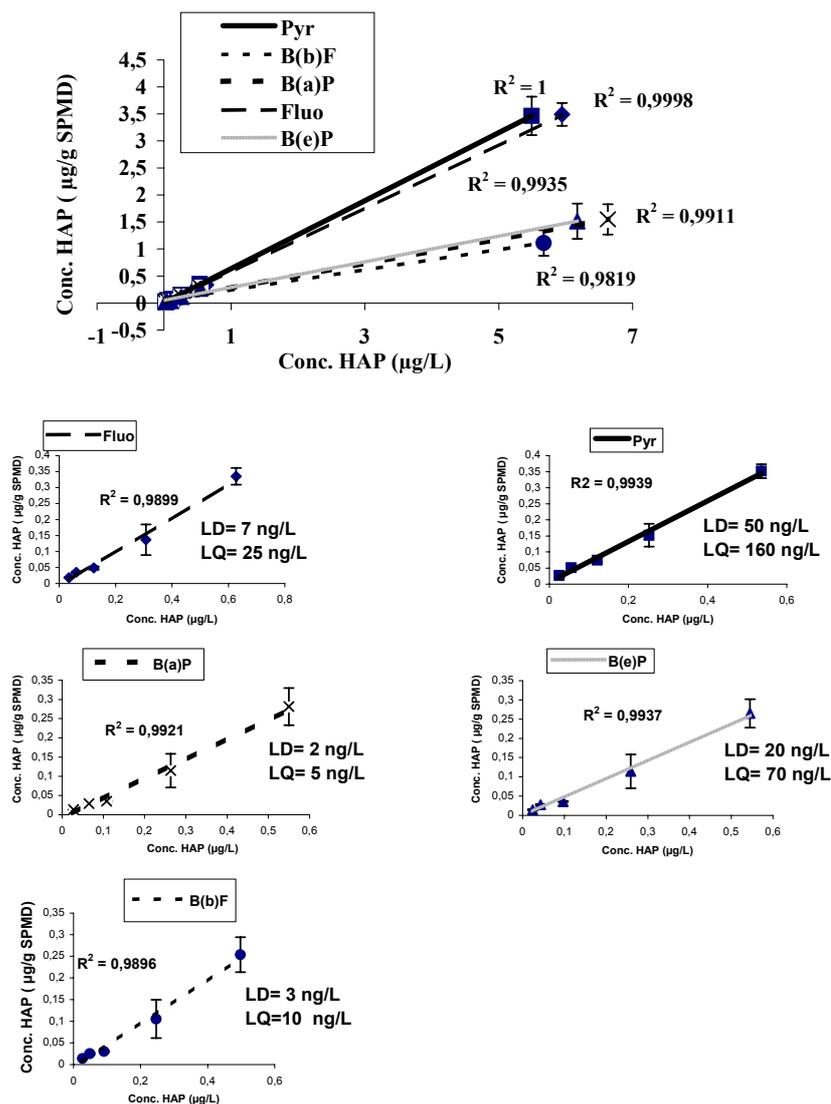


Figure 14 : Droites d'étalonnage pour les 5 HAP ( $n = 3$ , pour chaque concentration, exposition de 3 h)

### 3.2.3 Expérimentations in situ : état de l'art

#### Problèmes soulevés par l'application au terrain

La cinétique d'accumulation dépend des paramètres température et agitation, or ces paramètres sont très variables sur le terrain et ne correspondent pas aux conditions du laboratoire. Par ailleurs, nous sommes confrontés in situ au développement d'un biofilm sur la membrane (phénomène de biofouling) qui peut entraver l'accumulation des polluants dans les dispositifs SPMD. Il est important de savoir dans quelle mesure ces différents paramètres font varier les constantes cinétiques  $R_s$  et  $k_u$  afin de pouvoir relier les mesures faites sur le terrain à des étalonnages effectués en laboratoire. Une première approche bibliographique nous a permis de répondre partiellement à ces questions.

*Influence de la température*

La température joue non seulement sur la diffusion moléculaire mais aussi, dans une moindre mesure, sur le diamètre des pores du polymère qui augmente lorsque la température augmente. Ainsi, plus la température augmente, plus le Rs augmente.

L'exposition de SPMDs à des pesticides organochlorés à différentes températures a indiqué une augmentation d'un facteur 1,2 à 1,8 du Rs pour une augmentation de la température de 5 °C (entre 10 et 26 °C). Cependant, pour certains HAPs plans et rigides (ayant un log Kow élevé), le Rs n'a que peu varié dans les mêmes conditions d'expérience (Huckins et al., 1996). En effet, les HAPs ayant un log Kow élevé (supérieur à 5,5) ont également une taille supérieure aux autres HAPs et leur accumulation dans les SPMDs devient plus difficile (encombrement stérique). La température n'aura pas d'influence sur leur accumulation car l'étape limitante est alors le passage de la membrane.

Pour appliquer les Rs déterminés au laboratoire à des SPMDs exposés in situ, les auteurs procèdent de différentes façons :

- Bergvist (Bergqvist et al., 1998), suppose que le Rs diminue d'un facteur 2 lorsque la température baisse de 10 °C. A partir des valeurs de Rs à 26 °C, il extrapole à 4 - 8 °C.
- Huckins (Huckins et al., 1999) a déterminé les Rs de différents HAPs à trois températures (10, 18 et 26 °C). La différence des cinétiques d'accumulation est assez faible entre 10 et 18 °C mais devient significative entre 10 et 26 °C, autrement dit l'extrapolation linéaire faite par Bergvist n'est pas satisfaisante sur une large gamme de température. Par ailleurs l'effet de la température dépend aussi de la nature du contaminant : les rapports des Rs à 26°C sur les Rs à 10°C varient entre 0,7 et 2,1 selon les HAPs (Tableau 3).

Tableau 3: Rs de plusieurs HAPs en fonction de la température (Huckins et al., 1999)

Composé	log Kow	Rs à 10 °C	Rs à 18 °C	Rs à 26 °C	Rs à 26°C/ Rs à 10 °C
naphtalène	3,45	1,9	0,9	0,50	0,26
acénaphthylène	4,08	2,3	1,4	1,70	0,74
acénaphène	4,22	2,7	2,3	2,40	0,89
fluorène	4,38	3,0	1,7	2,80	0,93
phénanthrène	4,46	3,8	3,6	5,00	1,32
anthracène	4,54	2,9	3,6	4,60	1,59
fluoranthène	5,20	3,6	4,5	6,80	1,89
pyrène	5,30	4,5	5,2	7,60	1,69
Benz(a)anthracène	5,91	3,2	3,2	4,70	1,47
chrysène	5,61	3,7	4,8	7,60	2,05
Benzo(b)fluoranthène	5,78	2,8	3,0	3,30	1,18
Benzo(k)fluoranthène	6,20	2,9	3,9	5,50	1,90
Benzo(a)pyrène	6,35	3,2	3,7	5,40	1,69
Ideno(1,2,3,-c,d)pyrène	6,75	3,0	3,8	4,70	1,57
Dibenz(a,h)anthracène	6,51	2,0	3,0	3,40	1,70
Benzo(g,h,i)pérylène	6,90	1,8	1,9	2,40	1,33

- Lebo (Lebo et al., 1995) quant à lui utilise la loi d'Arrhenius pour déduire des Rs à 18 °C ceux à 32 °C.

Deux auteurs ont décidé de négliger la variation de température dans le temps : une variation de 23 à 26,3°C (Moring et al., 1997) ou de 23 à 28 °C (Ellis et al., 1995). Un autre auteur néglige une variation de 10 à 48 °C entre deux sites (Parrott et al., 1999).

*Influence de l'agitation*

En 93, Huckins a démontré l'influence de l'épaisseur de la couche de diffusion aqueuse : l'accumulation dans les SPMDs est plus rapide lorsque cette couche est réduite par agitation (Huckins et al., 1993). Il a constaté une augmentation de 26% de l'accumulation du 2,2'-5,5'-

tetrachlorobiphényl ( $\log K_{ow} = 5,8$ ) entre une exposition sous agitation et une exposition sans agitation (passage de  $110 \pm 10 \text{ ng/g}$  à  $150 \pm 10 \text{ ng/g}$ ). D'après (Booij et al., 1998) pour des pesticides organochlorés ( $4 < \log K_{ow} < 8$ ) dans des solutions de sédiments en suspension, le taux d'échantillonnage  $R_s$  augmente d'un facteur 3 lorsque le débit augmente d'un facteur 100 ( $30 \text{ et } 0,3 \text{ cm.s}^{-1}$ ).

En fait, cette accélération des cinétiques d'accumulation en fonction de l'agitation n'est pas toujours vérifiée. L'agitation semble avoir de l'influence dans la mesure où l'accumulation est sous le contrôle de la couche de diffusion, i.e. pour les composés ayant un  $\log K_{ow} > 4,4$ . Dans ce cas, la diminution de l'épaisseur de cette couche sous l'effet de l'agitation entraîne une augmentation des constantes cinétiques. Lorsque  $\log K_{ow} < 4,4$ , on est sous le contrôle de la membrane, autrement dit c'est le passage dans la membrane qui est l'étape limitante et l'agitation n'a pas d'influence (Huckins et al., 2002b). L'équipe de Vrana (Vrana et al., 2002) a vérifié cette hypothèse pour 6 composés ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  hexachlorocyclohexane noté HCH, pentachlorobenzène noté PeCBz et hexachlorobenzène noté HCBz).

Mais cette théorie ne s'applique pas pour tous les analytes. Luellen (Luellen et al., 2002), qui a travaillé à deux débits différant d'un facteur 50 ( $0,5 \text{ cm/s}$  et  $0,01 \text{ cm/s}$ ) n'observe qu'une faible variation des constantes cinétiques, et ceci même pour les HAP ayant le  $\log K_{ow}$  le plus élevé. Les données de cette étude (Luellen et al., 2002) montrent une tendance des  $R_s$  à augmenter avec le  $\log K_{ow}$ , à atteindre un maximum autour de 5-5,5 et à décroître ensuite. Ce phénomène est probablement dû à une gêne stérique au niveau de la membrane pour les HAPs ayant un  $\log K_{ow}$  élevé (les plus volumineux) (Huckins et al., 1999). Ainsi, pour les HAPs au  $\log K_{ow}$  élevés ( $> 5,5$ ), c'est le passage de la membrane qui est l'étape limitante. D'autres classes chimiques comme les PCBs et les pesticides ne présentent pas de décroissance pour les  $\log K_{ow}$  élevés (Booij et al., 1998; Meadows et al., 1998).

### *Le biofouling*

C'est Ellis (Ellis et al., 1995) qui a mis en évidence cette diminution du  $R_s$  due au biofouling. Il expose en parallèle des SPMDs précédemment placés sur le terrain, donc présentant un fort biofouling, et des SPMDs neufs à une solution de phénanthrène. Le  $R_s$  diminue d'un pourcentage de 26 à 39 %.

Quand il y a du biofouling, le taux d'échantillonnage peut être corrigé par un facteur  $F_i$  :

$$R_{sc} = R_s \cdot F_i \quad \text{Équation 2}$$

Avec  $R_{sc}$  le taux d'échantillonnage corrigé en  $\text{mL.j}^{-1}$  et  $F_i$  égal à 1 moins la réduction fractionnaire du  $R_s$  due au biofouling

Un examen visuel permet d'évaluer le taux de biofouling et la correction à faire (Petty et al., 2000b) : très peu ou pas de biofouling : pas de correction, peu de biofouling : diminution d'accumulation de 10%, biofouling moyen : diminution d'accumulation 30% et beaucoup de biofouling : diminution d'accumulation 50%

Cette méthode reste entièrement empirique et subjective, elle ne permet pas de faire une évaluation quantitative des polluants biodisponibles. Si l'on souhaite faire une évaluation plus quantitative des polluants, il faut éviter le biofouling. Pour cela, Luellen (Luellen et al., 2002) a proposé de tremper tous les deux jours les SPMDs dans une solution de sulfate de cuivre et d'herbicide. Huckins, lui, a proposé un trempage de 15 min une fois par semaine dans du Sanaqua (un puissant désinfectant, germicide, fongicide et désodorisant utilisé pour l'entretien des aquariums) (Huckins et al., 1993).

### *Conclusion*

Pour nos premières mesures in situ, nous ne tenons pas compte des variations de température et d'agitation. Mais nous prévoyons par la suite de tester dans une gamme pertinente de température et d'agitation, les variations induites des constantes cinétiques pour les analytes étudiés.

Nous n'avons pas cherché à éviter le biofouling lors de nos premières mesures de terrain en 2002. Mais au vu du fort développement algal apparu sur les SPMD restées longtemps immergées, et compte tenu que l'estimation du biofouling semble quelque peu arbitraire, il conviendra par la suite d'éviter ce phénomène : nous traiterons les SPMD régulièrement au cours de leur exposition avec une solution de sulfate de cuivre.

On peut signaler que certains auteurs utilisent des PRC (Performance/Permeability Reference Compounds) qui sont des composés de référence contenus dans la trioléine (Prest H.F., 1992; Booij K. 2001; Huckins J.N., 2002a). La mesure de leur taux de relargage dans le milieu extérieur permet d'estimer en quelle mesure les taux d'accumulation des polluants étudiés sont affectés par les conditions in situ de température, d'agitation et de biofouling. Les corrections apportées par l'utilisation de tels composés permettent dans certains cas de réduire les erreurs de mesures de fraction biodisponible in situ.

### 3.2.4 Nos premières mesures de terrain

En juillet/août 2002, nous avons effectué nos premières mesures in situ sur les sites de St Maurice (sur la Marne en amont de Paris) et d'Andrésey sur la Seine (avant la confluence avec l'Oise, en aval de la STEP d'Achères). Pour ces premières expériences, nous avons exposé les petites SPMD semblables à celles utilisées pour le calibrage de la technique au laboratoire. Les mesures SPMD ont été faites à partir de 3 durées d'exposition (4, 7 et 28 j). Les résultats sont reportés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Mesures classiques et par SPMD (5 cm) des HAP sur les sites de St Maurice (Marne) et d'Andrésey (Seine)

	St Maurice (Marne)			Andrésey (Seine Conflans)						
	SPMD <sup>[a]</sup> ng/L			Classique <sup>[b]</sup> ng/L		SPMD <sup>[a]</sup> ng/L			Classique <sup>[b]</sup> ng/L	
	4 j	7 j	28 j	EB	EF	4 j	7 j	28 j	EB	EF
Fla	4.2	3.3	1.1	4,6	4,5	22.6	24.2	7.3	3,4	nm
Pyr	16.9	16.0	4.0	4,6	4,5	135.5	142.8	30.2	10,8	nm
BbF	nd	nd	0.2	2,6	0,5	nd	0.7	0.4	4,2	nm
BeP	nd	nd	nd	nm	nm	nd	nd	0.4		nm
BaP	6.9	4.1	1.0	0,9	0,1	7.5	5.1	1.2	0,6	nm

EB = eau brute, EF = eau filtrée à 0.7µm, nd : non détecté, nm : non mesuré

<sup>[a]</sup> : Mesures SPMD faites par le Cemagref et le CEREVE

<sup>[b]</sup> : Mesures classiques faites par l'EPHE

Les résultats présentés sont obtenus après mesure des HAP accumulés dans les SPMD et en utilisant les constantes cinétiques préalablement déterminées. On observe une bonne correspondance entre les valeurs à 4 et 7 jours, ce qui confirme la qualité des données. Par contre la valeur à 28 jours est significativement plus faible, on n'est plus du tout dans une phase d'accumulation linéaire. Ceci peut s'expliquer en grande partie par le biofouling, (Figure 10) très prononcé observé sur nos dispositifs à 28 jours. Nous avons aussi observé une détérioration du SPMD et la présence de sangsues accrochées sur les SPMD exposés à Andrésey.

Par ailleurs, si l'on compare nos valeurs avec celles de l'EPHE (mesure des HAP dans l'eau avec une extraction liquide-liquide classique), on devrait théoriquement avoir des concentrations plus faibles par SPMD, puisque seuls les HAP "libres" (ou associés à des MOD de petites tailles) devraient interférer avec les SPMD, ce qui n'est pas le cas. Ces premiers résultats de mesures posent donc problème pour le moment, et d'autres essais de validation sont en cours ou prévus. Plusieurs explications ont été envisagées :

#### Hypothèses relatives à notre protocole de mesure

- Contamination atmosphérique de nos SPMD, suivant les mises en garde de Huckins (2002b) : Cette hypothèse est finalement peu probable car les points à 4 et 7 jours sont cohérents, ce qui ne serait pas possible avec une contamination atmosphérique résiduelle.

- Mauvais nettoyage de la surface des SPMD : Il restait peut-être encore des HAP adsorbés en surface des membranes et, dans ce cas, la fraction biodisponible a été surévaluée. A ce sujet, on notera que Huckins (2002b) suggère que le biofouling peut avoir des effets contraires, il peut soit limiter la perméabilité de la membrane et donc entraîner une sous-évaluation des fractions disponibles, soit dans le cas d'un mauvais nettoyage extérieur de la membrane, induire une sur-évaluation des fractions disponibles par prise en compte des HAP contenus dans le biofilm. Le rôle du biofilm est donc a priori difficile à évaluer, il peut être positif ou négatif. De fait, le fouling en Seine est un problème important en raison de la forte activité biologique qui y règne.

#### *Hypothèses relatives aux sites de mesures*

- Contamination des SPMD par stripping : On sait que l'on se trouve dans une zone de sédiments anoxiques. On peut se demander si les dégagements gazeux, induits par les phénomènes de fermentation, n'entraîneraient pas les HAP des sédiments vers les SPMD. Mais cette hypothèse semble finalement peu probable du fait que le partage des HAP entre les compartiments sédiment/gaz/eau est largement favorisé vers les sédiments.
- Milieu d'exposition hétérogène : A proximité d'un barrage, les SPMD ont été déployées dans des secteurs où les péniches ont un temps de séjour supérieur au reste de la Seine. Une telle source de contamination locale pourrait accroître localement la quantité d'HAP biodisponibles d'où l'incohérence entre les mesures SPMD et les mesures classiques réalisées sur des échantillons collectés à proximité, mais à partir de ponts entre les passages de bateaux.

En novembre 2002, le Cemagref de Lyon a effectué une deuxième campagne de mesure (en marge du Piren Seine) en sortie de la station d'épuration de Châtillon sur Chalaronne (Ain). C'est un site plus maîtrisé et plus homogène que les sites d'Andrésey et de St Maurice. En prévision de teneurs relativement basses en HAP, nous avons utilisé des SPMD standards de 1 m de long (au lieu des SPMD de 5 cm). Les durées d'exposition étaient de 14 jours, nous avons procédé avec des duplicats. Enfin, pour éviter le biofouling, les SPMD étaient trempés dans une solution de sulfate de cuivre à 1 g/L deux fois par semaine. Les résultats sont reportés dans le Tableau 5.

Tableau 5: Mesures par SPMD (1 m) des HAP en sortie de la STEP de Châtillon sur Chalaronne (Ain)

	[HAP] <sub>spmd1</sub> (ng/g)	[HAP] <sub>spmd2</sub> (ng/g)	[HAP] <sub>eau1</sub> (ng/L)	[HAP] <sub>eau2</sub> (ng/L)
Fla	53	57	0,924	0,989
Pyr	295	357	5,006	5,977
B(b)F	2	2	0,037	0,034
B(a)P	3	2	0,057	0,042

[HAP]<sub>spmd1</sub> : concentration en HAP dans le SPMD

[HAP]<sub>eau1</sub> : concentration en HAP dans l'eau

D'après le Tableau 5, on vérifie que les duplicats sont cohérents. Par ailleurs, les concentrations disponibles sont tout à fait sensées (très inférieures à celles mesurées sur les sites d'Andrésey et de St Maurice).

#### *Perspectives*

La validation de la méthode SPMD in situ se poursuivra en 2003.

- Les conclusions concernant les erreurs potentielles lors de l'échantillonnage ou du traitement de l'échantillon seront prévenues, notamment le contrôle de la contamination par l'atmosphère et le traitement du biofouling.
- Nous ajouterons aussi un site témoin moins exposé aux hydrocarbures. Le bassin de l'Orgevela semble être un bon endroit.
- Les écarts labo/terrain (effet des paramètres température et agitation sur les constantes cinétiques) seront étudiés.

Au cours de 2003, les campagnes d'échantillonnage de terrain seront aussi l'initiation du suivi saisonnier de la fraction biodisponible en HAP pour améliorer les connaissances sur la contamination de la Seine. Ceci sera poursuivi en 2004 pour aboutir à une évaluation cohérente du niveau de contamination. Le nombre de stations de mesure devrait également être étendu en 2005. Nous testerons aussi en 2003 la possibilité d'étendre cette étude à d'autres contaminants organiques hydrophobes, comme les PCB par exemple.

### 3.3. Rôle de la matière organique dissoute sur la biodisponibilité des HAP

#### 3.3.1 Problématique et démarche

Nous nous sommes intéressé au rôle joué par la matières organique dissoute dans la modulation de la biodisponibilité des polluants organiques hydrophobes. En effet, dans la colonne d'eau, la matière organiques dissoute (MOD), de par sa grande capacité de fixation des HAP, est le facteur d'influence majeur de la biodisponibilité des polluants organiques. En particulier, les matières organiques dissoutes (MOD) naturelles, qui contiennent un grande part de substances humiques hydrophobes, ont une grande capacité de fixation des HAP. C'est pourquoi jusqu'alors les études ont principalement porté sur l'influence des matières organiques naturelles et hydrophobes.

Peu de résultats en revanche sont disponibles pour les MOD présentes dans les écosystème soumis à une forte pression anthropique. Ainsi, la matière organiques issue de rejets urbains, ou dérivée du développement algal dans les systèmes eutrophes n'a pas été analysé. Cette matière organique n'est pas hydrophobe et est susceptible d'évoluer dans le milieu car elle est en partie biodégradable (Tusseau et Le Réveillé, 2001, Seidl et al, 1999). Comment évoluera sa capacité à fixer les HAP au cours de sa minéralisation ? L'estimation et la modélisation de la biodisponibilité des polluants organiques dans le milieu doit nécessairement prendre en compte le rôle dynamique de cette matière organique « anthropique » ainsi que son évolution spatiale et temporelle.

Pour une première approche de ces questions, nous avons mené des expériences en laboratoire de suivi de la capacité de diverses matières organiques modèles à influencer la biodisponibilité des HAP. Les matières organiques ont été caractérisées par leur aromaticité et leur état de biodégradabilité. La biodisponibilité a été évaluée au travers de mesures de bioaccumulation de HAP dans les daphnies (*Daphnia magna*).

#### 3.3.2 Matériel et méthodes

##### Protocole de mesure de la biodisponibilité

Pour chaque type de matière organique étudiée, des pools de 30 daphnies entre 5 et 7 jours sont exposés 4 heures dans des milieux contenant la même concentration en HAP et des concentration croissantes de matières organiques dissoutes. Le traitement de l'échantillon et l'analyse des HAP dans les organismes contaminés est fait pas spectrofluorimétrie après extraction par ultrasons, selon un protocole développé au CERVEVE (Gourlay et al, 2002). L'influence de la matière organique est évaluée par le rapport des fluorescence des extraits de daphnies exposées ( $F_{MOD}$ ) ou non ( $F_0$ ) à la matières organique

D'après le modèle du polluant libre, la biodisponibilité est proportionnelle à la fraction dissoute de polluant  $f_{dissoute}$ , ce qui se traduit dans nos expériences par la relation :

$$[HAP]_{MO} = f_{dissoute} \cdot [HAP]_0 \quad \text{Équation 3}$$

La fraction dissoute peut s'exprimer en fonction de la concentration [MOD] et du coefficient de partition du HAP sur la MO,  $K_{DOC}$  défini par la loi d'action de masse entre les HAP liés à la MOD et les HAP dissous :

$$K_{DOC} = \frac{[HAP - MOD]}{[HAP]_{dissous} [MOD]}, \text{ soit } f_{dissoute} = \frac{1}{1 + K_{DOC} [MOD]} \quad \text{Équation 4}$$

Ce modèle établit donc une relation entre les variables biologiques d'accumulation en présence de MO ( $[HAP]_{MO}$ ) et sans MO ( $[HAP]_0$ ) et les variables physico-chimiques  $K_{DOC}$  et  $[MOD]$  :

$$\frac{[HAP]_{MO}}{[HAP]_0} = \frac{F_{MO}}{F_0} = \frac{1}{1 + K_{DOC}(biol) \cdot [MOD]} \quad \text{Équation 5}$$

Nos mesures de bioaccumulation nous permettent donc, par une régression non linéaire d'estimer le coefficient de partition entre fraction biodisponible et fraction non biodisponible, que nous notons  $K_{DOC}(biol)$  car il correspond, selon le modèle du polluant libre, au coefficient de partition de l'équilibre entre le HAP et la MOD. Plus  $K_{DOC}(biol)$  est élevé, plus la bioaccumulation est réduite en présence de matière organique, ce qui se traduit dans le modèle du polluant libre par une plus forte interaction entre la MOD et le HAP.

### 3.3.3 Capacité de diverses MO à influencer la bioaccumulation des HAP

Dans un premier temps nous avons choisi les matières organiques variées, aux caractéristiques d'hydrophobie, et de biodégradabilité différentes. Nous avons ainsi testé

- des acides humiques commerciaux,
- un substrat artificiel de biodégradabilité proche des eaux usées domestiques (Viandox),
- ce même substrat après biodégradation en sortie de pilote de STEP
- des extraits d'algues fraîches et fanées.

Trois HAP présentant des caractéristiques différentes ont été testés (fluoranthène, pyrène et benzo[a]pyrène).

La Figure 15 nous montre mesures de bioaccumulation de benzo[a]pyrène dans les daphnies selon les concentrations en matières organiques dans le milieu pour les cinq matières organique testée préalablement. La présence de quantités croissantes de MOD conduit dans tous les cas à une réduction de la bioaccumulation du BaP. La réduction est plus forte pour les acides humiques, pour lesquels 4 mg/L de COD dans le milieu conduit à une réduction de 80% de la bioaccumulation. Elle est plus modérée pour les deux autres MOD : 4,5 mg/L de COD du filtrat de boues et 5 mg/L de COD de Viandox® réduisent respectivement de 50% et 10% la bioaccumulation. Ces concentrations de MOD correspondre taux ordres de grandeurs de MOD rencontrés dans les rivières du bassin de la Seine.

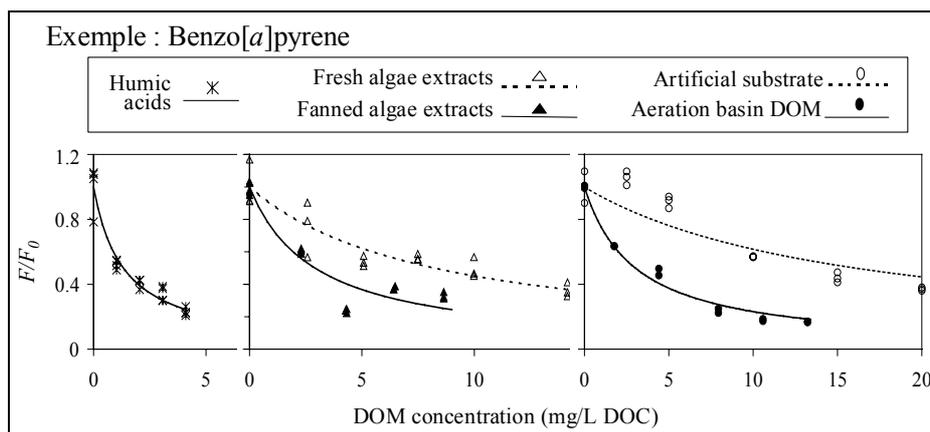


Figure 15 : bioaccumulation de benzo[a]pyrène en fonction de la quantité et de la qualité de matières organique dissoute présente dans le milieu (de Gourlay et al, 2003)

Sur la Figure 16 sont représentées les valeurs de  $K_{DOC}(biol)$  pour les 3 HAP testés et les mêmes MOD.

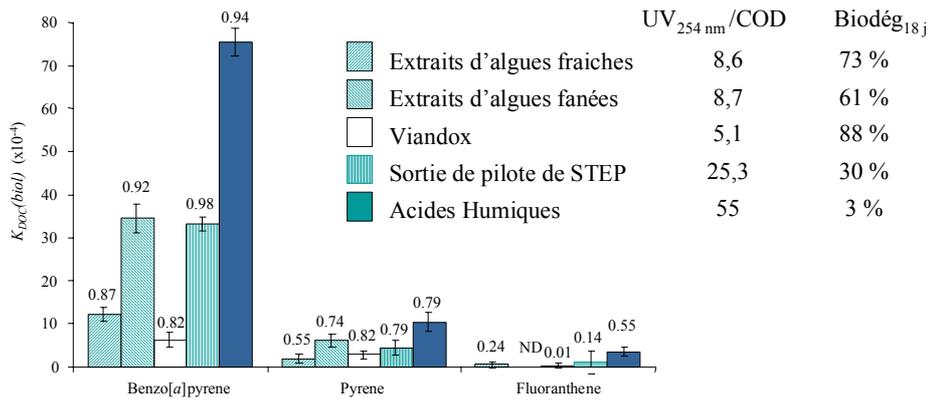


Figure 16 : Coefficient de partition mesurées biologiquement  $K_{DOC}(biol)$  pour les différentes matières organiques testées

Nous vérifions ici que les coefficients  $K_{COD}(biol)$  sont positivement corrélés à l'hydrophobie et la taille moléculaire des trois HAP. D'autre part, pour chaque HAP, nous vérifions que le coefficient de partage  $K_{COD}(biol)$  est plus important pour les acides humiques que pour les autres MOD, montrant la forte capacité des acides humiques à influencer la biodisponibilité des HAP.

Les substances humiques sont constituées de macromolécules très diverses issues de la biodégradation des organismes animaux et végétaux de l'écosystème ; elles constituent la fraction hydrophobe de la matière organique naturelle (Martin-Mousset et al. (1997)). La présence de nombreux cycles aromatiques dans leur structure les préserve notamment de la biodégradation. A contrario, le Viandox®, ou les algues fraîches sont composés principalement de sucres et protéines et sont des matières organiques fortement biodégradables qui comporte très peu de cycles aromatiques. Enfin, le filtrat de boues de STEP est un mélange de composés très divers, parmi lesquels la fraction du Viandox plus lentement biodégradable et les exudats réfractaires à la dégradation produits par les bactéries.

### 3.3.4 Evolution de $K_{DOC}(biol)$ au cours de la dégradation des matières organiques

Nous avons ensuite cherché à comprendre plus finement l'évolution de l'affinité HAP-MO au fur et à mesure que la matière organique se dégrade et devient plus réfractaire.

Pour cela, nous avons suivi en réacteur sur deux semaines l'évolution d'un substrat Viandox) au cours de la biodégradation. (mesures de Carbone Organique Particulaire (COP) et Dissous (COD)). L'aromaticité de la MOD est mesurée (mesure de l'absorptivité à 254 nm (aussi appelé « SUVA »)  $ABS_{254\text{ nm}} = UV_{254\text{ nm}}/COD$ ). Enfin, des prélèvements réguliers permettent d'estimer biologiquement la capacité de la MOD à moduler la biodisponibilité du benzo[a]pyrène ( $K_{DOC}(biol)$ ).

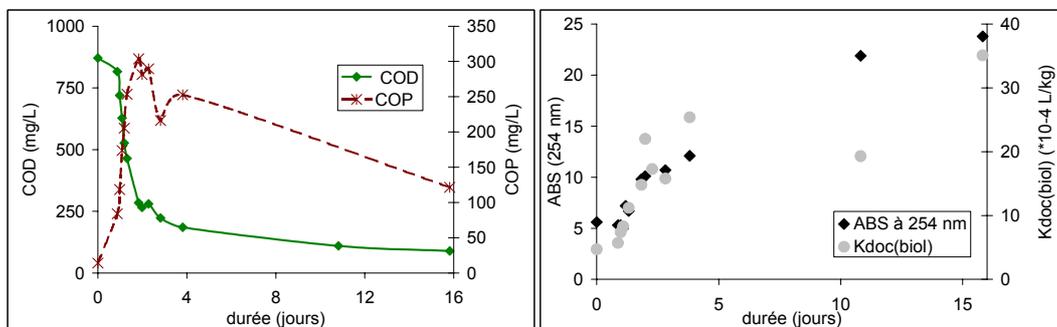


Figure 17 : évolution de la matière organique dans le réacteur : teneurs en carbones organiques dissous (COD) et particulaire (COP) (gauche) . Aromaticité et capacité à moduler la biodisponibilité de la MOD (droite)

La Figure 17 présente les résultats du suivi de la dégradation de la MO dans le réacteur. Les teneurs en carbone dissous et particulaire sont similaires à ceux d'eaux usées domestiques réelles, bien

que les concentrations en matières organiques soient plus faibles. Après un palier le premier jour du à la faible quantité de biomasse présente initialement dans le réacteur, nous observons une très forte activité bactérienne, qui se traduit par une augmentation du carbone particulaire (composé de la biomasse) et une diminution brutale du substrat dissous (assimilé par la biomasse). Le substrat n'étant pas limitant à ce stade de la réaction, les bactéries suivent en effet une croissance exponentielle. Lorsque la matière organique la plus facilement biodégradable a disparu (après 1,8 jours), et la matière organique restante est plus lentement biodégradée.

Les résultats concernant l'aromaticité de la MOD (ABS 254 nm) et sa capacité à fixer le benzo[a]pyrène, montrent que la matière organique dissoute devient plus aromatique au fur et à mesure de sa dégradation. Sa capacité à fixer les HAP évolue dans le même sens. Ces résultats confirment donc qu'en vieillissant, le rejet devient plus aromatique, comme nous l'avons entrevu lors des premières expériences. De plus, bien que les teneurs en carbone organique dissous diminuent durant la biodégradation, la MOD restante influence de plus en plus la biodisponibilité des HAP.

### 3.3.5 Conclusions et perspectives

Cette étude a permis de mettre en évidence que les matières organiques biodégradables ont aussi un pouvoir de fixation des HAP. Légèrement inférieurs à ceux mesurés avec les acides humiques naturels, les coefficients de partition estimés pour les matières organiques biodégradables ne diffèrent toutefois que d'un ordre de grandeur au maximum. Les résultats obtenus au cours du suivi de biodégradation montrent une relation entre l'état de biodégradation de la matière organique et sa capacité à diminuer la biodisponibilité des polluants organiques. Ils doivent être complétés par des essais sur d'autres substrats afin de mieux comprendre la répartition des HAP sur les différentes classes de matière organique.

Les mêmes expériences sont en cours à partir de substrat algal, qui correspond à un modèle de matière organique autotrophe, largement présente dans les milieux soumis à l'eutrophisation. Enfin, l'importance des MOD créés par l'activité bactérienne au cours de la biodégradation, et qui n'existent donc pas dans le rejet initial, doit être analysé.

## 3.4. Evaluation de la représentativité de la mesure de la fraction biodisponible par SPMD

Afin de valider le choix de la technique SPMD pour mesurer les fractions biodisponibles de Polluants organiques hydrophobes, nous avons par ailleurs cherché à évaluer la représentativité de la mesure SPMD. Ainsi nous avons comparé les fractions accumulées par SPMD avec celles accumulées dans deux autres organismes biologiques, la Daphnie et les œufs de Danio.

### 3.4.1 Principe de la comparaison

Comme il a été montré précédemment, la fraction biodisponible de HAP diminue quand on ajoute de la MOD à un milieu. Nous avons utilisé cette propriété afin d'évaluer si les SPMD échantillonnaient la même fraction disponible que celle bioaccumulée par les organismes. Pour chaque modèle (SPMD, œuf et daphnie), nous avons estimé le ratio des accumulations des HAP en présence de MOD et en absence de MOD (où la concentration biodisponible correspond à la concentration totale). Comme expliqué ci-dessus pour le modèle du polluant libre, ces ratios représentent les fractions disponibles pour chaque modèle dans le milieu avec MOD.

A partir de ces mesures de fractions biodisponibles, et par analogie à la définition du coefficient de partage  $K_{DOC}$  défini ci-dessus, nous avons calculé un coefficient de partage des HAP entre un état non disponible et un état disponible noté  $K_{disp}$ :

$$K_{disp} = \frac{[HAP]_{non.disp}}{[HAP]_{disp} [COD]} \quad \text{Équation 6}$$

$K_{disp}$  est un coefficient indépendant des concentrations en MOD et en HAP dans le milieu. Il est donc possible de comparer les  $K_{disp}$  pour les trois modèles d'accumulateurs. Plus  $K_{disp}$  est grand,

plus la MOD piège le contaminant et diminue sa biodisponibilité. Des  $K_{disp}$  identiques pour les 3 accumulateurs (SPMD, Daphnie et Danio) signifie que la fraction disponible est équivalente et donc, que le SPMD reproduit bien le processus d'accumulation avec les Daphnies et les œufs de Danio.

### 3.4.2 Résultats

Pour ces mesures, les accumulateurs sont immergés dans différents milieux contaminés en HAP et contenant des MOD pré-caractérisées et de concentration connue. De la mesure des HAP accumulés dans les milieux avec et sans MOD, on déduit les coefficients  $K_{disp}$  comme décrit ci-dessus. Nous avons les accumulations dans les SPMD et les organismes avec sept types de matières organiques ayant différentes caractéristiques physico-chimiques, affinités pour les HAP et capacités à moduler leur biodisponibilité. La bioaccumulation dans les œufs de Danio n'a été testée qu'avec les 2 premières MOD (hespéridine et cyclodextrine).

Les résultats obtenus avec le benz(a)pyrène (BaP) sont visualisés en Figure 18. Sur cette figure, les MOD sont représentées avec un poids moléculaire moyen croissant de la gauche vers la droite. On observe que l'effet protecteur des MOD vis à vis de la bioaccumulation augmente avec leur poids moléculaire moyen. Cela s'explique bien par le modèle du polluant libre : le BaP lié aux MOD de grande taille ne passe pas les membranes SPMD et biologiques (seuil de coupure de l'ordre de 1000 d). Par ailleurs, on prévoit que plus le poids moléculaire moyen des MOD est grand, plus il existe de sites de fixation des HAP. A l'inverse, on vérifie que les MOD de plus faible poids moléculaire (hespéridine et cyclodextrine) ont un effet nul avec le Danio et limité avec la Daphnie.

Mis à part les résultats obtenus avec l'hespéridine, les  $K_{disp}$  mesurés avec la SPMD correspondent bien avec ceux mesurés avec les Danio ou les Daphnies (écarts inférieurs à 0,4 unité log K). Pour conclure, si l'on se réfère à ces premiers résultats, le comportement de la SPMD mime correctement ces deux modèles biologiques. La représentativité de la mesure SPMD est plutôt satisfaisante.

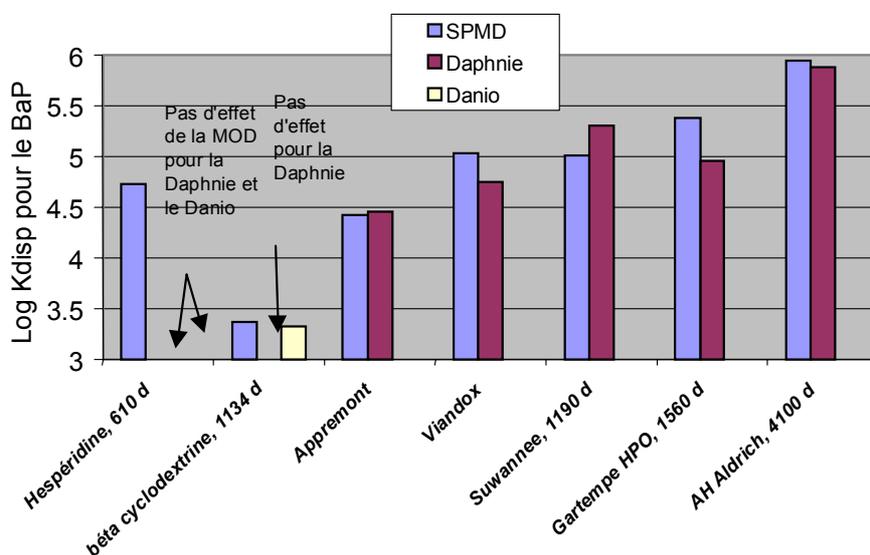


Figure 18: Comparaison des modèles SPMD / Daphnie / Danio

### 3.5. Perspectives pour l'étude du rôle de la MOD

Au cours 2003, nous souhaitons pouvoir passer de l'étude de MOD modèles à celle issues du milieu d'étude. Nous développerons donc la méthodologie de caractérisation des matières organiques dissoutes et leur fractionnement selon leur hydrophobie. L'isolement de MOD de Seine permettra de mieux évaluer leur influence sur la biodisponibilité au travers de nouvelles mesures de  $K_{disp}$ .

Nous poursuivrons aussi les expérimentations en laboratoire sur la biodégradation des MOD en vue de modéliser l'évolution de la capacité de modulation de la matière organique dissoute en fonction de sa biodégradabilité. Ce modèle, couplée à un modèle biogéochimique de suivi de la matière organique (type HSB ou ASM), devrait permettre d'appréhender un modèle d'exposition des HAP dans le milieu

#### 4. Bibliographie

- Bergqvist, P.A., Standberg, B., Ekelund, R., Rappe, C. and Granmo, A. (1998). Temporal monitoring of organochlorine compounds in seawater by semipermeable membrane following a flooding episode in western Europe. *Environ. Sci. Technol.*, 32: 3887-3892.
- Booij, K. and van Drooge, B.L. (2001). Polychlorinated biphenyls and hexachlorobenzene in atmosphere, sea-surface micro-layer, and water measured with semi-permeable membrane devices (SPMDs). *Chemosphere*, 44: 91-98.
- Booij, K., Sleiderink, H.M. and Smedes, F. (1998). Calibrating the uptake kinetics of semipermeable membrane devices using exposure standards. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 17(7): 1236-1245.
- Campbell P.C. (1995). Interactions between trace metals and aquatic organisms : a critique of the free-ion model. In Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. Tessier A. and Turner D.R., John Wiley and Sons: 45-102.
- Davison W. and Zhang H. (1994). *In situ* speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. *Nature* 367: 546-548.
- Ellis, G.S., Huckins, J.N., Rostad, C.E., Schmitt, C.J., Petty, J.D. and MacCarthy, M. (1995). Evaluation of lipid-containing semipermeable membrane devices for monitoring organochlorine contaminants in the upper Mississippi River. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14(11): 1875-1884.
- Gourlay C, Miège C, Tusseau-Vuillemin MH, Mouchel JM, Garric J. (2002). The use of spectrofluorimetry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons bioaccumulation and biotransformation in *Daphnia magna*. Polycyclic Aromatic Compounds Volume 22, 3-4, pp 501 - 516
- Gourlay C, Tusseau-Vuillemin MH, Garric J, Mouchel JM. (2003). Effect of dissolved organic matter of various origins and biodegradabilities on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* Volume 22, 6.
- Haitzer M, Höss S, Traunspurger W, Steinberg C. (1998). Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms – A review -. *Chemosphere*. 37:1335-1362
- Huckins, J. contaminants in water. *Environ. Sci. Technol.*, 27: p. 2489-2496. N., et al. (1993). Lipid-containing semipermeable membrane devices for monitoring organic
- Huckins, J.N., M.W. Tubergen, and G.K. Manuweera (1990). Semipermeable membrane devices containing model lipid : a new approach to monitoring the bioavailability of lipophilic contaminants and estimating their bioconcentration potential. *Chemosphere*, 20(5): p. 533-552.
- Huckins, J.N., Petty, J.D., Lebo, J.A., Almeida, F.V., Booij, K., Alvarez, D.A., Cranor, W.L., Clark, R.C. and Mogensen, B.B. (2002a). Development of the Permeability / Performance Reference Compound Approach for In Situ Calibration of Semipermeable Membrane Devices. *Environ. Sci. Technol.*, 36(1): 85-91.
- Huckins, J.N., Petty, J.D., Lebo, J.A., Orazio, C.E., Clark, R.C. and Gibson, V.L. (2002b). Semipermeable Membrane Devices. In. [http://www.waux.cerc.cr.usgs.gov/spmd/SPMD-Tech\\_Tutorial.htm](http://www.waux.cerc.cr.usgs.gov/spmd/SPMD-Tech_Tutorial.htm).
- Huckins, J.N., Petty, J.D., Lebo, J.A., Orazio, C.E., Prest, H.F., Tillitt, D.E., Ellis, G.S., Johnson, B.T. and Manuweera, G.K. (1996). Semipermeable membrane devices (SPMDs) for the concentration and assessment of bioavailable organic contaminants in aquatic environments. In: *G.K. Ostrander (Editor), Techniques in aquatic toxicology*. CRC Lewis Publishers, Stillwater, OK, pp. 625-655.
- Huckins, J.N., Petty, J.D., Orazio, C.E., Lebo, J.A., Clark, R.C., Gibson, V.L., Gala, W.R. and Echols, K.R. (1999). Determination of uptake kinetics (sampling rates) by lipid-containing semipermeable membrane devices (SPMDs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water. *Environ. Sci. and Technol.*, 33(21): 3918-3923.

- Landrum P.F., Reinhold M.D., Nihart S.R., Eadie B.J. (1985). Predicting the bioavailability of organic xenobiotics to *Pontoreia hoyi* in the presence of humic and fulvic materials and natural dissolved organic matter, *Environ. Toxicol. Chem.*, 4, 459-467
- Lebo, J.A., Gale, R.W., Petty, J.D., Tillitt, D.E., Huckins, J.N., Meadows, J.C., Orazio, C.E., Echols, K.R. and Schroeder, D.J. (1995). Use of semipermeable membrane device as an in situ sampler of waterborne bioavailable PCDD and PCDF residues at sub-parts-per quadrillion concentrations. *Environ. Sci. Technol.*, 29(11): 2886-2892.
- Luellen, D.R. and Shea, D. (2002). Calibrating and field verification of semipermeable devices for measuring polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Environ. Sci. and Technol.*, 36: 1791-1797.
- Martin-Mousset B, Croue JP, Lefebvre E, Legube B. 1997. Distribution et caractérisation de la matière organique dissoute d'eaux naturelles de surface. *Wat. Res.* Vol. 31, No 3, pp 541-553.
- Meadows, J.C., Echols, K.R., Huckins, J.N., Borsuk, F.A., Carline, R.F. and Tillitt, D.E. (1998). Estimation of uptake rate constants for PCB congeners accumulated by semipermeable membrane devices and brown trout (*Salmo trutta*). *Environ. Sci. Technol.*, 32: 1847-1852.
- Meybeck, M. et col., 1998, Pourquoi tant de métaux ? in La Seine en son bassin.
- Morel F.M.M. (1983). Principles of aquatic chemistry. New York, Wiley-Interscience. 301 p.
- Moring, B.J. and Rose, D.R. (1997). Occurrence and concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in semipermeable membrane devices and clams (*Corbicula fluminea*) in three urban streams of the Dallas-Fort worth metropolitan area, Texas. *Chemosphere*, 34(3): 551-566.
- Parrott, J.L., Backus, S.M., Borgmann, A.I. and Swyripa, M. (1999). The use of semipermeable membrane devices to concentrate chemicals in oil refinery effluent on the Mackenzie river. *Arctic*, 52(2): 125-138.
- Prest, H.F., Jarman, W.M., Burns, S.A., Weismüller, T., Martin, M. and Huckins, J.N. (1992). Passive water sampling via semipermeable membrane devices (SPMDs) in concert with bivalves in the Sacramento/San Joaquin river delta. *Chemosphere*, 25(12): 1811-1823.
- Seidl M, Servais P, Mouchel JM. (1998). Organic matter transport and degradation in the river Seine (France) after a combined sewer overflow. *Wat Res* 32:3569-3580.
- Tusseau-Vuillemin M.-H., Gilbin R. and Taillefert M., 2003, A dynamical model to characterize the labile metal complexes collected with Diffusion Gradient in Thin films (DGT) devices, *Environmental Science and Technology*, in press.
- Tusseau-Vuillemin MH, Le Reveillé G. (2001). Le carbone organique biodégradable dans les eaux traitées des stations d'épuration du bassin de la Seine. *Ingénieries*. 25:3-12.
- Vrana, B. and Schuurmann, G. (2002). Calibrating the uptake kinetics of semipermeable membrane devices in water: impact of hydrodynamics. *Environ. Sci. and Technol.*, 36: 290-296.
- Zhang H. and Davison W. (2000). Direct in situ measurements of labile inorganic and organically bound metal species in synthetic solutions and natural waters using Diffusive Gradients in Thin films. *Analytical Chemistry* 72(18): 4447-4457.
- Zhang H. and Davison W. (2001). In situ speciation measurements. Using Diffusive Gradients in Thin films (DGT) to determine inorganically and organically complexed metals. *Pure and Applied Chemistry* 73(1): 9-15.