

## Caractérisation de la biodégradabilité de la matière organique contenue dans les rejets urbains par spectrofluorescence 3D

Nadège Musabimana<sup>1</sup>, Angélique Goffin<sup>1</sup>, Sabrina Guérin<sup>2</sup>, Vincent Rocher<sup>2</sup>, Gilles Varrault<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université Paris-Est Créteil/LEESU

<sup>2</sup> SIAAP/DI

\* varrault@u-pec.fr

### Résumé

*L'objectif de cette action est de mieux caractériser la biodégradabilité de la matière organique dissoute (MOD) contenue dans les différents types de rejets urbains. Il s'agit également de mettre en évidence des indicateurs issus de l'analyse en spectrofluorescence qui pourraient être utilisés comme traceurs pour déterminer les fractions de matière organique rapidement biodégradable, lentement biodégradable et réfractaire présentes dans les rejets urbains et les milieux aquatiques. Ces classes de biodégradabilité sont celles utilisées pour décrire les processus en lien avec la biodégradabilité de la matière organique dissoute (MOD) dans le modèle RIVE.*

*Pour réaliser ces deux objectifs, le suivi en fonction du temps de la biodégradation de la MOD contenue dans des rejets urbains a été mené lors d'expériences d'incubation. Il apparaît que dans le cas des eaux usées d'entrée de STEU, potentiellement rejetées directement dans les milieux aquatiques en cas de mauvais branchements, cela a permis de mettre en évidence les 3 fractions de MOD évoquées ci-dessus. La bande de fluorescence  $\alpha$  (de type humique) semble liée à la MOD réfractaire, tandis que les bandes  $\delta$  et  $\gamma$  (de type protéinique) semblent liées à la MOD biodégradable. Plus de 60% de la fluorescence de la bande  $\gamma$  est liée à la fraction rapidement biodégradable de la MOD et moins de 15% à la fraction réfractaire. Ces résultats devront être confirmés en 2022 par d'autres tests d'incubation menés sur différents types de rejets urbains.*

*L'utilisation combinée d'indicateurs de fluorescence et de la sonde de fluorescence FLUOCOPEE permettra une mesure in situ, en temps réel et à haute fréquence des classes de biodégradabilité de la matière organique en rivière. Ces mesures permettront d'alimenter le modèle RIVE en variables prédictives et ainsi d'améliorer la qualité des prédictions.*

### Points clefs

- ✓ *Le suivi de la cinétique de la biodégradation de la MOD contenue dans les rejets urbains permet de mettre en évidence 3 fractions différentes en termes de biodégradabilité.*
- ✓ *Les bandes de fluorescences  $\delta$  et  $\gamma$  semblent liées à la MOD rapidement biodégradable tandis que la bande  $\alpha$  semble liée à la MOD réfractaire.*
- ✓ *L'utilisation d'indicateurs de fluorescence et de la sonde FLUOCOPEE permettrait une mesure in situ des classes de biodégradabilité de la matière organique en rivière.*

## Abstract

The objective of this action is to better characterize the biodegradability of dissolved organic matter (DOM) contained in different types of urban wastewater. It is also to highlight indicators from spectrofluorescence analysis that could be used as tracers to obtain the fractions of rapidly biodegradable, slowly biodegradable and refractory organic matter in urban discharges and aquatic environments. These biodegradability fractions are those used to describe the processes related to the biodegradability of dissolved organic matter (DOM) in the RIVE model.

In order to achieve these two objectives, time-dependent monitoring of the biodegradation of DOM contained in urban discharges was conducted during incubation experiments. It appears that in the case of WWTP influent, potentially discharged directly into aquatic environments in case of bad connections, this allowed to highlight the 3 fractions of DOM mentioned above. The  $\alpha$  fluorescence band (humic-like substances) seems to be related to refractory DOM while the  $\delta$  and  $\gamma$  bands (protein-like substances) seem to be related to biodegradable DOM. More than 60% of the  $\gamma$ -band fluorescence is related to the rapidly biodegradable fraction of MOD and less than 15% to the refractory fraction. These results need to be confirmed in 2022 by further incubation tests conducted on different types of urban discharges.

The combined use of fluorescence indicators and the FLUOCOPEE fluorescence probe will allow an *in situ*, real-time and high frequency measurement of the biodegradability fractions of organic matter in rivers. These measurements will allow to drive the RIVE model with predictive variables and thus to improve the quality of predictions.

## Key points

- ✓ Monitoring the biodegradation kinetics of DOM contained in urban discharges reveals 3 different fractions in terms of biodegradability.
- ✓ The  $\delta$  and  $\gamma$  fluorescence bands appear to be related to rapidly biodegradable DOM while the  $\alpha$  band appears to be related to refractory DOM.
- ✓ The use of fluorescence indicators and the FLUOCOPEE probe would allow an *in situ* measurement of the biodegradability classes of organic matter in river.

## Introduction

La matière organique (MO) dans les systèmes aquatiques est un mélange très complexe et dynamique de composés organiques provenant de sources naturelles et d'apports anthropiques (Bauer et al., 2011 ; Cawley et al., 2012 ; Artifon et al., 2019). L'origine de la MO influence sa composition et ses propriétés, qui vont ensuite déterminer sa réactivité dans les écosystèmes aquatiques (Besemer et al., 2009 ; Lambert et al., 2017). La concentration et la composition de la MO dépendent du bassin versant environnant (nature, occupation des sols) et de la connectivité hydrologique entre le cours d'eau (lit mineur), sa plaine d'inondation et les eaux souterraines, qui contrôle le transfert de la MO terrestre et d'origine aquatique vers le cours d'eau (Besemer et al., 2009).

La MO joue un rôle essentiel dans les écosystèmes aquatiques de surface en raison du nombre de processus biogéochimiques dans lesquels elle intervient. Quelle que soit sa source, elle joue un rôle central sur la nature du métabolisme (hétérotrophe ou autotrophe) des cours d'eau. La MO influence également la spéciation, la solubilité, la toxicité et le transport des polluants organiques et inorganiques (Buffle, 1988 ; Campbell, 1995). Elle est aussi impliquée dans les réactions photochimiques aqueuses, le cycle et la disponibilité des nutriments (Bormann et Likens, 1967 ; Nebbioso et Piccolo, 2013).

Les mécanismes impliqués dans tous ces processus dépendent fortement non seulement de la quantité de MO, mais aussi de sa nature chimique, de ses propriétés physico-chimiques et de sa composition. Les activités humaines, notamment pour la Seine qui est sous forte pression urbaine, modifient la nature de la MO en raison des apports provenant notamment des rejets de stations d'épuration des eaux usées (Matar et al., 2012). Malgré leur rôle clé dans les processus environnementaux, la composition et la réactivité de la MO sont encore trop peu connues.

L'objectif de cette action est de mieux caractériser la biodégradabilité de la matière organique dissoute (MOD) contenue dans les différents types de rejets urbains. Il s'agit également de mettre en évidence des indicateurs issus de l'analyse en spectrofluorescence qui pourraient être utilisés comme traceurs pour obtenir les fractions de matière organique rapidement biodégradable, lentement biodégradable et réfractaire présentes dans les rejets urbains et les milieux aquatiques. Ces classes de biodégradabilité sont celles utilisées pour décrire les processus en lien avec la biodégradabilité de la matière organique dissoute (MOD) dans le modèle RIVE.

Afin de réaliser ces objectifs, le suivi de la biodégradation de la MO en fonction du temps va être mené lors d'expériences d'incubation (Servais et al., 1987) dans différents types de rejets urbains : les rejets de Station de Traitement des Eaux Usées (STEU) de temps sec (période normale, période transitoire de type travaux ou dysfonctionnement), les rejets urbains de temps de pluie (STEU et déversoirs d'orage) et également rejets urbains non traités en STEU qui surviennent dans le cas de mauvais branchements.

L'utilisation combinée de ces indicateurs de fluorescence et de la sonde de fluorescence FLUOCOPEE (Varrault et al., 2021) permettra une mesure *in situ*, en temps réel et à haute fréquence des classes de biodégradabilité de la matière organique en rivière. Ces mesures permettront d'alimenter le modèle RIVE en variables prédictives et ainsi d'améliorer la qualité des prédictions.

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1. Les différents échantillons

Les expériences d'incubation ont été menées avec différents types de rejets urbains et un échantillon de Seine :

- Deux échantillons d'entrée de la STEU Seine-Centre prélevés les 8 décembre 2020 et 14 juin 2021 ;
- Un échantillon prélevé en Seine à Choisy-le-Roi le 20 avril 2021 ;
- Un échantillon de sortie de la STEU Seine-Amont le 19 avril 2021.

### 1.2. Incubation des échantillons

Les manipulations effectuées se sont appuyées sur le protocole du Carbone Organique Dissous Biodégradable (CODB) mis en place par Servais et al., 1987. Il s'agit ici de suivre la cinétique de biodégradation aérobie de la MOD. Les aliquotes prélevées aux différents temps de la cinétique sont caractérisées en spectrofluorescence 3D et leur concentration en carbone organique dissous (COD) est déterminée.

#### 1.2.1. Préparation des échantillons

Avant l'incubation, 2 à 3 litres d'échantillon sont filtrés à 0,2 µm afin d'éliminer les microorganismes présents. Pour la première incubation, étant donné les nombreux tests réalisés, un volume de 5 L a été filtré. Afin d'éviter le colmatage du filtre à 0,2 µm et permettre une filtration plus rapide, deux filtrations intermédiaires ont été réalisées à 2,7 µm (filtre GF/D) et 0,7 µm (filtre GF/F). La filtration à 0,2 µm a été effectuée avec un filtre en acétate de cellulose.

Pour l'inoculum, 100 mL de l'échantillon à incuber sont récupérés après la filtration avec le filtre GF/D (2,7 µm) puis filtrés avec le filtre GMF (2 µm).

Les filtres GF/D, GF/F et GMF sont constitués de fibre de verre, ils ont été grillés à 550 °C pendant deux heures pour enlever toute trace de matière organique. Les filtres à 0,2 µm en acétate de cellulose ont été rincés avec 1,5 L d'eau osmosée et 500 mL d'eau ultra pure afin de limiter les contaminations organiques. Des blancs de filtration ont été réalisés, ne révélant aucune contamination significative que ce soit en termes de concentration en COD ou de fluorescence.

Toute la verrerie utilisée a été grillée préalablement au four à 550°C, pour éliminer tout reste de matière organique.

#### 1.2.2. Suivi de la biodégradation pendant l'incubation

A la fin de la filtration, les échantillons à incuber sont répartis dans 4 béchers mis sous agitation à l'obscurité et température constante (20°C). Tous les béchers sont recouverts et entourés d'aluminium afin d'être dans l'obscurité. Des trous sont percés afin de laisser passer l'oxygène et se trouver en conditions aérobies.

L'inoculum est ajouté (1% v/v) et marque le temps zéro de la cinétique. L'incubation est arrêtée après 45 jours. Pour chaque expérience d'incubation, la cinétique de biodégradation est suivie par environ une vingtaine de prélèvements, dont une dizaine de prélèvements dans les 3 premiers jours. Des prises d'aliquotes sont effectuées en duplicat pour chaque temps de cinétique.

#### 1.2.3. Optimisation du protocole expérimental

La première incubation a été menée du 8 décembre 2020 au 22 janvier 2021 avec une solution constituée d'un mélange de 62% d'eaux usées d'entrée de la STEU Seine-Centre prélevé le 8 décembre 2020 et de 38% d'eau ultra pure. Cet échantillon présente des caractéristiques similaires à un rejet urbain de temps de pluie (RUTP) relativement peu dilué par les eaux de ruissellement pluvial.

Cette manipulation va nous permettre d'optimiser notre protocole expérimental, et notamment de placer au mieux les différents points de prélèvement dans le temps. Cela permettra de décrire la cinétique de

biodégradation avec une densité élevée de points de prélèvement au moment où la biodégradation est la plus rapide. Pour ce faire, nous avons choisi de travailler avec un échantillon avec une quantité *a priori* importante de MOD rapidement biodégradable et donc avec une biodégradation élevée dans les premières heures de l'incubation.

Trois différentes conditions d'ensemencement ont été testées. En effet après la filtration à 0,2 µm de l'échantillon à incuber, il est nécessaire d'ensemencer l'échantillon avec un inoculum (1% v/v) pour que la biodégradation ait lieu. Cet ensemencement a été effectué avec 3 sources différentes de microorganismes :

- Inoculum constitué d'eau de Seine filtré à 2 µm ;
- Inoculum constitué d'un mélange eau de Seine / entrée de STEU Seine-Centre filtré à 2 µm ;
- Inoculum constitué d'entrée de STEU Seine-Centre filtré à 2 µm.

L'échantillon d'eau de Seine utilisé pour l'ensemencement a été prélevé à l'amont immédiat de la STEU Seine-Centre, le même jour que celui du prélèvement de l'échantillon d'entrée de STEU à incuber. L'échantillon d'entrée de STEU utilisé pour l'ensemencement est le même que celui utilisé pour l'incubation, filtré à 2 µm.

Il a déjà été prouvé (Servais *et al.*, 1989) que la nature de l'ensemencement n'avait pas d'influence significative sur le résultat final du CODB (au bout de 45 jours d'incubation), mais nous avons voulu vérifier si la cinétique de biodégradation dans les premières dizaines d'heures pouvait être affectée par la nature de l'ensemencement.

Le protocole d'incubation optimisé obtenu a été appliqué pour les échantillons d'entrée de la STEU Seine-Centre (prélevé le 14 juin 2021), l'échantillon de sortie de la STEU Seine-Amont ainsi que l'échantillon de Seine.

### 1.3. Caractérisation des échantillons

#### 1.3.1. Le phénomène de fluorescence

La fluorescence est un phénomène qui survient lorsqu'un composé ayant auparavant été excité par absorption d'énergie issue d'une source lumineuse (type UV-Vis), présente la faculté de réémettre cette énergie sous forme de rayonnement. Celui-ci est émis de façon quasi instantanée, à une longueur d'onde  $\lambda$  (nm) plus grande que celle de la lumière d'origine. Les différents phénomènes énergétiques auxquels une molécule peut être sujette sont illustrés dans la Figure 1 qui présente le diagramme de Jablonski. Les processus d'absorption et de fluorescence, de relaxation vibrationnelle ou encore la conversion interne de l'énergie d'émission généralement inférieure à l'énergie d'absorption y sont présentés (Lakowicz *et al.*, 2006).

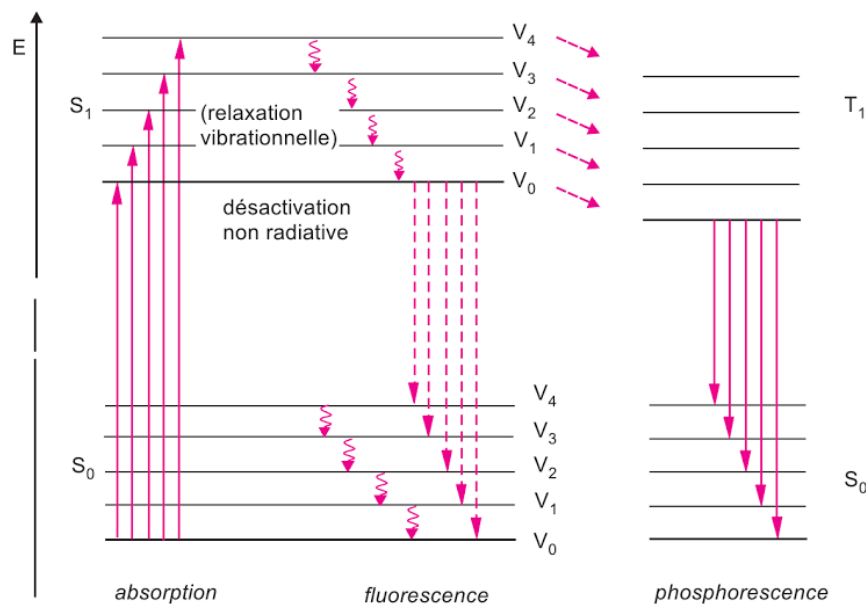


Figure 1. Diagramme de Jablonsky (d'après Rouessac *et al.*, 2004).

Pour fluorescer, les molécules doivent comporter des fluorophores naturels (aminoacides, structures aromatiques, porphyrines, acides organiques). On nommera ainsi fluorophore toute molécule susceptible d'absorber l'énergie sous forme de photon à une longueur d'onde spécifique (excitation) et de la relaxer sous forme d'émission lumineuse spontanée à une longueur d'onde plus importante (et donc moins d'énergie) dans le domaine du visible ou de l'ultraviolet.

### **1.3.2. Propriétés de la matière organique fluorescente**

La matière organique comporte une fraction optiquement active capable d'absorber la lumière dans le spectre du visible (400-700 nm) et de l'ultra-violet (200-400 nm) que l'on regroupe sous le terme « matière organique chromophorique ». L'absorption par cette fraction du carbone organique dissous est maximale dans l'ultraviolet et diminue jusqu'à une absorption proche de zéro dans la partie rouge du spectre. Un sous-ensemble de la matière organique chromophorique est défini comme « matière organique dissoute fluorescente », étant donné sa capacité à émettre de la fluorescence (Stedmon et Cory, 2014).

La spectrométrie de fluorescence permet de différencier les fractions de la MOD via la présence de fluorophores qui dépendent en grande partie des propriétés physico-chimiques intrinsèques de la MOD et de son environnement chimique (Hudson et al., 2008). Cette technique permet d'apporter des informations sur la composition de la MOD ou sur les transformations qu'elle subit (Weber, 1988 ; Vodacek et al., 1997).

Les variations de composition chimique et de structures moléculaires de la MOD peuvent être visualisées via la mesure de paramètres tels que l'intensité maximale de fluorescence (Coble, 1996), les ratios de fluorescence (McKnight et al., 2001) ou encore la localisation des bandes d'excitation et d'émission, permettant ainsi d'obtenir des informations sur la quantité, les sources et la nature de la MOD (Stedmon et al., 2008 ; Goldman et al., 2012). Les différents fluorophores d'intérêts de la MOD sont présentés ci-après.

### **1.3.3. Fluorophores d'intérêts de la MOD**

Les spectres de fluorescence contiennent les contributions simultanées de différents fluorophores, complexifiant leur identification (Vacher, 2004). Chaque molécule organique fluorescente (fluorophore) présente des spécificités propres se traduisant par : un couple de longueurs d'ondes d'excitation/émission (Ex-Em), une intensité de fluorescence maximale, un rendement quantique de fluorescence et une durée de vie de fluorescence propre. Ces maximums d'intensités de fluorescence observés ont été attribués à différents groupes de composés chimiques « types » constitutifs de la MOD. Cette identification a été réalisée par comparaison des propriétés de la fluorescence mesurée pour des composés standards présentant des propriétés optiques similaires (Henderson et al., 2009). On différencie alors les composés fluorescents de types humique, fulvique et protéinique (subdivisés en deux groupes : tryptophane et tyrosine).

La première nomenclature de classification des fluorophores est celle de Coble (1996) : les bandes A et C pour les composés de type humique, la bande B pour les composés protéiniques type tyrosine, la bande T pour les composés protéiniques de type tryptophane et enfin la bande M caractéristique des composés marins de type humique. Une nomenclature correspondante a également été introduite par Parlanti et al., (2000). La figure 2 présente un exemple de l'emplacement de ces différents fluorophores sur un spectre de fluorescence 3D (matrice d'excitation-émission). Le tableau 1 présente l'association des domaines de fluorescence pour chacun des composés de la MOD.

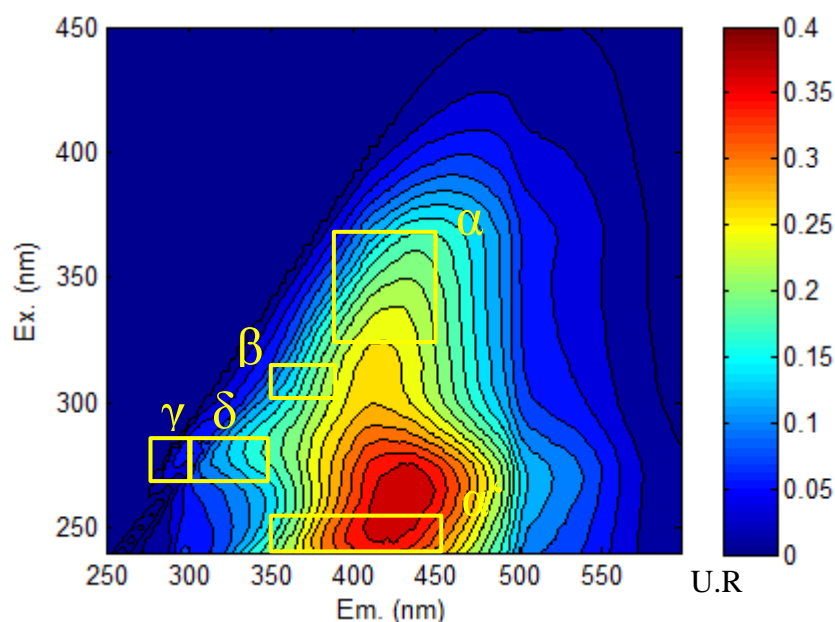


Figure 2. Localisation des fluorophores de la MOD sur un spectre de fluorescence 3D d'eau de Seine (Choisy-le-Roi, le 18/05/16).

Tableau 1. Localisation spectrale des fluorophores de la MOD dans les milieux récepteurs.

Fluorophores (Coble, 1996)	Fluorophores (Parlanti et al., 2000)	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Longueur d'onde d'émission (nm)	Type de composés
A	$\alpha'$	230 - 260	380 – 480	Substances type humique + matériel plus récent
C	$\alpha$	330 - 370	420 – 480	Substances type humique
M	$\beta$	310 - 320	380 – 420	Matériel récent + composante biologique
B	$\gamma$	270 - 280	300 – 320	Tyrosine
T	$\delta$	270 – 280	320 – 380	Tryptophane

### 1.3.4. Mesure de la fluorescence

Afin d'effectuer l'analyse avec la spectroscopie de fluorescence, 8 mL d'échantillon sont prélevés avec une seringue préalablement rincée avec 100 mL d'eau ultra pure et 2 mL d'échantillon, puis sont filtrés à 0,2  $\mu\text{m}$  avec des filtres seringues en polyéthersulfone (Filtropur) préalablement rincés avec 50 mL d'eau ultra pure. Les 8 mL sont conditionnés dans un vial ambré de 15 mL et fermé par un bouchon.

Avant chaque mesure de fluorescence au spectrofluorimètre 3D (Jasco FP8300), l'absorbance de l'échantillon à 254 nm est mesurée (Seconam UviLine 9400). Si elle n'est pas inférieure à 0,05, l'échantillon est dilué afin d'éviter l'effet de filtre interne. Le spectre UV-visible est enregistré pour tous les échantillons entre 200 nm et 800 nm. Les intensités de fluorescence maximales sont déterminées pour toutes les bandes mentionnées dans le tableau s1 et la figure 2.

### 1.3.5. Mesure de la concentration en COD

Pour l'analyse de la concentration en COD, 17 mL de l'échantillon sont prélevés avec une seringue préalablement rincée avec 100 mL d'eau ultra pure et 2 mL d'échantillon. Ces 17 mL d'échantillon sont ensuite filtrés à 0,2  $\mu\text{m}$  avec des filtres seringues en polyéthersulfone (Filtropur) préalablement rincés avec 50 mL d'eau ultra pure. Les 17 mL sont mis dans un vial en verre puis à l'obscurité avant d'être analysés en fin de journée avec toutes les aliquotes prélevées dans la journée. La concentration en COD est déterminée avec le COT-mètre TOC-L de SHIMADZU.

### 1.3.6. Fractionnement de la MOD : modèle de décroissance à deux phases

La décroissance de la concentration en COD ainsi que, le cas échéant, des intensités des bandes de fluorescence pendant l'incubation a été ajustée par un modèle à deux exponentielles décroissantes simulant une décroissance à deux phases. L'utilisation de ce modèle de décroissance à deux phases repose sur l'hypothèse que 3 fractions différentes de MOD, en termes de cinétique de biodégradation, sont initialement présentes dans l'échantillon incubé :

- Une fraction de MOD rapidement biodégradable ;
- Une fraction de MOD lentement biodégradable ;
- Une fraction de MOD réfractaire, c'est-à-dire non biodégradée durant les 45 jours de l'incubation.

L'équation du modèle utilisé est la suivante :

$$Y = A_1 * \exp(-K_1 * \text{Temps (h)}) + A_2 * \exp(-K_2 * \text{Temps (h)}) + A_3 \quad (\text{eq 1})$$

Avec  $K_1 < K_2$ , nous avons :

Y : COD ( $\text{mgC.L}^{-1}$ ) ou intensité de fluorescence (UR)

$A_1$  : fraction de [COD] lentement biodégradable contenu initialement dans l'échantillon ( $\text{mgC.L}^{-1}$ )

$K_1$  : constante de vitesse de biodégradation de la MO lentement biodégradable ( $\text{h}^{-1}$ )

$A_2$  : fraction de [COD] rapidement biodégradable contenu initialement dans l'échantillon ( $\text{mgC.L}^{-1}$ )

$K_2$  : constante de vitesse de biodégradation de la MO rapidement biodégradable ( $\text{h}^{-1}$ )

$A_3$  : fraction de [COD] réfractaire contenu initialement dans l'échantillon ( $\text{mgC.L}^{-1}$ ) et non biodégradée (plateau)



## 2. Résultats et discussion

### 2.1. Optimisation du suivi de la cinétique de biodégradation de la MO : incubation de l'échantillon simulant un RUTP

Cet échantillon est constitué d'un mélange de 62% d'eaux usées d'entrée de la STEU Seine-Centre (prélevé le 8 décembre 2020) et de 38% d'eau ultra pure. Cet échantillon présente des caractéristiques similaires à un RUTP relativement peu dilué par les eaux de ruissellement pluvial. L'expérience d'incubation a été menée du 8 décembre 2020 au 22 janvier 2021.

Cette manipulation va nous permettre d'optimiser le protocole expérimental du suivi de la cinétique de biodégradation et notamment placer au mieux les différents points de prélèvement dans le temps. Nous allons caractériser l'influence de la nature de l'inoculum sur la cinétique de biodégradation. Trois inocula différents ont été testés (cf. 1.2.3). Dans tous les cas, l'inoculum représente 1% en volume de l'échantillon à incuber.

#### 2.1.1. Evolution de la concentration en COD pendant l'incubation

L'évolution de la concentration en COD pendant l'incubation selon l'inoculum est présentée dans la figure 3. Les points de cinétique 75 h et 140 h ont été retirés pour toutes les conditions d'ensemencement en raison de contaminations d'un des deux réplicas.

Les concentrations initiales de COD se situent entre 15 et 17 mgC.L<sup>-1</sup> dans les différents réacteurs quel que soit l'ensemencement réalisé. Nous observons dans les premières heures de l'incubation (au moins jusqu'à 5 h d'incubation) une période de latence pendant laquelle la concentration en COD ne varie pas de manière significative. Cette période de latence peut être expliquée par notre protocole expérimental. En effet, l'ensemencement se fait avec l'ajout de 1% en volume d'un inoculum de même nature que l'échantillon incubé. La flore bactérienne initialement présente dans l'échantillon est donc diluée d'un facteur 100, ce qui explique probablement au moins en partie la très faible biodégradation dans les premières heures de l'incubation.

Après cette période de latence, nous pouvons observer une très forte diminution du COD puisqu'au bout de 15 h d'incubation, le COD se situe autour de 10 mgC.L<sup>-1</sup> soit une baisse d'environ 40%. Lors de cette première expérience d'incubation, la période de très forte dégradation (entre 5 h et 15 h d'incubation) a correspondu avec la nuit, il n'y a donc pas eu de prélèvement pendant cette période permettant de mieux documenter cette baisse de COD. La biodégradation se poursuit ensuite à un rythme moins soutenu jusqu'à 200 h d'incubation où le COD atteint environ 5 mgC.L<sup>-1</sup> soit une baisse de près de 70% par rapport à l'état initial et de 50% par rapport à 15h d'incubation. La concentration en COD ne va ensuite plus varier de manière importante jusqu'à 1080 h d'incubation.

Etant donné le peu de données pendant la période de forte biodégradation de la MO, la modélisation par le modèle de décroissance à deux phases montre des incertitudes assez fortes sur les paramètres, les résultats de cette modélisation ne sont donc pas présentés pour cette première incubation. Les expériences d'incubation suivantes ont été menées de façon à pouvoir prélever pendant cette période de biodégradation intense. Toutefois, à titre indicatif, des vitesses de diminution du COD ont été calculées entre 5 h et 15 h d'incubation et entre 15 h et 200 h : elles figurent dans le tableau 2. Entre 5 h et 15 h, la vitesse de diminution du COD est potentiellement sous-estimée en raison du manque de points de prélèvements et du fait que nous ne savons pas quand s'achève la période de latence. Malgré cela, la vitesse de diminution du COD entre 5 h et 15 h est plus de 20 fois plus élevée comparée à la vitesse de diminution du COD observée entre 15 h et 200 h d'incubation. Il semble donc que ce suivi de la biodégradation dans le temps nous permette d'accéder à au moins trois fractions de MOD en termes de cinétique de biodégradation avec une fraction rapidement biodégradée en une quinzaine d'heures dans nos conditions expérimentales, une fraction lentement biodégradée en environ 200 heures et une fraction de MOD réfractaire non biodégradée en 45 jours dans nos conditions expérimentales.

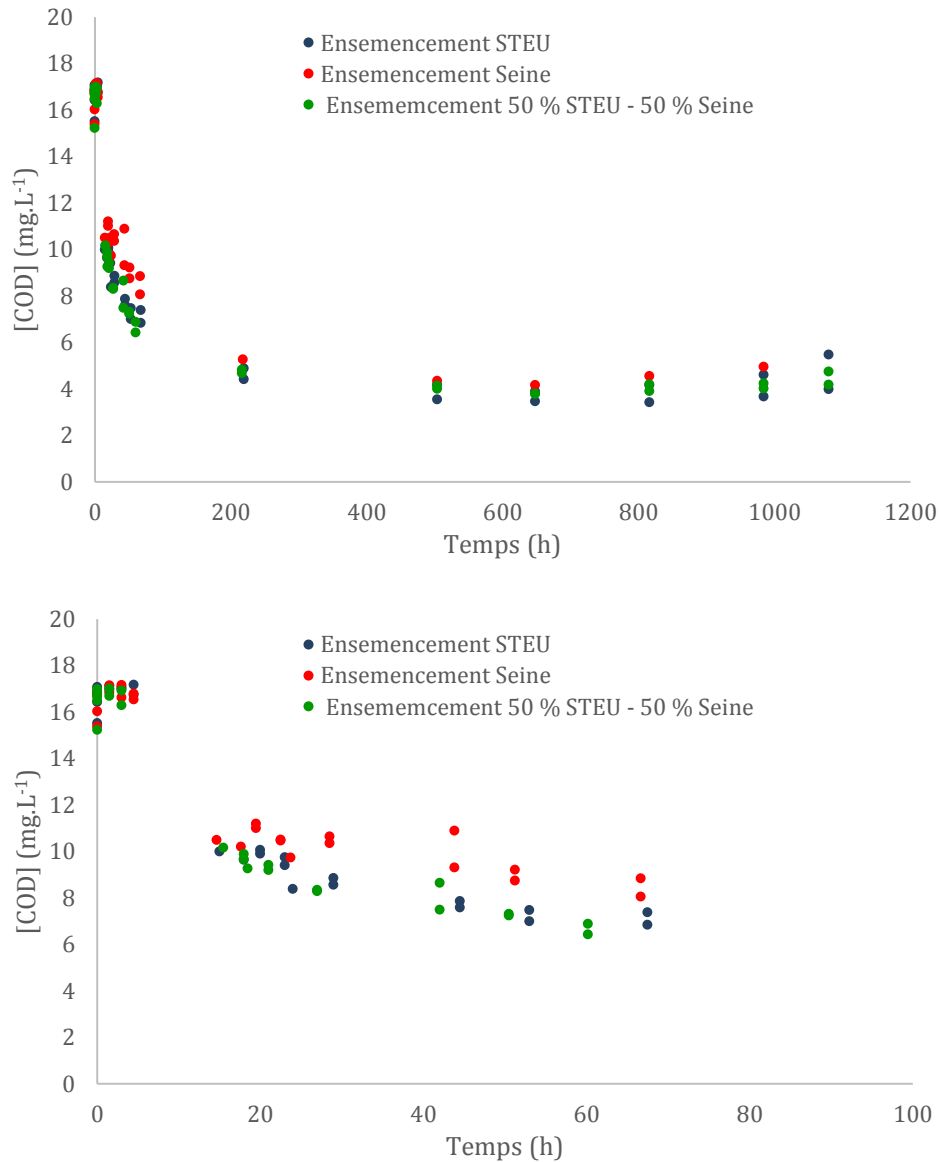


Figure 3. Evolution de la concentration en COD selon la nature de l'ensemencement pendant l'incubation (haut) avec un zoom sur les 4 premiers jours (bas).

Tableau 2. Vitesse de variation de la concentration en COD selon la période d'incubation.

Période d'incubation	Vitesse variation de la concentration en COD
0 h-5 h	$\cong 0$
5 h-15 h	$= -0.6 \text{ mgC.L}^{-1}\text{h}^{-1}$
15 h-200 h	$= -0.027 \text{ mgC.L}^{-1}\text{h}^{-1}$
200 h-1080 h	$\cong 0$

Nous pouvons noter que pour certains points de ce suivi cinétique (entre 20 h et 70 h d'incubation), il semble que la diminution du COD soit légèrement moins rapide avec l'inoculum Seine comparé à un inoculum STEU ou STEU/Seine. A partir de 200 h d'incubation, ces différences ne sont plus présentes. Il est toutefois possible que la répartition de la MOD en fractions rapidement et lentement biodégradables soit influencée par la nature de l'inoculum. Ceci sera vérifié dans la suite de cette action. Les autres incubations présentées dans ce rapport ont été effectuées avec un inoculum qui était issu de l'échantillon à incuber (1% v/v filtré à 2  $\mu\text{m}$ ).

### 2.1.2. Evolution de l'intensité des bandes de fluorescence

L'évolution pendant l'incubation de l'intensité des différentes bandes de fluorescence est présentée dans les figures 4 à 8. Ces bandes varient de manière très différente.

La bande  $\alpha$  augmente d'environ 50% pendant la totalité de l'incubation. Elle augmente d'abord d'environ 20% dans les 100 premières heures, puis semble rester assez stable jusqu'à 900 h et augmente à nouveau d'environ 20% jusqu'à 1080 h. La bande  $\beta$  montre une décroissance d'environ 10% dans les 200 premières heures puis une augmentation d'environ 25% à 30% jusqu'à 1080 h.

Les bandes  $\alpha'$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  montrent une tendance tout à fait opposée aux bandes  $\alpha$  et  $\beta$ , avec une très forte diminution dans les 100 à 150 premières heures. Cette diminution est d'environ 40% pour la bande  $\alpha'$ , 65% pour les bandes  $\gamma$  et  $\delta$ . Pour ces 3 bandes, on peut noter une tendance à l'augmentation à partir de 600 à 800 h d'incubation jusqu'à 1080 h. Cette augmentation est de l'ordre de 35% pour la bande  $\alpha'$  et beaucoup plus difficile à évaluer pour les bandes  $\gamma$  et  $\delta$  étant donnée la forte variabilité observée entre les réplicas pour ces temps d'incubation.

La tendance observée pour la diminution du COD concernant l'influence de l'ensemencement semble un peu plus marquée ici pour les bandes  $\alpha'$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  (cf. zoom figures 7 et 8), pour lesquelles la décroissance est plus faible en présence de l'inoculum Seine dans 20 à 70 premières heures de l'incubation. Par exemple, pour la bande  $\delta$ , autour de 50 h d'incubation, la décroissance par rapport à l'état initial est d'environ 30% dans le cas de l'ensemencement Seine alors qu'elle atteint déjà près de 60% dans le cas des ensemencements STEU et STEU/Seine. Au-delà de 70 h d'incubation, étant donnée la variabilité entre les différents réplicas pour un même type d'ensemencement, on ne distingue plus de différence significative de diminution entre les différents types d'ensemencement. Toutefois ces différences de cinétique de biodégradation entre les temps 15h et 70h pourraient influencer la répartition entre les fractions de MOD rapidement et lentement biodégradables.

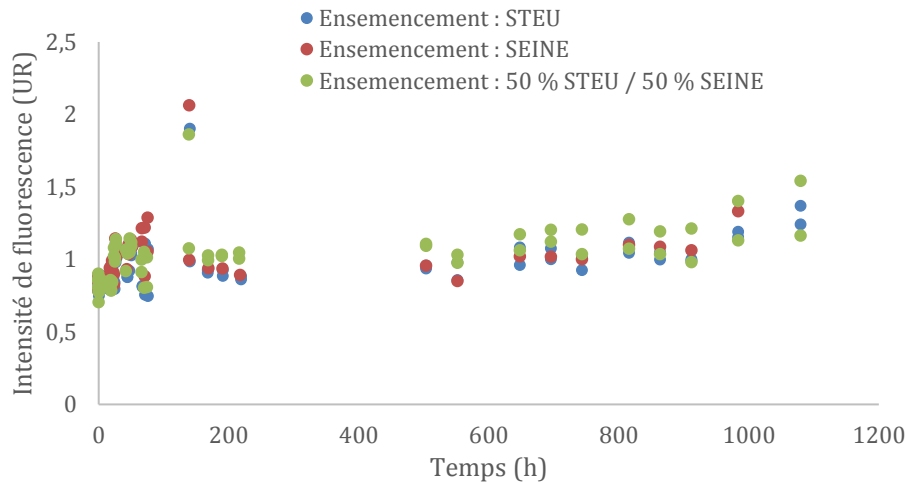


Figure 4. Evolution de l'intensité de fluorescence (UR) de la bande  $\alpha$  pendant l'incubation selon la nature de l'ensemencement.

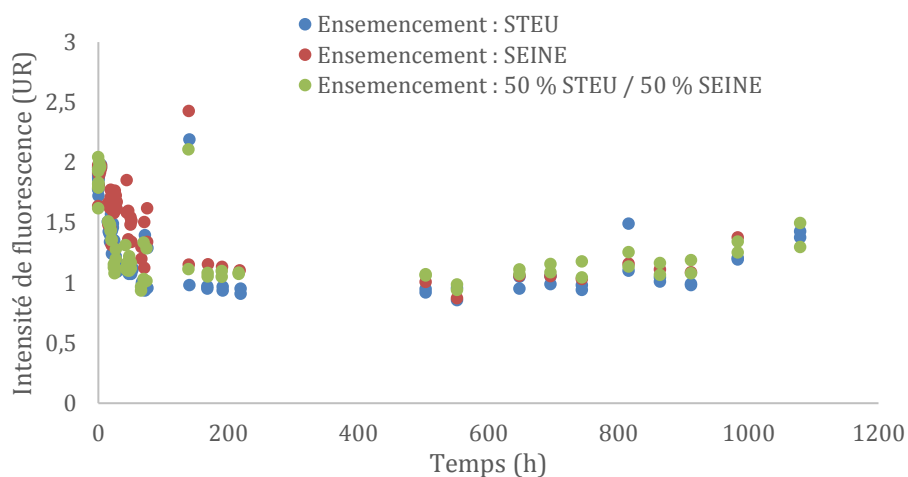


Figure 5. Evolution de l'intensité de fluorescence (UR) de la bande  $\alpha'$  pendant l'incubation selon la nature de l'ensemencement.

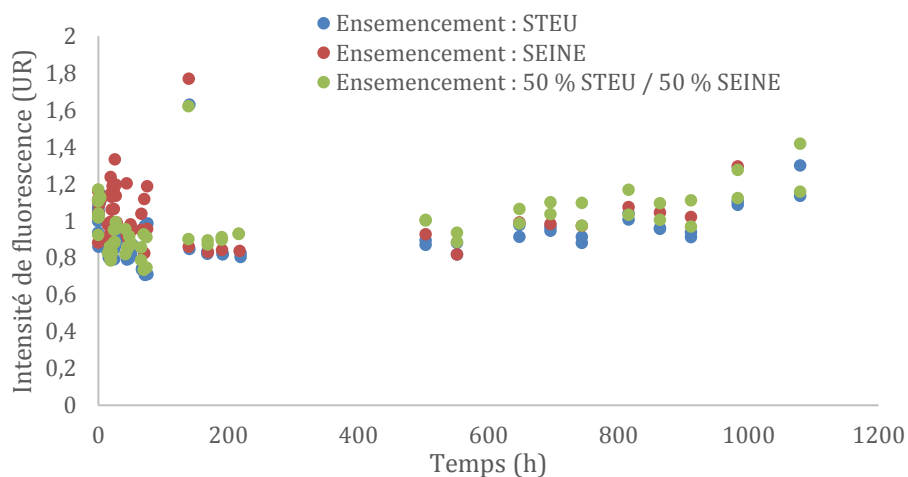


Figure 6. Evolution de l'intensité de fluorescence (UR) de la bande  $\beta$  pendant l'incubation selon la nature de l'ensemencement.

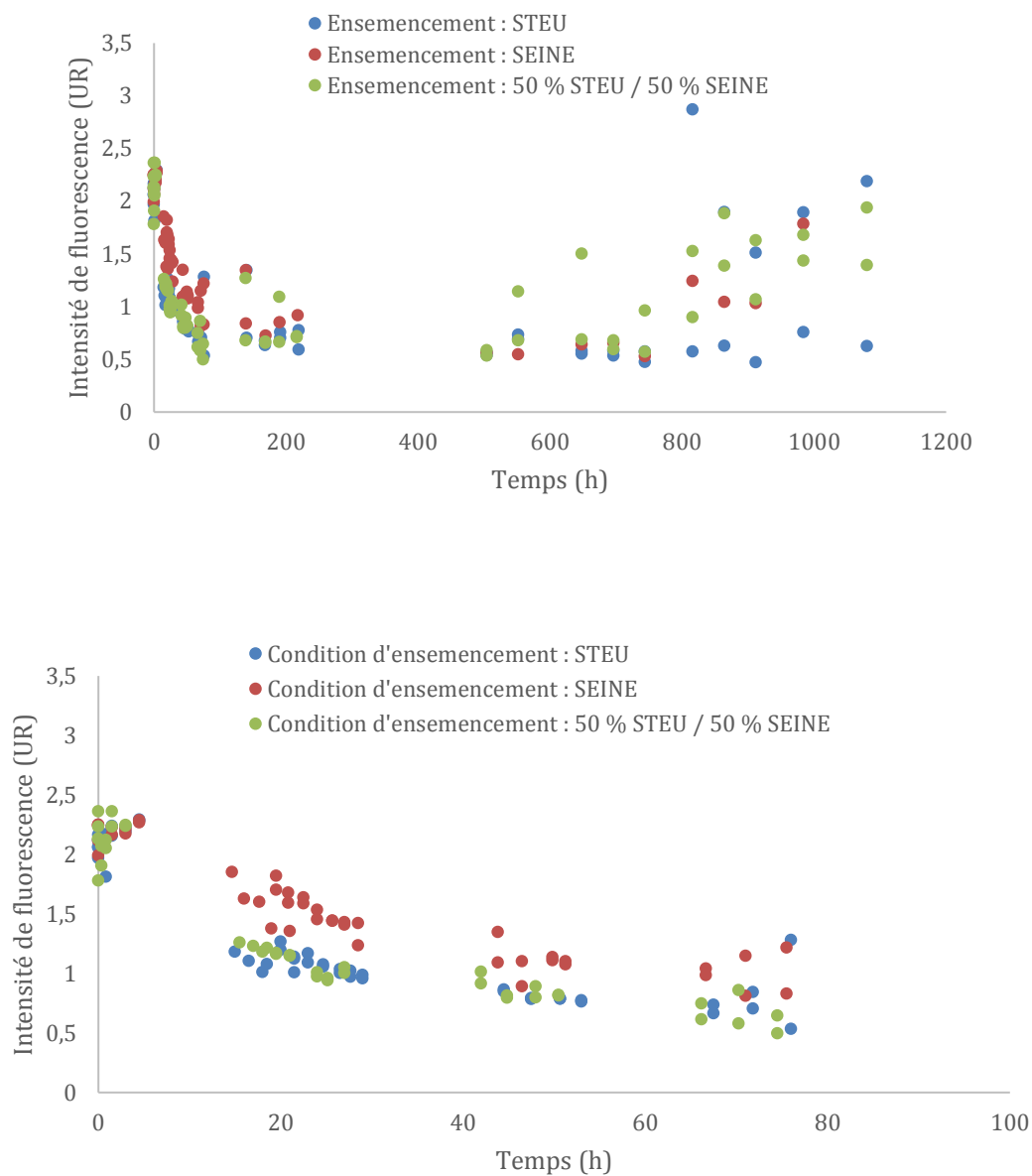


Figure 7. Evolution de l'intensité de fluorescence (UR) de la bande  $\gamma$  pendant la durée totale de l'incubation (haut) et avec un zoom sur les 4 premiers jours selon la nature de l'ensemencement.

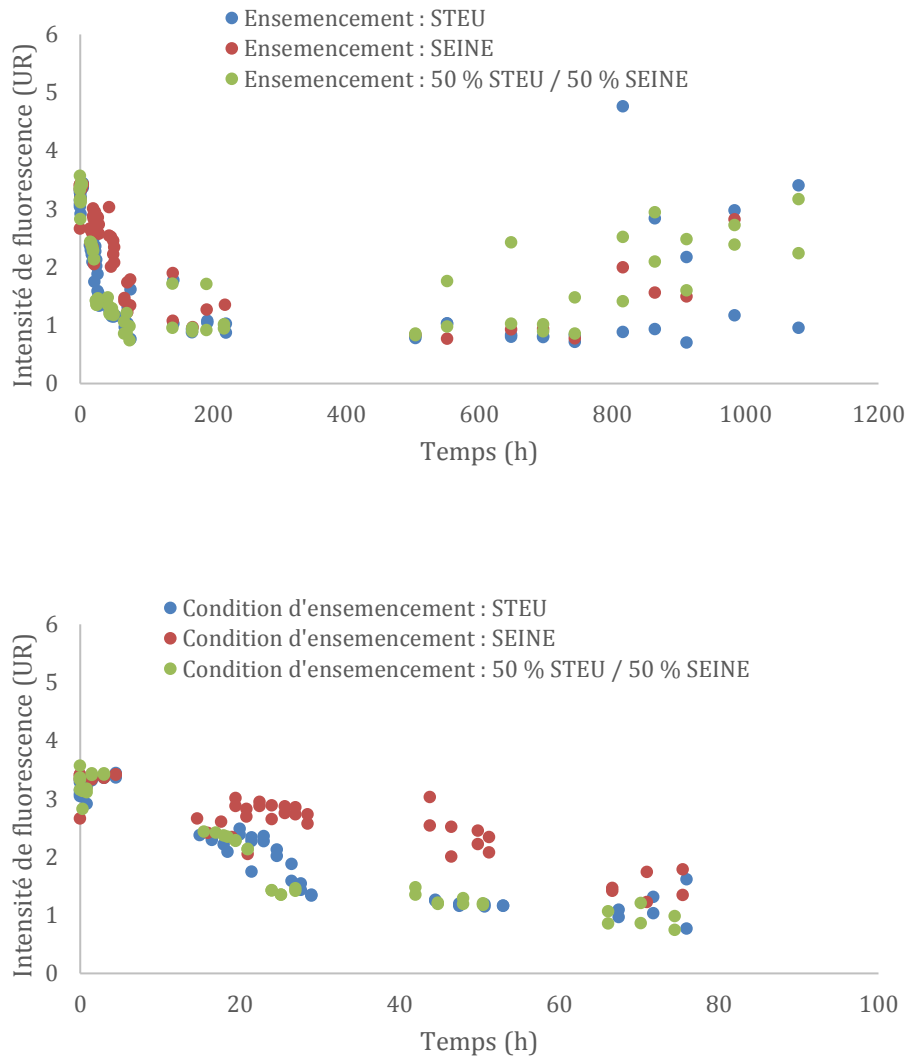


Figure 8. Evolution de l'intensité de fluorescence (UR) de la bande  $\delta$  pendant la durée totale de l'incubation (haut) et avec un zoom sur les 4 premiers jours selon la nature de l'ensemencement.

### 2.1.3. Conclusion

Ces tests auront permis de mettre en évidence la très forte réactivité de la MOD contenue dans des RUTP ou dans des rejets directs d'eaux usées non traitées dans les milieux aquatiques. Il est donc tout à fait nécessaire de réduire au maximum la durée entre le prélèvement et la filtration à  $0,2 \mu\text{m}$  de l'échantillon à incuber. Dans nos conditions expérimentales, la concentration en COD de l'échantillon prélevée en entrée de la STEU Seine Centre a diminué de 20% entre le prélèvement et la fin de la filtration à  $0,2 \mu\text{m}$  sur une durée de 6 h.

Nous avons donc modifié notre protocole expérimental pour diminuer le plus possible ce temps. Lorsque c'était possible, il a été décidé de filtrer l'échantillon directement sur son lieu de prélèvement. Cela fait gagner le temps de transport de l'échantillon entre son lieu de prélèvement et le laboratoire. En outre, afin de limiter le temps de filtration, le volume à filtrer est réduit au minimum nécessaire et le diamètre des filtres à  $0,2 \mu\text{m}$  a été augmenté de 45 mm à 90 mm.

A titre d'exemple, pour l'incubation de l'échantillon d'entrée de STEU Seine-Centre commencée le 14 juin 2021 et qui va être présentée ci-après, l'échantillon a été filtré sur place dans le Hall d'essai du SIAAP. Le temps écoulé entre le prélèvement et la filtration à  $0,2 \mu\text{m}$  n'a été que de 1h30 et la concentration en COD n'a pas été significativement modifiée dans cet intervalle de temps.

Quoi qu'il en soit, dans le futur, pour chaque prélèvement, une aliquote sera immédiatement filtrée (filtre seringue, en polyéthersulfone) afin de déterminer la concentration en COD initiale. La fraction de COD perdue entre le prélèvement et la filtration sera considérée comme étant de la MOD rapidement biodégradable et ajoutée à la fraction correspondante déterminée à la suite de l'incubation de l'échantillon.

Cette forte réactivité de la MOD contenue dans les échantillons de certains rejets urbains limite la possibilité d'utiliser des préleveurs automatiques pour, par exemple, prélever des RUTP au niveau des déversoirs d'orage. En effet, étant donné le temps important entre la collecte de l'échantillon et sa filtration au laboratoire, une part sans doute importante de la fraction rapidement biodégradable serait perdue avant l'incubation de l'échantillon et non estimable. L'utilisation de préleveurs automatiques n'est donc sans doute pas pertinente si l'objectif est d'estimer la quantité de MOD rapidement biodégradable contenue dans l'échantillon.

Ces tests nous ont également permis de montrer que l'influence de la nature de l'inoculum est visible sur la cinétique de biodégradation et pourrait modifier la répartition de la MOD contenue dans l'échantillon entre les fractions rapidement et lentement biodégradables. Cet aspect sera approfondi en 2022. Pour la suite des manipulations d'incubations présentées dans ce rapport, l'ensemencement a été réalisé avec un inoculum constitué d'une aliquote (1% v/v) de l'échantillon incubé filtré à 2  $\mu\text{m}$ .

## **2.2. Incubation de l'échantillon d'entrée de la STEU Seine Centre**

L'incubation de cet échantillon d'entrée de la STEU Seine-Centre a été menée du 14 juin au 30 juillet 2021. Cet échantillon représente le type d'apport aux milieux aquatiques dû à un mauvais branchement.

### **2.2.1. Evolution de la concentration en COD pendant l'incubation**

Les concentrations initiales de COD se situent entre 29 et 31  $\text{mgC.L}^{-1}$  dans les différents réacteurs (cf. Figure 9). Pendant les 16 premières heures, la cinétique de biodégradation est très lente sans doute parce que la population de microorganismes est très faible au début de l'incubation comme cela a été indiqué précédemment.

Après cette période de latence, nous pouvons observer entre 16 h et 50 h d'incubation une très forte diminution du COD, puisqu'au bout de 50 h d'incubation le COD se situe autour de 12  $\text{mgC.L}^{-1}$  soit une baisse d'environ 60%. La biodégradation se poursuit ensuite avec un rythme moins soutenu jusqu'à 360 h d'incubation, où le COD atteint environ 7  $\text{mgC.L}^{-1}$ , soit une baisse de 75% par rapport à l'état initial et de 40% par rapport à 50 h d'incubation. La concentration en COD va ensuite diminuer faiblement jusqu'à 860 h (5  $\text{mgC.L}^{-1}$ ) pour se stabiliser jusqu'à 1080 h d'incubation.

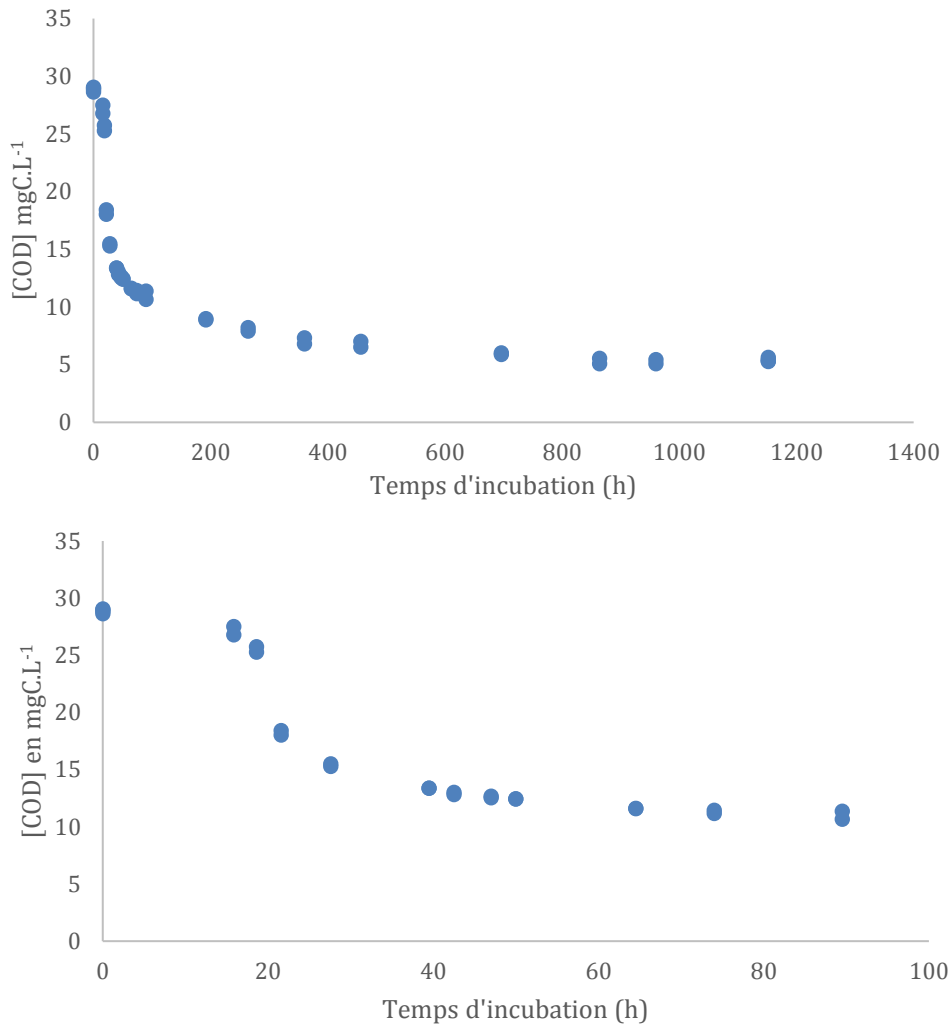


Figure 9. Evolution de la concentration en COD pendant l'incubation (haut) de l'échantillon d'entrée de la STEU Seine Centre avec un zoom sur les 4 premiers jours (bas).

### 2.2.2. Modélisation de la diminution la concentration en COD pendant l'incubation par un modèle de décroissance à deux phases

La décroissance du COD pendant l'incubation a été ajustée par un modèle à deux exponentielles décroissantes simulant une décroissance à deux phases (cf. 1.3.6). Pour réaliser cette modélisation avec un modèle à deux exponentielles décroissantes, nous avons dû éliminer la période de latence pendant laquelle la biodégradation est nulle ou très faible (cf. zoom Figure 9). Pour ce faire, l'origine des temps de l'incubation a été décalée au temps  $t = 16$  h d'incubation. La faible quantité de COD consommée durant ces 16 premières heures a été ajoutée à la fraction rapidement biodégradable.



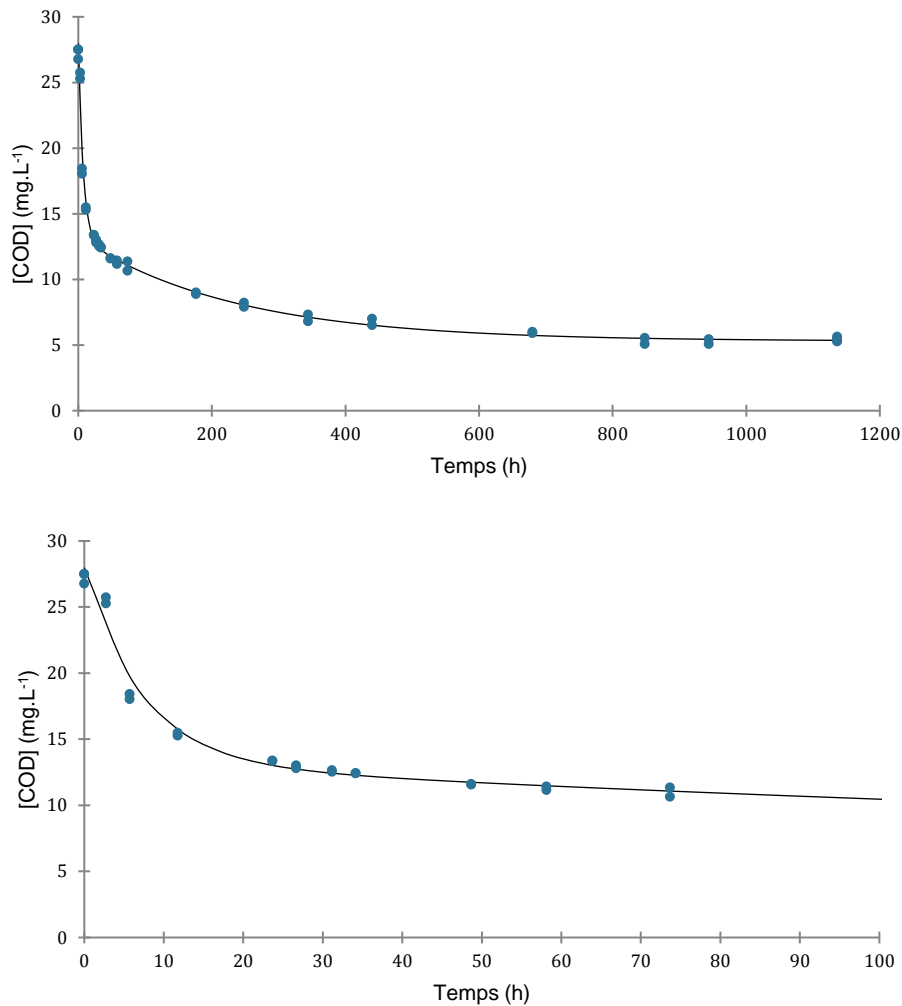


Figure 10. Ajustement du modèle de décroissance à deux phases aux points expérimentaux lors de l'incubation de l'échantillon d'entrée de la STEU Seine Centre (haut) avec un zoom sur les 4 premiers jours (bas).

Le modèle obtenu est le suivant :

$$\text{COD (mg.L}^{-1}\text{)} = 7.91 \cdot \exp(-0.00425 \cdot t(\text{h})) + 16.47 \cdot \exp(-0.137 \cdot t(\text{h})) + 5.29 \quad (\text{eq2})$$

L'ajustement du modèle de décroissance à deux phases aux points expérimentaux est tout à fait satisfaisant (cf. Figure 10). La moyenne des résidus est de 3% et n'excède pas 9%. L'erreur standard sur les 5 paramètres ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $K_1$ ,  $K_2$ ) est en moyenne de 5% et toujours inférieure à 10%. Les paramètres du fractionnement du COD sont présentés dans le tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3. Paramètres du fractionnement du COD en 3 fractions rapidement biodégradable, lentement biodégradable et réfractaire obtenus par l'utilisation du modèle de décroissance à deux phases

	Fraction par rapport au COD total (%)	Concentration initiale (mgC.L <sup>-1</sup> )	Constante de vitesse de biodégradation K (h <sup>-1</sup> )	Constante de temps 1/K (h)
<b>COD rapidement biodégradable</b>	55,5	16,5	0,137	7,3
<b>COD lentement biodégradable</b>	26,7	7,91	0,00425	234,9
<b>COD réfractaire</b>	17,8	5,29	/	/

Plus de la moitié du COD est rapidement biodégradable avec une constante de temps d'environ 7 h. Cela signifie donc que la moitié du COD rapidement biodégradable est dégradée en environ 5 h. Cela confirme la nécessité de traiter très rapidement l'échantillon à incuber entre le prélèvement et la filtration à 0,2  $\mu\text{m}$  qui stoppe théoriquement la biodégradation. Le COD lentement biodégradable représente environ un quart du COD total. La constante de temps est d'environ 230 h ce qui signifie que la moitié de cette fraction est biodégradée en 160 h, soit environ une semaine. Le COD réfractaire représente un peu moins de 20% du COD total, il n'est pas biodégradé en 45 jours dans nos conditions expérimentales. Cette fraction peut contenir des molécules réfractaires initialement présentes dans l'échantillon ou formées pendant la biodégradation.

Des modèles à 1 ou 3 exponentielles décroissantes ont également été testés, mais n'ont pas donné satisfaction avec des résidus et des erreurs standards sur les paramètres beaucoup plus élevés.

### 2.2.3. Evolution de l'intensité des bandes de fluorescence

L'intensité de fluorescence évolue de manière tout à fait différente pendant l'incubation selon la bande de fluorescence considérée. La bande  $\alpha$  varie très peu pendant les 45 jours de l'incubation (Figure 11). A l'opposé, les bandes  $\alpha'$  et  $\beta$  et surtout les bandes  $\delta$  et  $\gamma$  vont très fortement décroître au cours de l'incubation.

Seule l'évolution des bandes  $\alpha$ ,  $\delta$  et  $\gamma$  est détaillée ici (Figures 11, 12 et 13). La décroissance de la fluorescence des bandes  $\delta$  et  $\gamma$  a été modélisée par le modèle de décroissance à deux phases (cf. eq 1, 3 et 4). L'ajustement du modèle avec les points expérimentaux est illustré dans les figures 13 et 15, les paramètres de fractionnement obtenus sont présentés dans les tableaux 4 et 5. Pour ces modélisations, le dernier point de la cinétique à 45 jours a été retiré en raison de la forte variabilité des répliques.

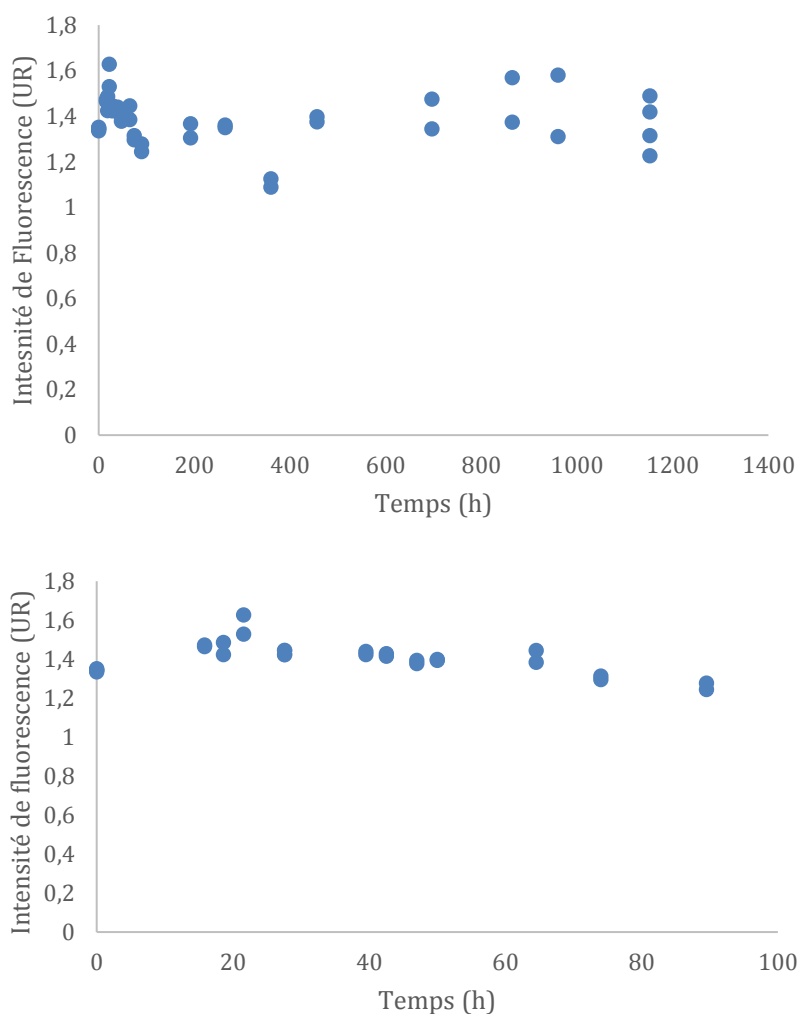


Figure 11. Evolution de l'intensité de fluorescence de la bande  $\alpha$  (UR) pendant la durée d'incubation (haut) et zoom sur les 100 premières heures (bas) de l'échantillon d'entrée de la STEU Seine-Centre.

Il est remarquable que le COD diminue d'environ 80% pendant l'incubation alors que la bande  $\alpha$  reste quasiment constante, il semble donc que cette bande pourrait être préférentiellement liée à de la MO réfractaire.

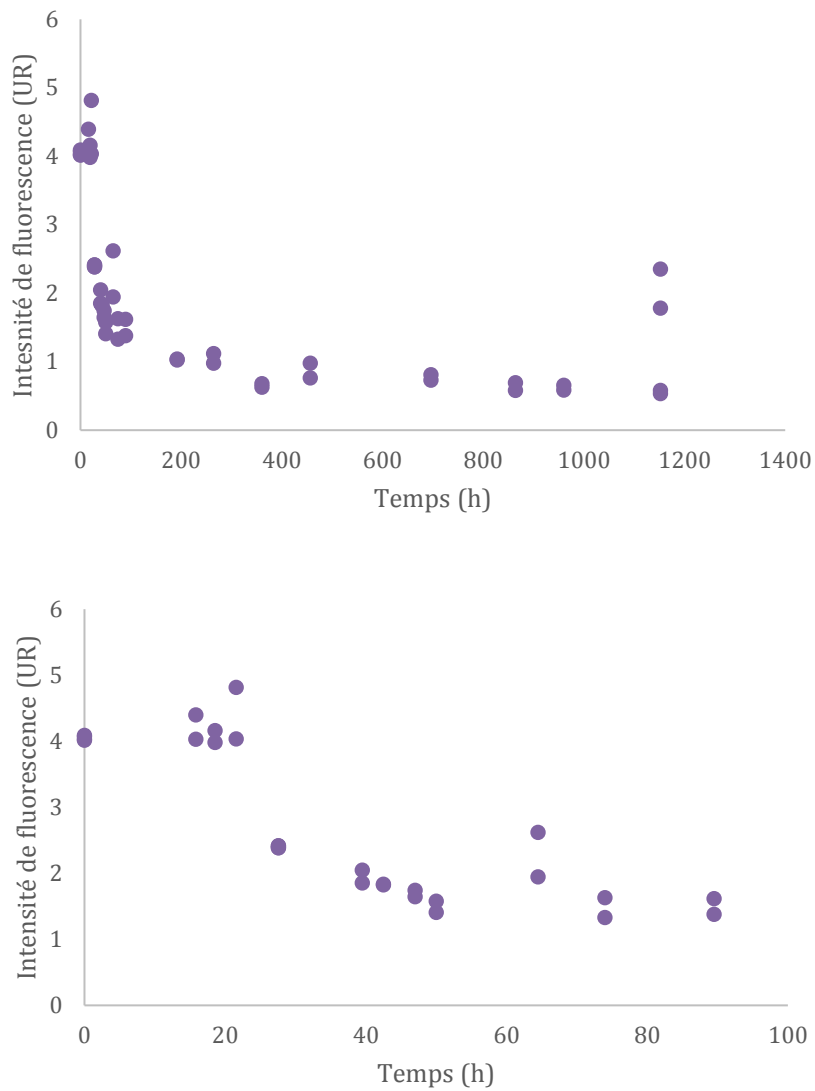


Figure 12. Evolution de l'intensité de fluorescence de la bande  $\delta$  (UR) pendant la durée d'incubation (haut) et zoom sur les 100 premières heures (bas) de l'échantillon d'entrée de STEU Seine-Centre

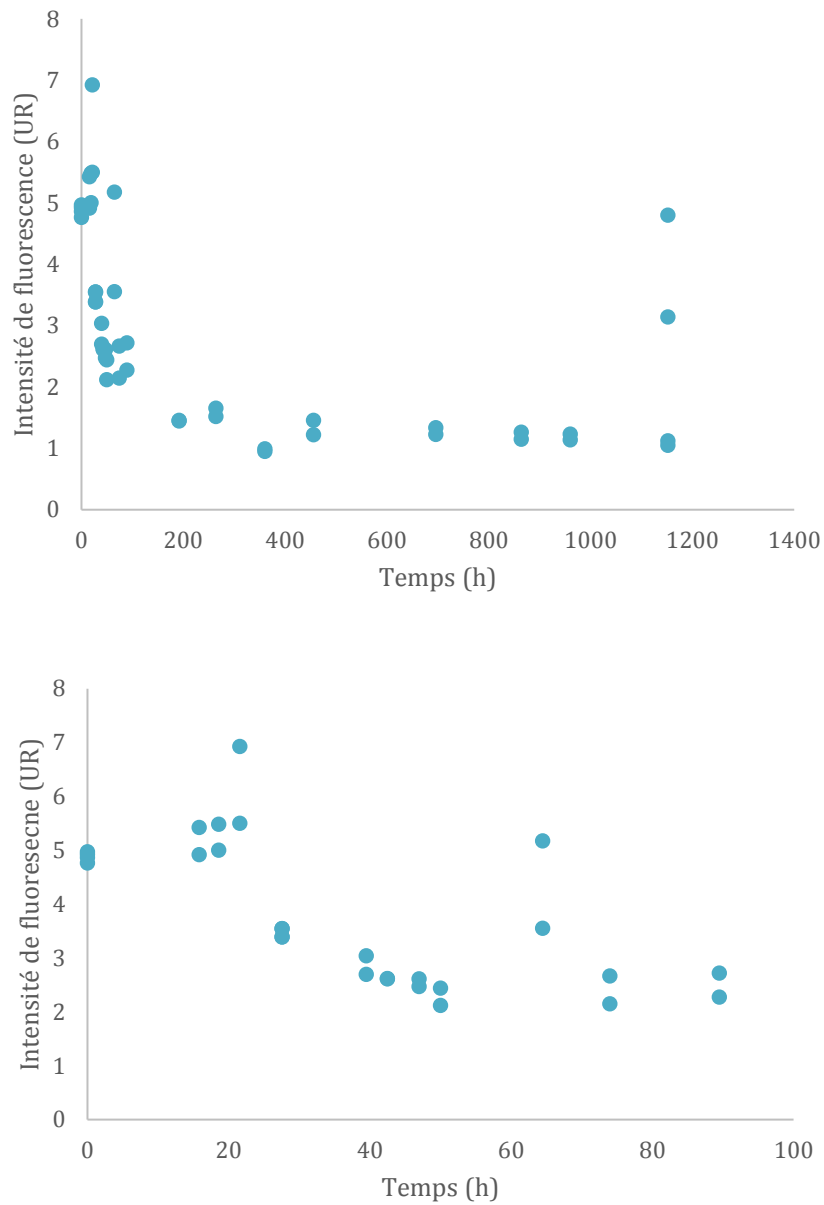


Figure 13. Evolution de l'intensité de fluorescence de la bande  $\gamma$  (UR) pendant la durée d'incubation (haut) et zoom sur les 100 premières heures (bas) de l'échantillon d'entrée de STEU Seine-Centre

Les bandes de type protéine ( $\delta$  et  $\gamma$ ) baissent très fortement durant l'incubation avec une cinétique très proche de ce qui est observé pour le COD. Dans les deux cas, une forte variabilité entre les répliques est observée à la fin de l'incubation, ce phénomène est pour l'instant inexplicable.

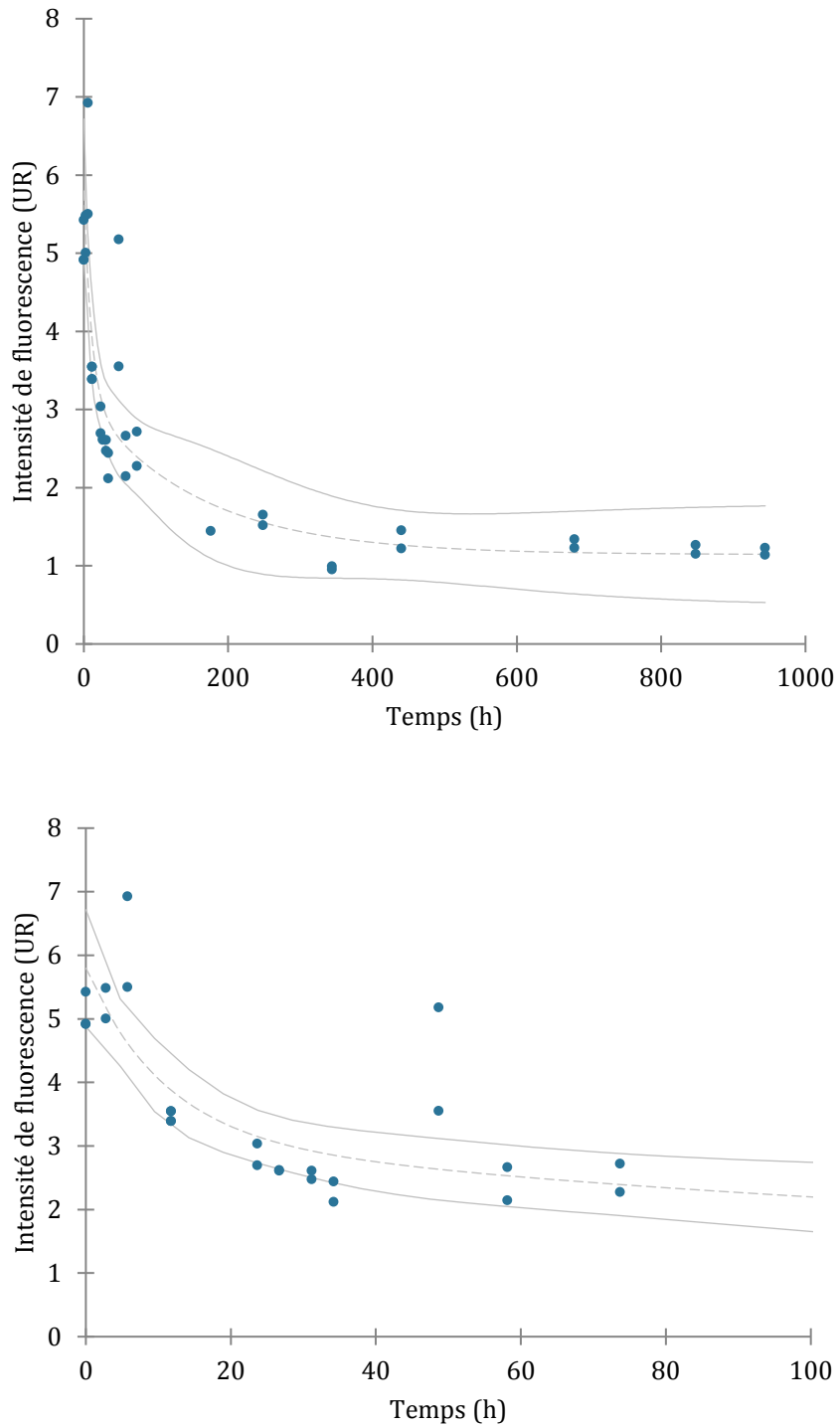


Figure 14. Evolution de l'intensité de fluorescence de la bande  $\delta$  (UR), sans la période de latence et avec une échelle des temps décalée, pendant la durée d'incubation (haut) et zoom sur les 100 premières heures (bas) de l'échantillon d'entrée de la STEU Seine Centre avec les points expérimentaux et la courbe modèle de décroissance à deux phases

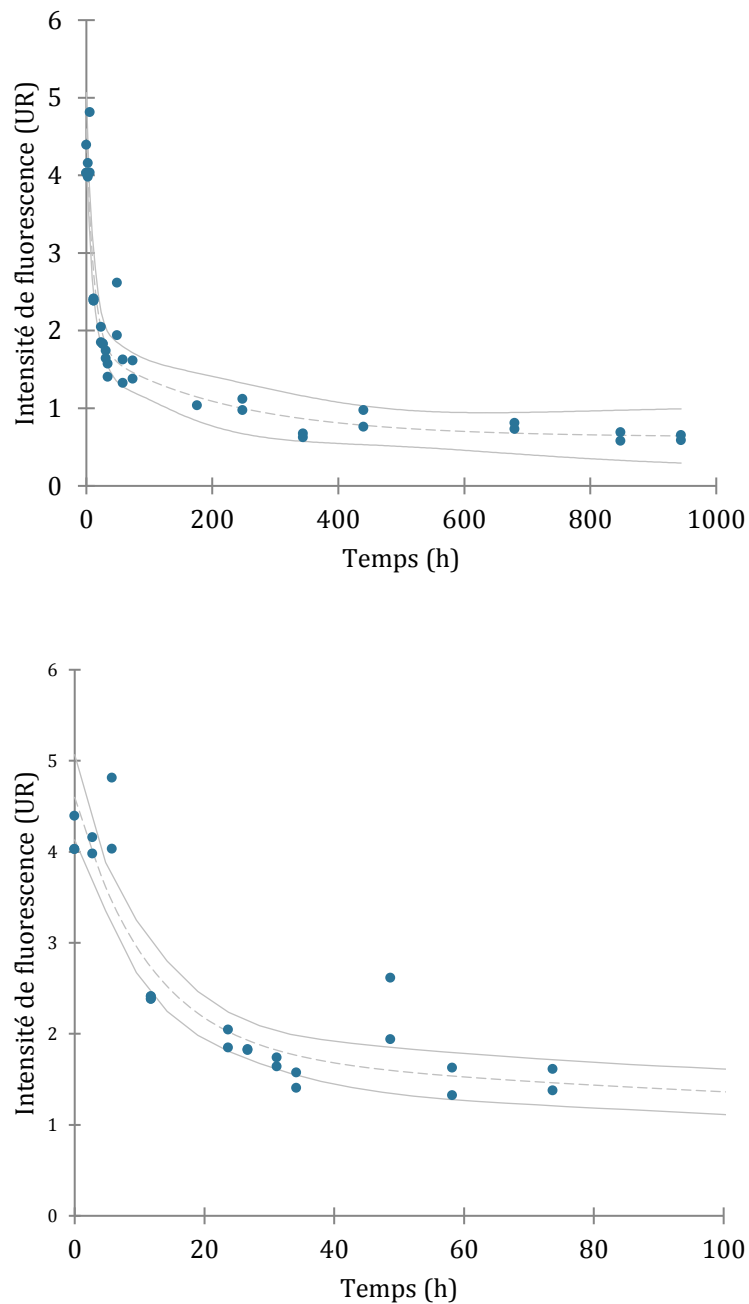


Figure 15. Evolution de l'intensité de la bande  $\gamma$  (UR), sans la période de latence et avec une échelle des temps décalée, pendant la durée d'incubation (haut) et zoom sur les 100 premières heures (bas) de l'échantillon d'entrée de la STEU Seine Centre avec les points expérimentaux et la courbe modèle de décroissance à deux phases.

L'équation du modèle obtenue pour la décroissance de la bande  $\delta$  est présentée ci-dessous

$$\text{Fluorescence bande } \delta = 1.99 \cdot \exp(-0.0063 \cdot \text{Temps (h)}) + 2.66 \cdot \exp(-0.093 \cdot \text{Temps (h)}) + 1.14 \quad (\text{eq 3})$$

Les valeurs des différents paramètres du modèle figurent dans le tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4. Paramètres du fractionnement de la bande de fluorescence  $\delta$  en 3 fractions rapidement biodégradables, lentement biodégradables et réfractaire obtenus par l'utilisation du modèle de décroissance à deux phases.

	Fraction par rapport à Fluorescence $\delta$ totale (%)	Fluorescence $\delta$ initiale (UR)	Constante de vitesse de décroissance K (h <sup>-1</sup> )	Constante de temps 1/K (h)
Fluorescence $\delta$ liée à MO rapidement biodégradable	45,9	2,66	0,093	10,7
Fluorescence $\delta$ liée à MO lentement biodégradable	34,4	1,99	0,0063	157,4
Fluorescence $\delta$ liée à MO réfractaire	19,7	1,14	/	/

L'équation du modèle obtenue pour la décroissance de la bande  $\gamma$  est présentée ci-dessous

$$\text{Fluorescence Bande } \gamma = 1.16 * \exp(-0.0046 * \text{Temps (h)}) + 2.80 * \exp(-0.088 * \text{Temps (h)}) + 0.63 \quad (\text{eq 4})$$

Les valeurs des différents paramètres du modèle figurent dans le tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5. Paramètres du fractionnement de la bande de fluorescence  $\gamma$  en 3 fractions rapidement biodégradables, lentement biodégradables et réfractaire obtenus par l'utilisation du modèle de décroissance à deux phases.

	Fraction par rapport à Fluorescence $\gamma$ totale (%)	Fluorescence $\gamma$ initiale (UR)	Constante de vitesse de décroissance K (h <sup>-1</sup> )	Constante de temps 1/K (h)
Fluorescence $\gamma$ liée à MO rapidement biodégradable	61,0	2,80	0,088	11,4
Fluorescence $\gamma$ liée à MO lentement biodégradable	25,3	1,16	0,0046	216,1
Fluorescence $\gamma$ liée à MO réfractaire	13,7	0,62	/	/

Pour la fluorescence, la qualité de l'ajustement du modèle aux points expérimentaux est moins bonne que dans le cas du COD. En effet, pour les deux bandes ( $\gamma$  et  $\delta$ ), les résidus s'élèvent à en moyenne 12 à 15% et les erreurs standards sur les paramètres sont de l'ordre de 20 à 30%. Ceci peut s'expliquer en partie par une variabilité plus importante entre les réplicas dans le cas des mesures de fluorescence, comparé à ce qui est observé pour le COD.

Nous pouvons constater que les paramètres de fractionnement sont assez proches de ceux observés pour le COD, avec une fraction rapidement biodégradable qui représente environ la moitié de la fluorescence. La fraction lentement biodégradable représente un quart à un tiers du total tandis que la partie réfractaire représente 15 à 20% du total. Nous pouvons noter que la bande  $\gamma$  est liée à une MO légèrement plus biodégradable que ne l'est la bande  $\delta$ . Les constantes de temps sont similaires entre les deux bandes et le COD et mettent en évidence deux fractions de MOD rapidement et lentement biodégradables dont la cinétique de biodégradation est nettement différente.

Il semble que les bandes protéiniques ( $\gamma$  et  $\delta$ ) soient de bons indicateurs de la fraction de la MO biodégradable tandis que la bande  $\alpha$  soit liée à la MO réfractaire.

### 2.3. Incubation des échantillons de Seine et de sortie de la STEU Seine-Amont

Des tendances relativement similaires à celles de l'échantillon d'entrée la STEU Seine-Centre ont été observées, avec notamment une stabilité de la bande  $\alpha$  et une décroissance des bandes  $\delta$  et  $\gamma$ . Cependant, étant donné d'une part la faible proportion de MOD biodégradable dans ces échantillons avec une décroissance du COD sur 45 jours de moins de 20% pour la sortie de STEU et moins de 10% pour l'échantillon de Seine et d'autre part la variabilité entre les répliques relativement importante des concentrations en COD et des intensités de fluorescence, il est difficile de déceler des tendances statistiquement significatives sur ces paramètres.

## Conclusion

L'objectif de cette action est de mieux caractériser la biodégradabilité de la matière organique dissoute (MOD) contenue dans les différents types de rejets urbains. Il s'agit également de mettre en évidence des indicateurs issus de l'analyse en spectrofluorescence qui pourraient être utilisés comme traceurs pour obtenir les fractions de matière organique rapidement biodégradable, lentement biodégradable et réfractaire présentes dans les rejets urbains et les milieux aquatiques. Ces classes de biodégradabilité sont celles utilisées pour décrire les processus en lien avec la biodégradabilité de la matière organique dissoute (MOD) dans le modèle RIVE.

Afin de réaliser ces objectifs, le suivi de la biodégradation de la MO en fonction du temps a été mené lors d'expériences d'incubation avec différents types de rejets urbains et un échantillon de Seine. La première expérience d'incubation menée sur un échantillon d'entrée de la STEU Seine-Centre a permis d'optimiser le protocole expérimental en soulignant notamment la biodégradation très rapide d'une partie de la MOD contenue dans ces échantillons et donc la nécessité de traiter l'échantillon très rapidement. La nature de l'inoculum semble influencer la cinétique de biodégradation de la MOD pendant les premières dizaines d'heures. Il pourrait donc jouer un rôle non négligeable sur le fractionnement de la MOD entre les fractions rapidement et lentement biodégradables. Cet aspect sera approfondi en 2022.

Il apparaît que dans le cas des eaux usées d'entrée de la STEU Seine-Centre, le suivi de la cinétique de la biodégradation a permis de mettre en évidence 3 fractions de MOD : la fraction rapidement biodégradable (dont la moitié est biodégradée en environ 5 heures), la fraction lentement biodégradable (dont la moitié est biodégradée en une semaine) et la fraction réfractaire non biodégradée en 45 jours. La bande  $\alpha$  (de type substances humiques) semble liée à la MOD réfractaire tandis que l'intensité de fluorescence des bandes  $\delta$  et  $\gamma$  (de type protéine) décroît très rapidement et semble donc liée à la MOD biodégradable. Plus de 60% de la fluorescence de la bande  $\gamma$  est liée à la fraction rapidement biodégradable de la MOD et moins de 15% à la fraction réfractaire.

Ces résultats devront être confirmés en 2022 par d'autres tests d'incubation menés sur différents types de rejets urbains. Une méthodologie devra également être mise en place pour choisir des indicateurs permettant d'estimer dans un échantillon, sur la base d'une mesure de spectrofluorescence, les fractions rapidement et lentement biodégradables ainsi que la fraction réfractaire. Combiné avec la sonde FLUOCOPEE, cela rendrait possible la détermination de ces 3 fractions *in situ*, en temps réel et à haute fréquence.



## Bibliographie

- Artifon V., Zanardi-Lamardo E., Fillmann G. (2019) Aquatic organic matter: Classification and interaction with organic microcontaminants. *Science of the Total Environment* 649 1620–1635
- Bauer JE and Bianchi TS (2011) Dissolved Organic Carbon Cycling and Transformation. In: Wolanski E and McLusky DS (eds.) *Treatise on Estuarine and Coastal Science*, Vol 5, pp. 7–67. Waltham: Academic Press.
- Besemer K., Luef B., Preiner S., Eichberger B., Agis M., Peduzzi P. (2009) Sources and composition of organic matter for bacterial growth in a large European river floodplain system (Danube, Austria). *Org Geochem.* 40(3): 321–331.
- Bormann F. H. and Likens G. E. (1967) *Nutrient Cycling*, *Science*, 155 (3761), pp. 424–429. <https://doi.org/10.1126/science.155.3761.424>
- Buffle J. (1988) Complexation reactions in aquatic system: an analytical approach. Ellis Horwood, New York, p 692
- Campbell PGC. (1995) Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. In: Tessier A, Turner DR (eds) *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. Wiley, Chichester, Grande-Bretagne, pp 45–102
- Cawley K. M., Butler K. D., Aiken G. R., Larsen L. G., Huntington T. G., and M. McKnight D. (2012) Identifying fluorescent pulp mill effluent in the Gulf of Maine and its watershed. *Mar. Pollut. Bull.*, 64(8), pp. 1678–1687.
- Coble, P.G. (1996) Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry* 51 (4), 325–346. doi: 10.1016/0304-4203(95)00062-3
- Goldman, J.H., Rounds, S.A., Needoba, J.A. (2012) Applications of Fluorescence Spectroscopy for Predicting Percent Wastewater in an Urban Stream. *Environmental Science & Technology* 46, 4374–4381. doi: 10.1021/es2041114
- Henderson, R.K., Baker, A., Murphy, K.R., Hambly, A., Stuetz, R.M., Khan, S.J. (2009) Fluorescence as a potential monitoring tool for recycled water systems: A review. *Water Research* 43, 863–881. doi: 10.1016/j.watres.2008.11.027
- Hudson, N., Baker, A., Ward, D., Reynolds, D.M., Brunson, C., Carliell-Marquet, C., Browning, S. (2008) Can fluorescence spectrometry be used as a surrogate for the Biochemical Oxygen Demand (BOD) test in water quality assessment? An example from Southwest England. *Science of The Total Environment* 391, 149–158. doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.10.054
- Lakowicz, J.R. (2006) *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer, New York.
- Lambert T., Bouillon S., Darchambeau F., Morana C., Roland F.A.E., Descy J-P., Borges A.V. (2017) Effects of human land use on the terrestrial and aquatic sources of fluvial organic matter in a temperate river basin (The Meuse River, Belgium). *Biogeochemistry* 136, <https://doi.org/10.1007/s10533-017-0387-9>
- Matar Z. (2012) Influence de la matière organique dissoute d'origine urbaine sur la spéciation et la biodisponibilité des métaux dans les milieux récepteurs anthropisés, Thèse Université Paris-Est, 258p
- McKnight, D.M., Boyer, E.W., Westerhoff, P.K., Doran, P.T., Kulbe, T., Andersen, D.T. (2001). Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnology and Oceanography* 46, 38–48.
- Nebbioso A. and Piccolo A. (2013) Molecular characterization of dissolved organic matter (DOM): a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.*, 405 (1), pp. 109–124. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6363-2>
- Parlanti, E., Wörz, K., Geoffroy, L., Lamotte, M., (2000) Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a croastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Organic Geochemistry* 31 (12), 1765–1781. doi: 10.1016/S0146-6380(00)00124-8
- Rouessac, F., Rouessac, A., Cruché, D. (2004) *Analyse chimique - 6e éd.: Méthodes et techniques instrumentales modernes*

- Servais, P., Billen G., Hascoët M-C. (1987) Determination of the biodegradable fraction of dissolved organic matter in water. *Water Research* 21 (4), 445-450
- Servais P., Anzil A., Ventresque C. (1989) Simple Method for Determination of Biodegradable Dissolved Organic Carbon in Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(10), 2732-2734
- Stedmon, C.A., Bro, R. (2008) Characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: a tutorial. *Limnology and Oceanography: Methods* 6, 572–579.
- Stedmon, C.A., Cory, R.M. (2014) Biological origins and fate of fluorescent dissolved organic matter. in P Coble, J Lead, A Baker, D Reynolds & RGM Spencer (eds), Aquatic organic matter fluorescence. Cambridge University Press, pp. 278-300. Cambridge Environmental Chemistry Series
- Vacher, L. (2004) Étude par fluorescence des propriétés de la matière organique dissoute dans les systèmes estuariens : cas des estuaires de la Gironde et de la Seine. Bordeaux 1.
- Varrault G., Goffin A., Musabimana N., Guérin S., Rocher V. (2021). Développement d'un capteur de fluorescence pour la caractérisation *in situ* et à haute fréquence de la matière organique dans les milieux aquatiques. Rapport Piren-Seine, 15p.
- Vodacek, A., Blough, N.V., DeGrandpre, M.D., Peltzer, E.T., Nelson, R.K. (1997) Seasonal variation of CDOM and DOC in the Middle Atlantic Bight: terrestrial inputs and photooxidation. *Limnol. Oceanogr.* 42, 674–686.
- Weber, J.H. (1988) Binding and Transport of Metals by Humic Materials. Frimmel F.H., Christman R.F. Eds, Humic Substances and their Role in the Environment, Dahlem Workshop Reports, John Wiley & Sons, New York, 165-178.