



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Nationale Supérieure
de Géologie

[M] 2004 JUNG, A.-V.
Laboratoire Environnement et
Minéralurgie

THESE

présentée à

l'Institut National Polytechnique de Lorraine

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'INPL

Géosciences - Chimie de l'Environnement

par

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

Aude-Valérie JUNG

Ingénieur Chimiste (ENSCMu)

***INTERACTION DE LA MATIERE ORGANIQUE AVEC
LES MICROPOLLUANTS ANTHROPIQUES ET
DEVENIR LORS DE LA COAGULATION***

Soutenue publiquement le 22 octobre 2004 devant la commission d'examen

Jean-Philippe CROUE	Président	LCEE, Poitiers
Francis ANDREUX Claire RICHARD	Rapporteur Rapporteur	CST-INRA, Dijon LPMM, Aubière
Edith PARLANTI	Examineur	LPTC, Talence
Jean-Luc BERSILLON Céline FROCHOT	Thèse de Thèse	LEM, Vandoeuvre Lès Nancy DCPR, Nancy
Pierre FAURE Bruno LARTIGES Marie-Laure VIRIOT	Invité Invité Invitée	G2R, Vandoeuvre Lès Nancy LEM, Vandoeuvre Lès Nancy DCPR, Nancy



D 136 036910 7

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Francis ANDREUX, Professeur, Université de Bourgogne, Dijon

Madame Claire RICHARD, Directrice de Recherche, Université Blaise Pascal, Aubière

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame JUNG Aude-Valérie

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Intéraction de la matière organique avec des micropolluants anthropiques et devenir
lors de la coagulation"**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Géosciences** »

Fait à Vandoeuvre, le 08 octobre 2004

Le Président de l'I.N.P.L.,

L. SCHUFFENECKER



Pour le Président
Le Vice-Président,

J.-L. COUJARD

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANOEUVRE CEDEX

*« Il n'y a pas de hasard, il n'y a que des forces en marche.
A toi de les créer et le hasard suivra. »*

Saint-Exupéry

REMERCIEMENTS

Je dédie ce travail à mes parents et à toute ma famille qui m'a soutenue pendant toute la durée de cette thèse et sans qui ce travail n'aurait pu être ce qu'il est aujourd'hui.

Je tiens en premier lieu à remercier Monsieur Jacques Yvon, Directeur du LEM, pour son accueil au sein du laboratoire et sa bonne humeur permanente.

Je tiens à remercier Monsieur Jean-Luc Bersillon, Professeur à l'INPL, Directeur scientifique de ce travail, pour ses conseils, la grande liberté de travail qu'il m'a permise tout au long de ma thèse et pour m'avoir en outre transmis son goût du milieu naturel sous toutes ses formes.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien et les conseils de Mademoiselle Céline Frochot, co-directrice de cette thèse, Chargée de Recherche au CNRS et de Monsieur Bruno Lartiges, Maître de Conférences à l'INPL. Je les remercie tous deux pour la constance de leur aide lors de ce travail.

J'adresse des remerciements tous particuliers à Madame Marie-Laure Viriot, Directrice de Recherche au CNRS, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour son aide précieuse et chaleureuse ainsi que sa grande disponibilité.

Je suis reconnaissante à Monsieur Francis Andreux, Professeur à l'Université de Bourgogne au Centre des Sciences de la Terre-INRA de Dijon, et à Madame Claire Richard, Directrice de Recherche au CNRS, et Directrice du Laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire d'Aubière, pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

J'adresse mes remerciements à Madame Edith Parlanti, Chargée de Recherche au Laboratoire de physico-toxicochimie des systèmes naturels de Talence, et à Monsieur Jean-Philippe Croué, Professeur à l'Université de Poitiers, pour avoir jugé cette étude.

Je remercie également Monsieur Pierre Faure, Chargé de Recherche au Laboratoire de Géologie et gestion des Ressources minérales et énergétiques de Vandoeuvre, d'avoir accepté d'être invité à ce jury.

Je remercie vivement Monsieur Jaafar Ghanbaja pour son aide, ses conseils et son soutien indispensables lors des expérimentations de microscopie électronique à transmission.

Je remercie également Monsieur Frédéric Villieras pour son aide pour la réalisation des mesures et des interprétations de tension de surface, ainsi que pour l'ensemble de ses conseils lors de la rédaction.

J'adresse de sincères remerciements à Monsieur Fabien Thomas pour sa contribution dans la réalisation des titrations potentiométriques des acides humiques.

J'adresse de vifs remerciements à Monsieur Claude Selve, Professeur à l'Université Henry Poincaré de Nancy, pour son accueil au sein de son laboratoire et ses conseils avisés, ainsi qu'à Monsieur Stéphane Parant, Assistant Ingénieur au LCPOC, pour son aide précieuse lors des expériences de fluorescence.

Un grand merci à Monsieur Jean-Marie Portal et à Madame Bernadette Gérard pour leur aide précieuse et leurs conseils indispensables lors du démarrage des synthèses des acides humiques.

J'adresse une pensée particulière à toutes les personnes m'ayant aidée lors de mes diverses expérimentations, en particulier Madame Odile Barrès, Ingénieur de Recherche au LEM, Monsieur Abdemoula, Ingénieur de Recherche au LCPME, Madame Filippi, Ingénieur de Recherche au CIRSEE et Monsieur Bruchet, Directeur de Laboratoire du CIRSEE (Groupe Suez-Environnement, Paris) .

Ce travail n'aurait enfin pas été réalisable sans l'aide technique de Monsieur Thierry Jacquin (Agence de l'Eau Rhin-Meuse) et de Monsieur Jean-Claude Woimbée (LEM). Je les remercie vivement pour leur collaboration dans la résolution de mes problèmes mécaniques souvent épineux.

Je salue enfin l'ensemble du personnel du LEM, en particulier Madame Nicole Magnabosco, secrétaire de Direction, pour sa patience lors de mes négociations administratives diverses et variées, Madame Elizabeth Schouller, Madame Tatiana Görner, Madame Edith Bouquet, Madame Solange Madi et Monsieur Philippe Lambert.

Je n'oublie pas l'ensemble de mes collègues de bureau, notamment Maria Lamboule et des étudiants ayant travaillé à mes côtés, en particulier Vincent Chanudet.

Un grand merci à toutes les nombreuses autres personnes m'ayant entourée d'une ambiance de travail chaleureuse tout au long de cette thèse.

RESUME ETENDU¹

Le cadre administratif de l'étude réalisé au Laboratoire Environnement et Minéralurgie (LEM, UMR 7569) de Vandoeuvre Lès Nancy sous la direction du Professeur Jean-Luc Bersillon (ENSG) et du Docteur Céline Frochot (DCPR, ENSIC), est le projet « Zone Atelier Moselle » soutenu par le Contrat Plan Etat-Région Lorraine. Le travail réalisé au LEM vise à mieux connaître les mécanismes d'interaction entre différents types de polluants (pyrène, atrazine, sulcotrione, sulfate dodécyl de sodium, nonylphénoléthoxylé et bromure de cétyltriméthylammonium) et les substances humiques et de leur devenir lors des opérations de traitement de l'eau et s'est organisé en quatre parties expérimentales distinctes :

- Synthèse et caractérisation de composés humiques modèles – comparaison avec des extraits naturels de matières en suspension (*approche multi-techniques*).
- Etude de l'organisation des substances humiques en solution aqueuse à l'échelle moléculaire et macroscopique (*spectrofluorimétrie et tension de surface*).
- Etude des interactions entre la matière organique et les polluants (*techniques analytiques globales et moléculaires*)
- Coagulation de la matière organique (MO) par un sel de fer – spéciation des composés organiques (*techniques associées à la microscopie électronique à transmission*) – étude des mécanismes de coagulation à deux pH de travail et devenir du complexe pyrène/MO (*jar-tests, dosage par spectrofluorimétrie*).

¹Pour les abréviations, se reporter à la liste donnée p.3-6.

1. Synthèse et caractérisation de substances humiques modèles et comparaison aux extraits naturels de matières en suspension (MES)

Des acides humiques de synthèse de différentes tailles moléculaires, obtenus par oxydation de catéchol et de glycine ou de triglycine, ont été caractérisés et comparés à des extraits naturels d'acides humiques associés aux matières en suspension aquatique (rivière Moselle). Le suivi cinétique de leur synthèse, par spectrofluorimétrie et spectroscopie infrarouge, a permis d'appréhender le rôle des différents groupements fonctionnels dans l'organisation structurale finale des macromolécules. La nature des groupements azotés joue un rôle non négligeable dans leur comportement en fluorescence et à l'échelle de l'interface eau/air. En effet, l'incorporation d'atome d'azote favorise la production de fluorophores émettant à grande longueur d'onde. Il a été montré qu'il fallait trois fois moins de temps pour former un assemblage de fluorescence de type humique alpha (*figure A*) pour la synthèse avec le triglycine par comparaison avec la synthèse utilisant la glycine. Les modèles obtenus par oxydation à l'air en milieu légèrement basique de catéchol et de glycine ou triglycine présentent des similitudes intéressantes avec les composés humiques naturels, extraits des matières en suspension prélevées à Richardmémil (réserve d'eau de l'agglomération nancéenne), même s'ils sont beaucoup moins absorbants et émissifs que les composés humiques naturels.

Les résultats de cette étude sont donnés sous forme d'un article soumis à **Organic Geochemistry**.

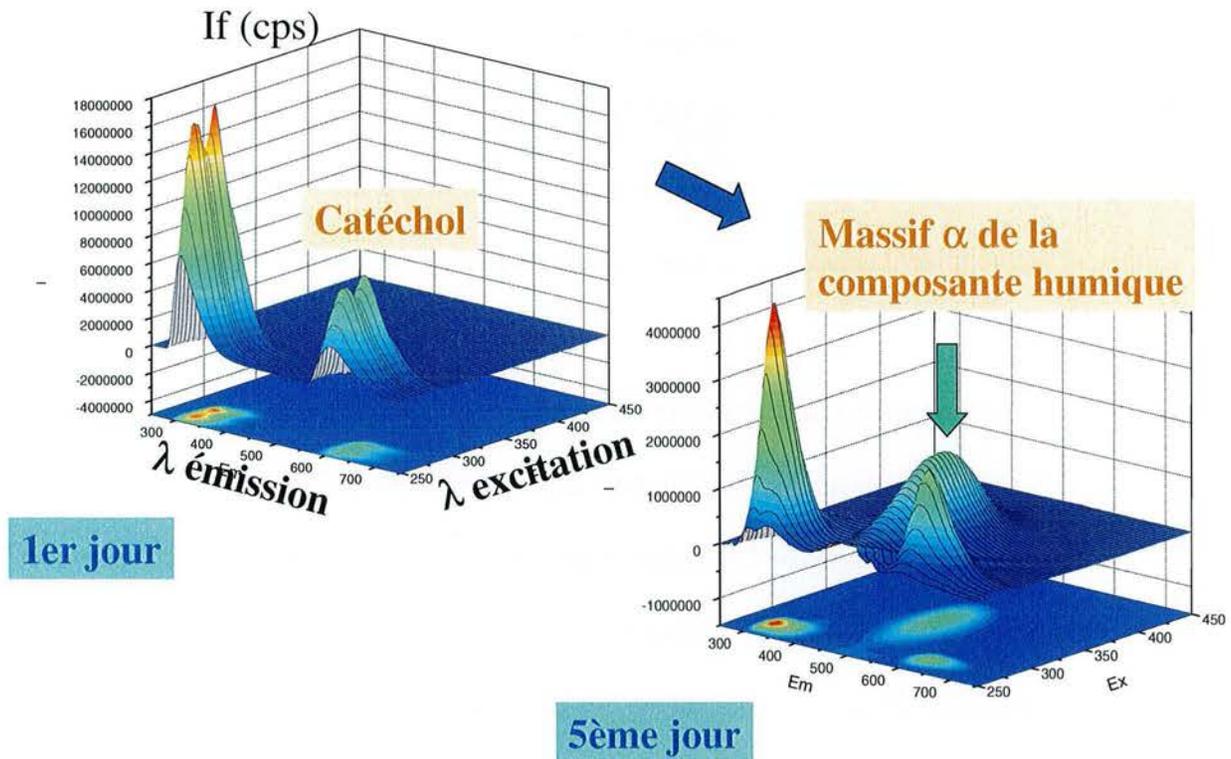


Figure A : formation des espèces fluorescentes de type humique « alpha » détectés par spectrofluorimétrie d'émission/excitation.

2. Etude du comportement des substances humiques à l'échelle moléculaire et à l'échelle de l'interface eau/air.

Pour décrire le comportement des substances humiques, une sonde de fluorescence, le pyrène, a été utilisée dans des solutions de matières organiques naturelles à différents taux de concentration. Le pyrène présente l'avantage d'avoir une fluorescence sensible à la polarité du milieu. L'objectif est d'acquérir des données sur l'organisation des substances humiques en fonction de leur concentration. Les résultats sont présentés sous forme d'un article soumis à **Environmental Science and Technology**. Par une analyse fine des données expérimentales et profitant des caractéristiques d'émission tout à fait singulières du pyrène, trois types de comportement ont pu être définis. A faible concentration de matières organiques, l'extinction de fluorescence serait due à l'établissement de liaisons faibles de type hydrophobes entre le

pyrène et les parties aromatiques des macromolécules humiques favorisant diverses formes de désactivation. Les constantes d'association pyrène-matière organique ont pu être déterminées. A plus forte concentration, le pyrène voit la polarité de son environnement changer du fait de réorganisations moléculaires. Le troisième domaine correspond à un arrangement pseudo-micellaire des molécules humiques, dans laquelle le pyrène ne joue aucun rôle.

3. Etude des interactions entre la matière organique et les micropolluants

Différents représentants de polluants anthropiques ont été choisis afin de déterminer leur capacité d'interaction avec la matière organique. La méthode des ajouts croissants et les outils analytiques utilisés sont la spectroscopie UV/Visible, la fluorimétrie et des mesures de pH, conductivité et turbidité des mélanges. Les herbicides atrazine et sulcotrione, ainsi que les tensio-actifs de type Nonyl-Phénols Ethoxylés (NPE) ne présentent pas d'interaction quantifiables par fluorescence avec les molécules organiques. En présence du polluant « pyrène » (Hydroxy Aromatique Polycyclique, HAP), les macromolécules semblent interagir de façon essentiellement photophysique avec la matière organique, notamment grâce à ses caractéristiques moléculaire hydrophobe en solution. Les molécules de tensio-actifs Sulfate Dodécyl de Sodium (SDS) et Bromure de Cétyl Triméthyl Ammonium (CTAB) présentent des interactions avec la matière organique pouvant être suivies en fluorescence et par des mesures de tension de surface à l'interface air/solution. L'interaction avec le CTAB est essentiellement ionique. L'étude avec le SDS a particulièrement retenue l'attention : l'interaction avec les molécules organiques semble essentiellement stérique, tendant à justifier l'abaissement de la tension de surface du tensio-actif lors de l'ajout de composés organiques, avec comme conséquence, dans certains cas, une meilleure exposition des groupements fluorescents des macromolécules humiques.

La détermination des constantes d'association (analyse de Stern-Volmer par fluorescence) entre la matière organique et les polluants pyrène et CTAB (*Tableau 1*), nous a permis de mettre en évidence une très bonne corrélation avec le degré d'hydrophobie (déterminé par chromatographie liquide dans la première partie de l'étude) et d'aromaticité (analyse élémentaire, H/C) propre à chaque fraction. Les constantes obtenues avec le tensio-actif CTAB sont d'un ordre de 2 à 3 fois supérieur à celle déterminée avec le pyrène. Plusieurs forces d'interaction sont donc en présence : elles semblent être de nature essentiellement hydrophobes dans le cas du pyrène, et ioniques dans le cas du CTAB. Enfin, la détermination de concentration optimale de complexation (COCx) par la méthode de mesure des rendements quantiques de fluorescence des matières organiques, montre une corrélation entre la constante d'association et cette concentration optimale ramenée à la CMC. En effet, plus l'interaction est forte avec la fraction considérée, plus la concentration en tensio-actif à ajouter au milieu pour avoir un système photophysique stable (*i.e.*, rendement quantique constant) est faible.

Fraction de MO	K_{SV} Pyrène	K_{SV} CTAB	COCx/CMC _{CTAB}	$I_{hydrophobie}$	$I_{aromaticité}$
AHCG > 8 kDa	5,5 10 ⁴	1,1 10 ⁵	0,3 (α)	84,5	0,56
AHCT 1-3,5 kDa	1,5 10 ⁴	2,0 10 ⁴	0,8 (α)	76,6	1,38
AHCT > 8 kDa	4,5 10 ⁴	5,0 10 ⁴	0,7 (α)	82,8	0,78
AHN1	0,5 10 ⁴	1,2 10 ⁵	0,4 (α)	51,1	1,87
AHN2	0,3 10 ⁴	1,2 10 ⁵	1,0 (α) - 0,3 (α')	52,2	1,61

Tableau 1 : récapitulatif quantitatif des interactions entre la matière organique, le pyrène et le CTAB.

4. Coagulation de la matière organique par les ions ferriques hydrolysés - application à l'étude de l'élimination du pyrène.

Le mécanisme de coagulation des molécules organiques synthétiques par le nitrate ferrique a été comparé avec celui de la matière organique naturelle par des techniques de microscopie électronique à transmission (MET). Un mécanisme similaire d'élimination a été établi de façon systématique entre les acides humiques synthétiques (catéchol/glycine) et une fraction de la matière organique naturelles des eaux de rivière, par la spectroscopie de perte d'énergie au seuils K du carbone et L du fer respectivement (CEELS et FeEELS). Pour les différentes catégories de matière organique, la morphologie des agrégats organo-minéraux obtenus et les variations de la stœchiométrie N/C, Fe/C, Na/C et Ca/C sont comparées. Le recours aux substances humiques synthétiques a permis de vérifier que la demande en agent coagulant augmente avec la concentration en carboxyles fortement dissociés. La nature chimique des matières organiques naturelles est donc prépondérante pour l'efficacité de la coagulation, le pH ayant également un rôle déterminant. Des mécanismes d'échange ioniques Ca/Na/Fe couplés à d'éventuels phénomènes de sorption (aux pH plus élevés) ont été proposés pour décrire les résultats obtenus (*figure B*). Ces résultats ont fait l'objet d'un article préliminaire, soumis au journal **Water Research**.

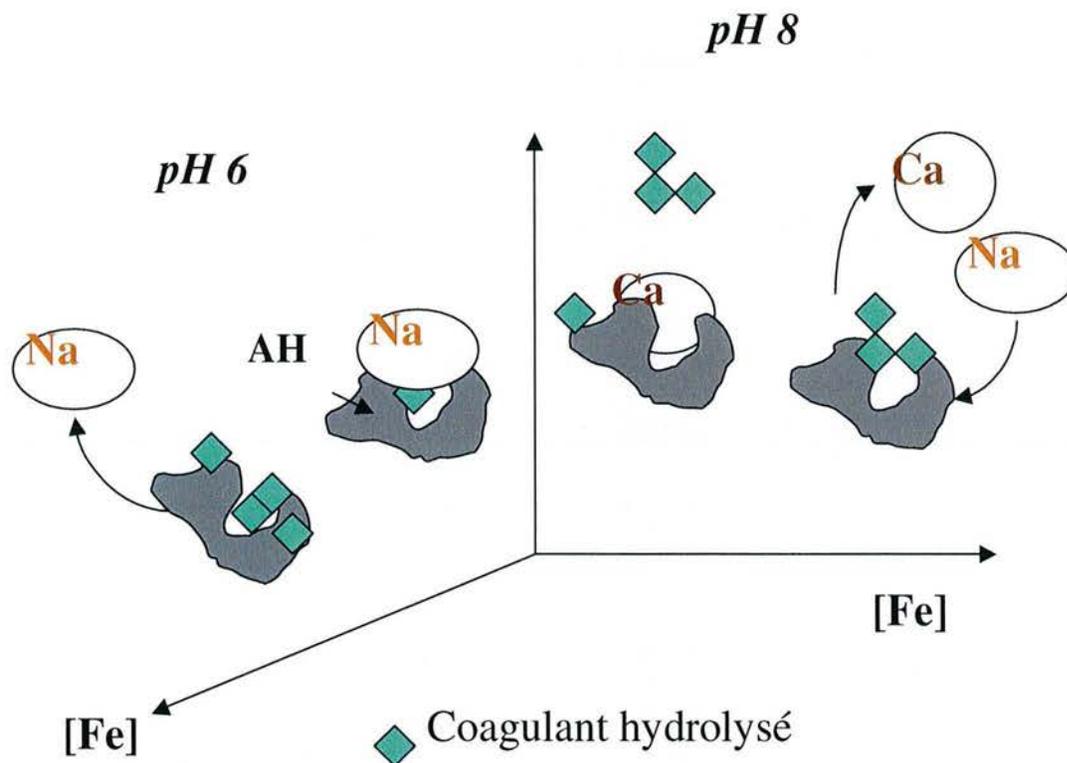


Figure B: récapitulatif des mécanismes de coagulation envisagés aux 2 pH de travail.

Le statut des espèces de fer hydrolysées a été étudié par deux méthodes spectroscopiques : la perte d'énergie au seuil L_3 du fer, ainsi que par spectroscopie Mössbauer. En fonction de l'ajout croissant en coagulant, chaque type de matière organique possède une évolution spécifique, avec cependant d'avantage de corrélations entre les matières organiques naturelles des eaux de rivière (non extraites) et les substances synthétiques, qu'entre ces deux catégories et les substances naturelles. Les spectres Mössbauer sont peu modifiés par la concentration en coagulant. En revanche, le couplage des deux méthodes apparaît prometteur pour l'identification de tels complexes. Ces résultats ont donné lieu à un l'écriture d'un article soumis aux **Compte-Rendus de l'Académie des Sciences de Chimie**.

L'élimination du pyrène lors de la coagulation a été étudié sur toutes les substances synthétiques et naturelles, ainsi que sur deux échantillons d'eau de Moselle. Les variations des rapports de fluorescence ont été déterminées parallèlement à celles de la turbidité, après chaque ajout d'agent coagulant. Les substances humiques ont sensiblement toutes les même comportement. Si l'élimination du pyrène est parfois presque total, son optimum coïncide rarement avec celui de la matière organique (*Tableau 2*). Un résultat capital est que cette élimination n'est pas le fait exclusif du caractère hydrophobe des substances humiques, en supposant que les interactions hydrophobes soient conservées, lorsque les substances humiques s'insolubilisent par neutralisation des charges. Dans tous les cas, il semble exister un stade optimal de piégeage du pyrène dans les habitats hydrophobes des substances humiques, favorisé par le traitement coagulant, suivi d'un stade de relargage en cas de surtraitement.

	COC (M)	Indice hydrophobie	Pyrène éliminé Avant - à la COC - après (%)	K_{sv} (mL.g ⁻¹)
AHCG	$9,5 \cdot 10^{-4}$	84,5	97- 96- 93	$4,5 \cdot 10^4$
AHCT1	$1,2 \cdot 10^{-3}$	76,6	80- 60- 55	$1,5 \cdot 10^4$
AHCT2	$4,0 \cdot 10^{-4}$	82,8	87- 75- 65	$5,5 \cdot 10^4$
AHN1	$3,0 \cdot 10^{-4}$	51,1	90- 91- 92	$0,8 \cdot 10^4$
AHN2	$5,0 \cdot 10^{-4}$	52,2	55- 90- 95	$0,5 \cdot 10^4$

Tableau 2 : récapitulatif quantitatif de l'élimination du pyrène lors de la coagulation par le nitrate ferrique des différentes fractions humiques.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	p.1
LISTE DES ABREVIATIONS.....	p.3

Chapitre I : La matière organique naturelle (MON)

Ses interactions avec les polluants et sa coagulation avec les sels de fer lors du traitement de l'eau dans le cadre de la Zone Atelier Moselle (ZAM)..... p.7

I.1. Objectifs de l'étude dans le cadre de la ZAM.....p.9

I.2. La matière organique naturelle des eaux de surface.....p.13

I.2.1. Généralités et origine.....	p.13
I.2.1.1. Origine naturelles des matières organiques.....	p.13
a) Matières organiques autochtones.....	p.14
b) Matières organiques allochtones.....	p.15
I.2.1.2. Origine anthropiques des matières organiques.....	p.16
a) Eaux résiduaires urbaines	p.17
b) Eaux résiduaires industrielles.....	p.18
c) Agriculture.....	p.18
d) Apports induits.....	p.19
e) Conclusion sur l'origine des matières organiques.....	p.19
I.2.2. Nature de la matière organique.....	p.19
I.2.3. Les substances humiques	p.23
I.2.3.1. Origine et formation.....	p.23
a) Théorie de la lignine.....	p.23
b) Théorie des polyphénols.....	p.24
c) Réaction de Maillard.....	p.25
d) Conclusion sur l'humification.....	p.25
I.2.3.2. Caractérisations et classifications des substances humiques.....	p.26
I.2.3.3. Modèles structuraux proposés pour les substances humiques.....	p.31
a) Structure micellaire selon Wershaw.....	p.31
b) Structures 2D et 3D selon Schulten et Schnitzer.....	p.32
c) Structure en hélice selon Sein.....	p.33
d) Structure supramoléculaire selon Piccolo et al.	p.34

I.3. La matière organique et ses interactions avec les micropolluants anthropiques...p.35

I.3.1. Revue bibliographique des méthodes de caractérisation des interactions de la matière organique dissoute, colloïdale et particulaire du milieu avec les micropolluants.....	p.37
I.3.2. Revue bibliographique des méthodes de fluorescence d'intérêt pour la caractérisation de la matière organique dissoute, l'organisation macromoléculaire en solution et la mise en évidence des interactions avec les micropolluants anthropiques en solution aqueuse.....	p.41

1.3.2.1.	<i>Caractérisation des molécules organiques naturelles.....</i>	p.42
a)	<i>Caractérisation des spectres de fluorescence et corrélations avec la chimie moléculaire.....</i>	p.42
b)	<i>Distinction de différentes fractions de substances humiques : indices d'humification et d'hydrophobie.....</i>	p.45
c)	<i>Que peut-on attendre de la fluorescence en milieu naturel ?.....</i>	p.47
	Provenance d'eaux de différentes sources.....	p.48
	Suivi du mélange des eaux.....	p.48
	Corrélations envisageables.....	p.49
	Teneurs en sels.....	p.49
	Carbone Organique Dissous	p.49
	Carbone Organique Total.....	p.52
	Demande Biologique en Oxygène sur 5 jours (DBO ₅).....	p.52
	Détection <i>in situ</i> des polluants fluorescents et applications industrielles.....	p.53
1.3.2.2.	<i>Etude des systèmes micellaires ou pseudo-micellaires : recherche d'organisations moléculaires en solution :</i>	p.53
a)	<i>Utilisation de sondes de polarité.....</i>	p.53
	Systèmes polymères « chimiquement bien contrôlés ».....	p.53
	Intérêt de l'utilisation de sondes fluorescentes pour l'étude de la MON.....	p.54
b)	<i>Détermination des nombres d'agrégation.....</i>	p.54
c)	<i>Etude de « microviscosité ».....</i>	p.55
d)	<i>Tailles, formes et structures des micelles.....</i>	p.55
1.3.2.3.	<i>Interactions MO-polluants.....</i>	p.55
a)	<i>Inhibition de fluorescence (analyse de Stern-Volmer).....</i>	p.56
b)	<i>Excitation-émission synchrone.....</i>	p.57
	Pesticides-herbicides.....	p.57
	Autres polluants.....	p.58
c)	<i>Anisotropie de fluorescence.....</i>	p.58
d)	<i>Fluorescence photo-induite.....</i>	p.58
e)	<i>Spectroscopie de fluorescence résolue dans le temps, induite par excitation laser</i>	
f)	<i>Travaux les plus récents</i>	p.59

I.4. La coagulation de la MON.....

I.4.1.	La coagulation par les sels métalliques.....	p.61
I.4.1.1.	<i>Hydrolyse des sels de fer.....</i>	p.62
I.4.1.2.	<i>Les théories de la coagulation de la MON.....</i>	p.66
I.4.1.3.	<i>Influence des paramètres « externes » sur la coagulation de la MON</i>	
a)	<i>Les doses de coagulant.....</i>	p.67
b)	<i>Le pH.....</i>	p.68
c)	<i>Les ions inorganiques.....</i>	p.68
I.4.2.	Interaction MON-espèces coagulantes.....	p.69
I.4.2.1.	<i>Influence des caractéristiques intrinsèques de la MON sur sa coagulation / spéciation de la matière organique lors de son élimination (statut du carbone).....</i>	p.69
I.4.2.2.	<i>Hydrolyse du coagulant en présence de MO..... (statut du fer)...</i>	p.72
I.4.3.	Récapitulatif du comportement de la MON pendant sa coagulation...	p.77

Chapitre II : Méthodes expérimentales et matériaux d'étude.....p.81

II.1. Méthodes d'analyse.....	p.83
II.1.1 Méthodes associées aux mises en évidence des interactions MO/polluants	
II.1.1.1. <i>La spectrofluorimétrie : principe, appareillage, quenching, mode synchrone, mode matriciel et précautions analytiques.....</i>	<i>p.83</i>
a) <i>Le phénomène de fluorescence moléculaire.....</i>	<i>p.83</i>
b) <i>L'appareillage.....</i>	<i>p.83</i>
c) <i>L'inhibition de fluorescence (ou quenching).....</i>	<i>p.86</i>
- <i>Théorie générale et description de la méthode dans le cadre de notre étude</i>	
- <i>Préparation des solutions.....</i>	<i>p.90</i>
d) <i>L'excitation-émission synchrone (ou méthode à pas constant).....</i>	<i>p.92</i>
e) <i>L'excitation-émission matricielle (EEM).....</i>	<i>p.93</i>
f) <i>Précautions analytiques.....</i>	<i>p.93</i>
- <i>Dérive de l'appareillage dans le temps.....</i>	<i>p.93</i>
- <i>Autres paramètres à contrôler pour les mesures de fluorescence des molécules humiques seules en solution et en présence de pyrène... ..</i>	<i>p.93</i>
II.1.1.2. <i>Les mesures de tension de surface à l'interface eau/air</i>	<i>p.102</i>
II.1.2. Méthodes associées à la traitabilité de la MO.....	p.107
II.1.2.1. <i>Préparation des suspensions à traiter par coagulation.....</i>	<i>p.107</i>
II.1.2.2. <i>Description des essais de coagulation : les jar-tests.....</i>	<i>p.108</i>
II.1.2.3. <i>Les mesures directes effectuées dans les surnageants.....</i>	<i>p.110</i>
a) <i>pH et conductivité.....</i>	<i>p.110</i>
b) <i>Turbidité.....</i>	<i>p.110</i>
II.1.2.4. <i>Les analyses réalisées dans les sédiments : les spectroscopies de perte d'énergie (Electron Energy Loss Spectroscopy, EELS) et de dispersion en énergie X (Electron Dispersion X-Ray Spectroscopy, EDXS).....</i>	<i>p.112</i>
a) <i>Rappels sur l'interactions électrons-matière.....</i>	<i>p.112</i>
b) <i>Principe général de la spectroscopie EELS.....</i>	<i>p.113</i>
c) <i>Montage expérimental EELS.....</i>	<i>p.113</i>
- <i>Appareillage.....</i>	<i>p.116</i>
- <i>Résolution.....</i>	<i>p.117</i>
d) <i>Principales limitations de l'EELS : détection et épaisseur des échantillons</i>	<i>p.118</i>
e) <i>Informations spectrales EELS.....</i>	<i>p.120</i>
f) <i>Analyse quantitative en EELS.....</i>	<i>p.122</i>
g) <i>Traitement des spectres EELS.....</i>	<i>p.124</i>
h) <i>Détection du signal en EDXS.....</i>	<i>p.124</i>
i) <i>Analyse quantitative en EDXS.....</i>	<i>p.124</i>
j) <i>Préparation des échantillons pour les analyses EELS et EDXS.....</i>	<i>p.125</i>
II.2. Matériaux	p.126
II.2.1. L'eau de la rivière Moselle	p.126
II.2.1.1. <i>Le bassin amont de la Moselle : les pôles de pollution potentiels.....</i>	<i>p.126</i>
II.2.1.2. <i>Les stations de l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse (AERM).....</i>	<i>p.127</i>
II.2.1.3. <i>La réserve de Richardménil.....</i>	<i>p.128</i>
II.2.1.4. <i>Représentativité de l'échantillonnage.....</i>	<i>p.130</i>
II.2.2. Les substances humiques naturelles	p.134
II.2.2.1. <i>Dispositif de prélèvement des matières en suspension (MES) et des échantillons d'eau.....</i>	<i>p.134</i>

a) <i>MES</i>	p.134
b) <i>Echantillons d'eau de rivière</i>	p.135
II.2.2.2. <i>Extraction des substances humiques naturels à partir des matières en Suspension</i>	p.136

II.2.3. Substances humiques synthétiques :

ARTICLE I.....p.141

Synthesis of amino-phenolic humic-like substances and comparison with natural river-extracted humic acids: a multi-analytical techniques approach

JUNG A.-V., FROCHOT C., PARANT S., LARTIGES B.S., SELVE C., VIRIOT M.-L., BERSILLON J.-L.

II.2.4. Choix et propriétés des polluants xénobiotiques	p.179
II.2.4.1. <i>Le pyrène, représentant des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques</i>	
a) <i>Propriétés physico-chimiques, biodégradabilité et toxicité</i>	p.180
b) <i>Origine et pertinence d'utilisation dans le cadre de notre étude</i>	p.180
c) <i>Préparation des solutions</i>	p.181
II.2.4.2. <i>Le Dodécyl Sulfate de Sodium (SDS), le Bromure de Cétyl Triméthyl Ammonium (CTAB), le Nonyl Phénol Ethoxylé (NPE) : trois représentants de classes distinctes de tensio-actifs</i>	p.181
a) <i>Le SDS</i>	p.183
- <i>Biodégradabilité et toxicité</i>	p.183
- <i>Origine et pertinence d'utilisation dans le cadre de notre étude</i> ...	p.183
- <i>Préparation des solutions</i>	p.184
b) <i>Le NPE</i>	p.184
- <i>Biodégradabilité et toxicité</i>	p.185
- <i>Origine et pertinence d'utilisation dans le cadre de notre étude</i> ...	p.185
- <i>Préparation des solutions</i>	p.186
c) <i>Le CTAB</i>	p.186
- <i>Biodégradabilité et toxicité</i>	p.186
- <i>Origine et pertinence d'utilisation dans le cadre de notre étude</i>	p.186
- <i>Préparation des solutions</i>	p.187
II.2.4.3. <i>L'atrazine et la sulcotrione, deux molécules d'herbicides appartenant respectivement au passé et au futur de l'agrochimie</i>	p.187
a) <i>Propriétés physico-chimiques, biodégradabilité et toxicité</i>	p.188
b) <i>Origine et pertinence d'utilisation dans le cadre de notre étude</i>	p.189
c) <i>Préparation des solutions</i>	p.189

Chapitre III : Comportement des substances humiques en solution aqueuse

.....	p.193
III.1. Utilisation des sondes de polarité et de viscosité pour l'étude de systèmes macromoléculaires organisés.....	p.195
III.1.1. Description physico-chimique et photophysique des sondes.....	p.196
III.1.1.1. <i>Le pyrène</i>	p.196
III.1.1.2. <i>Les rotors moléculaires</i>	p.197
a) Rotor 2-CN.....	p.200
b) Rotor coumarine CNCOOEt.....	p.201
c) Sonde D 7760.....	p.202
d) Rotor CouC12.....	p.206
III.1.2. Préparation des solutions d'acide humique en présence des sondes de fluorescence.....	p.211
III.1.2.1. <i>Préparation des solutions contenant du pyrène</i>	p.211
III.1.2.2. <i>Préparation des solutions avec les rotors moléculaires</i>	p.211
III.2. ARTICLE II.....	p.212

Interaction of pyrene fluoroprobe with natural and synthetical humic substances : evidence for local molecular structure organisation and photophysical processes

JUNG A.-V., FROCHOT C., VILLIERAS F., LARTIGES B., PARANT S.,
VIRIOT M.L., SELVE C., BERSILLON J.-L.

CONCLUSION SUR L'ETUDE DES SUBSTANCES HUMIQUES PAR DES SONDES DE POLARITE ET/OU VISCOSITE.....	p.232
--	-------

Chapitre IV : Interactions des micropolluants avec la matière organique

.....	p.235
IV.1. Interaction MO/pyrène.....	p.239
IV.1.1. Etude préalable du polluant « pyrène ».....	p.239
IV.1.2. Etudes des solutions « MO + pyrène ».....	p. 240
IV.1.2.1. <i>UV/Visible</i>	p.240
IV.1.2.2. <i>Inhibition de fluorescence</i>	p.240
IV.2. Interaction MO/atrazine et sulcotrione.....	p.241
IV.2.1. Etude préalable des polluants « atrazine » et « sulcotrione ».....	p.241
IV.2.1.1. <i>UV/Visible</i>	p.241
IV.2.1.2. <i>Fluorescence</i>	p.241
IV.2.2. Etudes des solutions « MO + atrazine » et « MO + sulcotrione »... ..	p.242
IV.2.2.1. <i>UV/Visible</i>	p.242
IV.2.2.2. <i>Inhibition de fluorescence</i>	p.243
IV.3. Interaction MO/NPE.....	p.244
IV.3.1. Etude préalable du polluant « NPE ».....	p.244
IV.3.1.1. <i>UV/Visible</i>	p.244

IV.3.1.2. <i>Fluorescence</i>	p.244
IV.3.2. Etudes des solutions « MO + NPE ».....	p.245
IV.3.2.1. <i>UV/Visible</i>	p.245
IV.3.2.2. <i>Inhibition de fluorescence</i>	p.246
IV.3.2.3. <i>Tensions de surface</i>	p.247
IV.4. Interaction MO/SDS	p.248
IV.4.1. Etude préalable du polluant « SDS ».....	p.248
IV.4.1.1. <i>UV/Visible</i>	p.248
IV.4.1.2. <i>Fluorescence</i>	p.248
IV.4.2. Etudes des solutions « MO + SDS ».....	p.248
IV.4.2.1. <i>UV/Visible</i>	p.249
IV.4.2.2. <i>Inhibition de fluorescence</i>	p.250
IV.4.2.3. <i>Rendements quantiques de fluorescence</i>	p.251
IV.4.2.4. <i>Conductivité</i>	p.256
IV.4.2.5. <i>Tensions de surface</i>	p.257
IV.5. Interaction MO/CTAB	p.261
IV.5.1. Etude préalable du polluant « CTAB ».....	p.261
IV.5.1.1. <i>UV/Visible</i>	p.261
IV.5.1.2. <i>Fluorescence</i>	p.261
IV.5.2. Etudes des solutions « MO + CTAB ».....	p.261
IV.5.2.1. <i>UV/Visible</i>	p.261
IV.5.2.2. <i>Inhibition de fluorescence</i>	p.264
IV.5.2.3. <i>Rendements quantiques de fluorescence</i>	p.271
IV.5.2.4. <i>Conductivité</i>	p.273
IV.5.2.5. <i>Turbidité</i>	p.274
IV.5.2.6. <i>pH</i>	p.275
IV.5.2.7. <i>Tensions de surface</i>	p.275
IV.6. Bilans des études d'interactions matière organique/polluants et interprétations des résultats	p.278
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DES ETUDES DES INTERACTIONS MATIERE ORGANIQUE / POLLUANTS	p.289

Chapitre V : La coagulation de la MO naturelle et synthétique par le nitrate ferrique, investigation par les techniques de MET..... p.293

V.1. ARTICLE III..... p.295

Coagulation of Organic Matter by a Nitrate Salt : a CEELS investigation

JUNG A.-V., CHANUDET V., GHANBAJA J., LARTIGES B., BERSILLON J.-L.

V.2. ARTICLE IV..... p.323

Iron sites populations evolution during organic matter coagulation by iron nitrate : a spectroscopic investigation by electron energy-loss and Mössbauer deconvolution analysis

JUNG A.-V., CHANUDET V., GHANBAJA J., LARTIGES B., ABDEMOULA M., BERSILLON J.-L.

V.3. Elimination d'un polluant type, le pyrène, lors de la coagulation de la matière organique..... p.346

- V.3.1. Mise au point du dosage du pyrène par fluorescence..... p.346
- V.3.2. Résultats des essais de coagulation avec les acides humiques..... p.349
 - V.3.2.1. *Coagulation de l'AHCG en présence de pyrène..... p.350*
 - V.3.2.2. *Coagulation de l'AHCT2 en présence de pyrène..... p.352*
 - V.3.2.3. *Coagulation de l'AHCT1 en présence de pyrène..... p.354*
 - V.3.2.4. *Coagulation de l'AHN1 en présence de pyrène..... p.356*
 - V.3.2.5. *Coagulation de l'AHN2 en présence de pyrène..... p.357*
 - V.3.2.6. *Coagulation de l'Eau Brute ER1 en présence de pyrène..... p.359*
 - V.3.2.7. *Coagulation de l'Eau Brute ER2 en présence de pyrène... .. p.360*
- V.3.3. Bilans..... p.362

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE L'ELIMINATION DU PYRENE LORS DE LA COAGULATION DE LA MATIERE ORGANIQUE..... p.368

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	p.371
ANNEXES.....	
ANNEXE 1... Les contributions de la ZAM, liste des laboratoires et des directeurs de recherche.....	p.372
ANNEXE 2...La Sécheresse de l'été 2003.....	p.375
ANNEXE 3...Dispositif de prélèvements des MES	p.376
ANNEXE 4...Autres techniques analytiques.....	p.377
LISTE DES FIGURES.....	..p.393
LISTE DES TABLEAUX.....	p.403
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	p.405

Introduction

Cette étude s'inscrit dans le cadre du projet Zone Atelier Moselle qui s'attelle à sécuriser l'approvisionnement en eau du Bassin Mosellan. Réalisé en collaboration avec seize équipes lorraines de recherche (CEGUM, CRF-INRA, CRPG, G2R, EBSE, IDEDE, ILGU, LAEGO, LCPME-LSE, LHRSP, LEM, LTAC, LSE-INRA, SERES, SRSMC, SSAD-INRA), ce projet porte sur l'étendue actuelle des connaissances sur la nature, le transport et la biodégradation des matières organiques naturelles et xénobiotiques.

De grandes quantités de matières organiques dans l'eau peuvent entraîner des perturbations de l'équilibre écologique d'un bassin hydrologique tel celui de la Moselle. Elles interviennent en tant que polluants principalement à deux niveaux différents. Outre la toxicité apportée directement par certaines substances spécifiques (pesticides, herbicides, composés aromatiques polycycliques, etc.), la dégradation des matières organiques entraîne la désoxygénation du milieu aquatique ainsi que la libération des micropolluants associés. Il a en effet été très largement établi que l'ensemble des matières organiques (dissoutes, colloïdales ou particulières) avaient de fortes capacités de complexation pour les espèces du milieu, et en particulier les polluants. La compréhension des mécanismes mis en jeu lors du transport des micropolluants, la chimie des colloïdes, les interactions eau/sédiments est indispensable pour mettre au point une typologie des matières organiques aquatiques. Outre une meilleure connaissance des milieux aquatiques, une telle approche permet de mieux gérer les ressources en eau et d'augmenter les performances des traitements de l'eau.

Parmi l'ensemble des molécules naturelles du milieu aquatique, il existe une famille de composants majoritaire du milieu, considérée comme un des véhicules potentiels de transport ou d'immobilisation de micropolluants et autres produits phytosanitaires (toxiques ou non par bioamplification) avec risque de désorption lors de modifications physico-chimiques du milieu : les substances humiques. Notre étude s'est principalement axée sur cette famille de molécules aux propriétés physico-chimiques hétérogènes et polydisperses, encore aujourd'hui mal définies.

Parmi les substances organiques d'origine anthropique présentes dans les eaux naturelles, les composés xénobiotiques sont à considérer avec attention. Ethymologiquement, le terme xénobiotique signifie « étranger au monde vivant ». Ces composés organiques synthétiques n'ont donc pas d'équivalents naturels dans l'environnement ou chez les êtres

vivants en dehors de l'activité humaine et sont de ce fait difficilement biodégradables. Leur longévité peut entraîner leur bioaccumulation (concentration dans des organismes vivants). Certains xénobiotiques sont toxiques impliquant des altérations du métabolisme des organismes-cibles concernés, même à de très faibles concentrations. Leur effet peut être local et intense, avec disparition immédiate de la faune, ou plus dispersé et endémique. Nous devons garder à l'esprit que la demi-vie des xénobiotiques dans l'environnement se chiffre en semaines, parfois en années. Par ailleurs, le type et la vitesse de transfert que subit la matière organique (et donc par voie de conséquence les polluants) dépendent de son origine, de sa nature, de paramètres environnementaux, naturels ou perturbés par des activités anthropiques mais spécifiques à un système aquatique donné.

Notre étude a pris son origine dans les interrogations suivantes : pouvons-nous faciliter la caractérisation de substances humiques naturelles grâce à la synthèse de molécules « modèles » ? Quel est le comportement des substances humiques en solution, à savoir quelles sont les modifications de conformations éventuelles de ces macromolécules pouvant donner un éclairage sur leur capacité de transport et de piégeage des polluants ? Quels sont les polluants susceptibles d'interagir avec ces substances ? Comment aborder au laboratoire, par une approche modélisée, les processus d'interaction avec les polluants retenus ? Et enfin, comment se comportent les complexes formés entre la matière organique naturelle et les polluants lors des opérations de traitement de l'eau ?

Afin de tenter de répondre à ces questions, nous avons adopté la démarche suivante. Dans un premier temps, une caractérisation analytique a été réalisée en parallèle sur des extraits de substances humiques naturelles de la Moselle et des composés modèles synthétisés au laboratoire à partir des réactifs catéchol, glycine et triglycine. Cette étude est détaillée au Chapitre II. L'utilisation de sondes de fluorescence (Chapitre III) a essayé de répondre à la question du comportement des acides humiques en solution. La mise en évidence d'interaction avec plusieurs familles de polluants types est présentée au Chapitre IV. Enfin, le dernier Chapitre (V) donne d'une part, un aperçu des mécanismes intervenant lors du traitement par coagulation de la matière organique naturelle seule, et d'autre part, pour l'eau artificiellement polluée avec le polluant « pyrène ».

Abréviations françaises et anglaises

A

- AERM : Agence de l'Eau Rhin-Meuse
- AF : Acide fulvique
- AH : Acide Humique
 - AHCG : Acide Humique Catéchol/Glycine ($M_w > 8$ kDa)
 - AHCT : Acide Humique Catéchol/Triglycine
 - AHCT1 : Acide Humique Catéchol/Triglycine ($M_w = 1- 3,5$ kDa)
 - AHCT2 : Acide Humique Catéchol/Triglycine ($M_w > 8$ kDa)
 - AHN : Acide Humique Naturel
 - AHN1 : Acide Humique Naturel 1^{er} prélèvement (juillet 2003)
 - AHN2 : Acide Humique Naturel 2^{ème} prélèvement (octobre 2003)
- AP : AlkylPhénol

B

- BTOH : *1-HydroxybenzoTriazole Hydrate*
- BTX : Benzène, Toluène, Xylène

C

- CEE : Communauté Economique Européenne
- CEGUM : Centre d'Etudes Géographiques de l'Université de Metz
- CESH : Chromatographie d'Exclusion Stérique Haute Performance
- CGHA : *Catechol Glycine Humic Acid ($M_w > 8$ kDa)*
- CRF : Centre de Recherche Forestières
- CTHA : *Catechol Triglycine Humic Acid*
 - CTHA1 : *Catechol Triglycine Humic Acid ($M_w = 1- 3,5$ kDa)*
 - CTHA2 : *Catechol Triglycine Humic Acid ($M_w > 8$ kDa)*
- CLHP : Chromatographie liquide haute performance
- CO : Carbone Organique
 - COCol : Carbone Organique Colloïdal
 - COD (DOC) : Carbone Organique Dissout
 - COP : Carbone Organique Particulaire
 - COT (TOC) : Carbone Organique Total
- COC : Concentration Optimale de Coagulation
- COC_x : Concentration Optimale de Complexation
- CPER : Contrat de Plan Etat Région
- Cps (Cps) : Coups Par Seconde (*Counts Per Second*)
- CRPG : Centre de Recherches Pétrographiques et Géochimiques
- CTAB : *CetylTrimethylAmmonium Bromure*
- CTAC : *CetylTrimethylAmmonium Chlorure*

D

- 2,4-D : acide 2,4-Dichlorophenoxyacétique
- Da : Dalton
- DAC : *DodecyltrimethylAmmonium*
- DAX : *Diffusion X aux Petits Angles*
- DBO₅ : Demande Biochimique en Oxygène sur 5 jours
- DCCI : *1,3-DiCyclohexylCarboImide*
- DCO : Demande Chimique en Oxygène
- DCPR : Département de Chimie-Physique des Réactions
- DDD : DichloroDiphénylDiméthyléthane
- DDE : DichloroDiphényléthane
- DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane
- DeTAB : *DecylTriméthylAmmonium Bromure*
- DMAC : *DodecylMethylAmmonium Chlorure*
- DIREN : Direction Régionale de l'Environnement
- DMF : *DiMethylFurane*
- DO : Densité Optique
- DRX : Diffraction des Rayons X

E

- EDTA : *EthyleneDiamineTetrAcetic*
- EDXS : *Energy Dispersion X-Ray Spectroscopy*
- EBSE : Ecotoxicité, Biodiversité et Santé Environnementale
- EEM : Excitation-Emission Matricielle
- ENSIC : Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques
- EPS : Extraction sur Phase Solide
- ER1 : Eau de Rivière du 1^{er} prélèvement (juillet 2003)
- ER2 : Eau de Rivière du 2^{ème} prélèvement (octobre 2003)
- EELS : *Electron Energy Loss Spectroscopy*
- ESI-MS : *Electrospray Ionisation Mass Spectroscopy*
- EXAFS : *Extended X-Ray Absorption Fine Structure*
- EXELFS : *Extended X-Ray Energy Loss Fine Structure*

G

- G2R : Géologie et Gestion des Ressources Minérales et Energétiques

H

- H : Humine
- HA : *Humic Acid*
- HAP (HPA) : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
- HCH : HexaChlorocycloHexane
- HI : *Humification Indice*
- HPSEC : *High Performance Size Exclusion Chromatography*

I

- *ICP* : *Inductively Coupled Plasma*
- *IDEDE* : Institut de Droit et Economie des Dynamiques en Europe
- *ILGU* : Institut Lorrain de Génie Urbain
- *IHSS* : *International Humic Substances Society*
- *IR et IRTF (IR and FTIR)* : Infra-Rouge et Infra-Rouge à Transformée de Fourier
- *IRH* : Institut de Recherches Hydrologiques

L

- *LAEGO* : Laboratoire Environnement-Géomécanique et Ouvrages
- *LaS* : *Lauryl Sulfate*
- *AEL* : Alcool Ethoxylé Linéaires
- *ASL* : Alkylbenzène Sulfonates Linéaires
- *LCPME-LSE* : Laboratoire de Chimie-Physique et de Microbiologie pour l'Environnement- Laboratoire de Santé Environnementale
- *LIMOS* : Laboratoire des Interactions Microorganismes- Minéraux- Matières organiques dans les sols
- *LES-INRA* : Laboratoire Sol et Environnement- Institut National de Recherche Agronomique
- *LTAC* : Laboratoire de Thermodynamique et d'Analyse Chimique

M

- *MET*: Microscopie Electronique à Transmission
- *MO* : Matière Organique
 - *MOC* : Matière Organique Colloïdale
 - *MOD* : Matière Organique Dissoute
 - *MON* : Matière Organique Naturelle
 - *MOP* : Matière Organique Particulaire
- *MES* : Matières En Suspension
- *MET* : Microscope Electronique à Transmission
- *M_w* : *Molecular Weight*
- *MWCO* : *Molecular Weight Cut-Off*

N

- *NHA* : *Natural Humic Acid*
 - *NHA1* : *Natural Humic Acid1 (2003 July Extract)*
 - *NHA2* : *Natural Humic Acid2 (2003 October Extract)*
- *NP* : NonylPhénol
- *NPE* : NonylPhénolEthoxylé
- *NTU* : *Nephelometric Turbidity Unit*

P

- PC : PolyCarbonate
- PCB : *PolyChloroBiphenyl*
- PCN : Point de Charge Nulle
- PEELS : *Parallel Electron Energy Loss Spectrometer*
- PEVS- CNRS : Programme Environnement, Vie et Société- Centre National de Recherche Scientifique
- pH : potentiel Hydrogène
- Py/CG-SM : Pyrolyse Chromatographie Gazeuse Spectrométrie de Masse
- Py/GC-MS : Pyrolysis/ Gaz Chromatography-Mass Spectroscopy

Q

- Q INST : Débit instantané

R

- RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

S

- SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
- SRSMC : Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes
- SSAD : Station Systèmes Agraires et Développement
- SERES : Service Environnement de Recherche En Santé Publique

T

- 2,4,5 T : *2,4,5 Trichlorophenoxyacetic acid*
- THM : TriHaloMéthanes
- THF : Tétrahydrofurane
- TICT : *Triplet Inter Crossing System*

U

- UP : Ultra-Pure
- UV : Ultra-Violet

X

- XANES : *X-Ray Absorption Near-Edge Structure*

Z

- ZAM : Zone Atelier du bassin de la Moselle

Chapitre I

La Matière Organique Naturelle (MON)

Ses interactions avec les polluants et
sa coagulation avec les sels de fer lors du
traitement de l'eau
dans le cadre de la
Zone Atelier Moselle (ZAM)

I.1. Objectifs de l'étude dans le cadre de la Zone Atelier Moselle (ZAM)

Le bassin de la Moselle constitue une unité hydrologique intéressante à bien des points de vue. En effet, la combinaison de l'hydrologie, de la géologie, de l'histoire, de l'occupation humaine agricole et industrielle de ce bassin rend celui-ci à la fois unique et représentatif des problèmes de ressources en eau des pays tempérés.

Le principal enjeu de la **Zone Atelier Moselle (ZAM)**, défini lors de son élaboration, correspond à une préoccupation primordiale. Il s'agit de la sûreté et de la sécurité de l'approvisionnement en eau des métropoles régionales.

Cette préoccupation couvre plusieurs champs et soulève des questions sociologiques, scientifiques et techniques d'intérêt général. En effet, la sûreté et la sécurité de l'approvisionnement en eau pose les problèmes de quantité, comme de qualité d'eau disponible et utilisable. La résolution de ces problèmes concerne des disciplines scientifiques extrêmement variées comme la géographie, la météorologie, la sociologie et l'économie, les géosciences, l'agronomie, la chimie analytique et la biologie. Les activités industrielles d'élaboration de matériaux ou de production d'énergie ou encore l'agriculture locale constituent autant de demandes quantitatives et qualitatives différentes. Il va sans dire que les usagers n'ont pas nécessairement besoin d'une eau de qualité unique. Enfin, l'eau utilisée, qui ne rentre pas directement dans le produit final, est rejetée et constitue autant de sources de contaminants du milieu naturel aquatique. Tout cela définit autant d'approches possibles et complémentaires puisque aucune discipline scientifique ne peut prétendre fournir toutes les connaissances permettant une gestion raisonnable d'un ensemble aussi complexe et interdépendant. De même, le gestionnaire du milieu aquatique continental ne saura prendre de décision très motivée que s'il dispose d'outils d'aide à la décision incorporant des modèles conceptuels, numériques et logiques permettant de tenir compte d'un maximum d'information et de leurs relations.

Le Contrat de Plan État Région (CPER) a alors défini le cadre des actions et leur hiérarchisation au sein du projet ZAM afin de connaître, protéger et gérer cette ressource régionale unique. C'est la raison pour laquelle la « Zone Atelier du bassin de la Moselle » a été créée. Labellisée par le Programme Environnement, Vie et Société (PEVS-CNRS), elle fédère seize laboratoires publics de recherche organisés autour de cinq approches interdépendantes sous le contrôle d'un conseil scientifique et en partenariat avec des institutions publiques et privées (cf. Annexe 1).

Le projet « RESSOURCES » (Connaissance et Protection de la ressource en Eau) s'articule autour de neuf sous-thèmes :

1. Inventaire des ressources en eau potable et vulnérabilité des réserves hydriques du bassin de la Moselle.
2. Débits des eaux superficielles et en particulier de leurs fluctuations extrêmes.
3. Détermination des origines, naturelles et anthropiques, des éléments minéraux et organiques en solution et des matières en suspension.
4. Etude des modes de transport des éléments minéraux et de la matière organique sous forme dissoute et colloïdale-particulaire.
5. Etude des interactions eaux - suspensions - sédiments.
6. Recherche d'indicateurs biologiques révélateurs précoces de la perturbation des biocénoses peuplant les écosystèmes en eaux douces.
7. Surveillance de la qualité microbiologique des eaux.
8. Modélisation du cycle de l'eau dans le bassin de la Moselle.
9. Analyse et développement des dispositifs techniques, juridiques et économiques de maîtrise des contaminations d'origine agricole.

Le bassin de la Moselle représente une des ressources les plus importantes en eau potable de la région Lorraine.

Les évènements passés et actuels mettent en lumière la fragilité de cet hydrosystème, que ce soit sur le plan qualitatif (pollution) ou quantitatif (crues et sécheresses). Il représente un bassin exemplaire pour la recherche et l'expérimentation au service d'une politique régionale de l'eau.

Le bassin peut être lui-même décomposé en différentes zones géologiques, occupationnelles et sous-bassins hydrologiques. Nous pouvons ainsi distinguer (Figure I.1(1)) :

- **La zone de Nancy, Metz, Thionville**

Cette zone comprend les sous-bassins de la Meurthe, de l'Orne et de la Seille et correspond à la côte de la Moselle, elle renferme un aquifère important pour l'alimentation du Nord de la Lorraine. Le transfert d'eau vers la nappe est rapide, ce qui en fait une ressource vulnérable vis-à-vis de la pollution.

- **La zone d'Épinal à Nancy**

Cette zone comprend les sous-bassins du Madon et de la Meurthe et correspond au transit des débits établis en amont. La dynamique fluviale est très activée. Le relief y est faible. Cette zone fragile et vulnérable à l'industrialisation et aux pratiques agricoles, est constituée de formations imperméables en surface mais fissurées en profondeur. Les surfaces boisées sont réduites, l'élevage et l'agriculture omniprésents, l'industrie est bien installée autour des grandes villes. Dans cette zone, la réserve d'eau de Richardménil a été choisie comme point de prélèvement d'eau et des matières en suspensions (MES) choisi pour notre étude.

- **La zone amont d'Épinal**

Cette zone est caractérisée par des reliefs importants correspondant à une zone de production d'eau en raison de la forte pluviométrie. Les sols y sont acides et filtrants, l'industrie peu développée et l'agriculture présente sous forme d'élevage. La dynamique fluviale est perturbée par des barrages et des prises d'eau. Une part variable des eaux de pluie donne lieu à une infiltration verticale qui alimente les nappes.

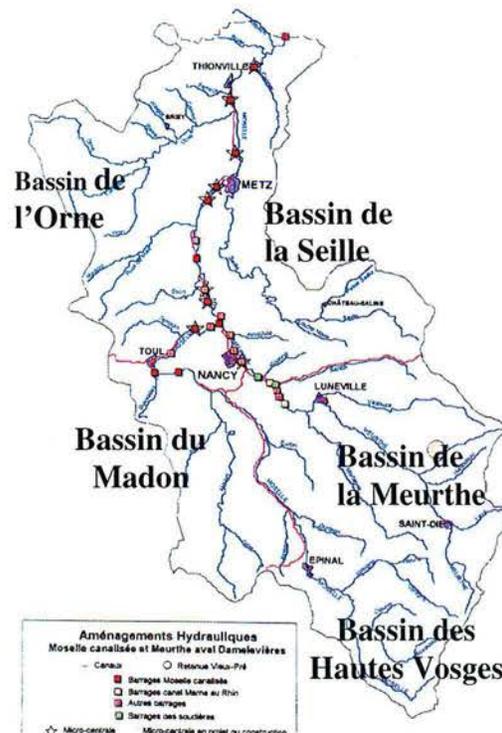


Figure I.1(1)

Carte des sous-bassins de la Zone Atelier Moselle (ZAM).

La thématique associée au travail réalisé au Laboratoire Environnement et Minéralurgie est l'étude du transport de la matière organique naturelle et xénobiotique.

La matière organique joue en effet un rôle fondamental dans le transport des micropolluants, la chimie des colloïdes et les interactions eau/sédiments. Ainsi, le thème fondateur de notre travail touche à l'origine et au devenir de la matière organique anthropique, reconnue à la fois comme charge nutritive excessive de l'écosystème rivière et par conséquent comme polluant générateur de sous-produits au niveau des prises d'eau, et des chaînes de potabilisation. La connaissance spatiale des sous-bassins versants de la Zone Atelier du bassin de la Moselle et des activités humaines associées est essentielle dans l'interprétation des données.

Une présentation de notre zone d'étude et de prélèvements sera présentée dans le Chapitre II.

I.2. La matière organique naturelle des eaux de surface

Toutes les rivières possèdent des **matières organiques (MO)** en suspension, dissoutes ou dans les sédiments. Dans la littérature, les matières organiques (MO) sont souvent séparées en matières organiques dissoutes (MOD) et matières organiques particulaires (MOP)¹. Leur nature, leur origine et leur caractérisation constituent 3 questions fondamentales dont les réponses permettent une meilleure compréhension du fonctionnement du compartiment aqueux. Les matières organiques (MO) fluviales peuvent être d'origine naturelle ou anthropique.

I.2.1. Généralités et origine

I.2.1.1. Origine naturelle des matières organiques

Les matières organiques naturelles peuvent être regroupées en deux sous-ensembles majeurs (Figure I.2(1)) :

- les MO autochtones (vivantes ou détritiques),
- les MO allochtones (issues de la végétation, des sols et des roches mères du bassin versant).

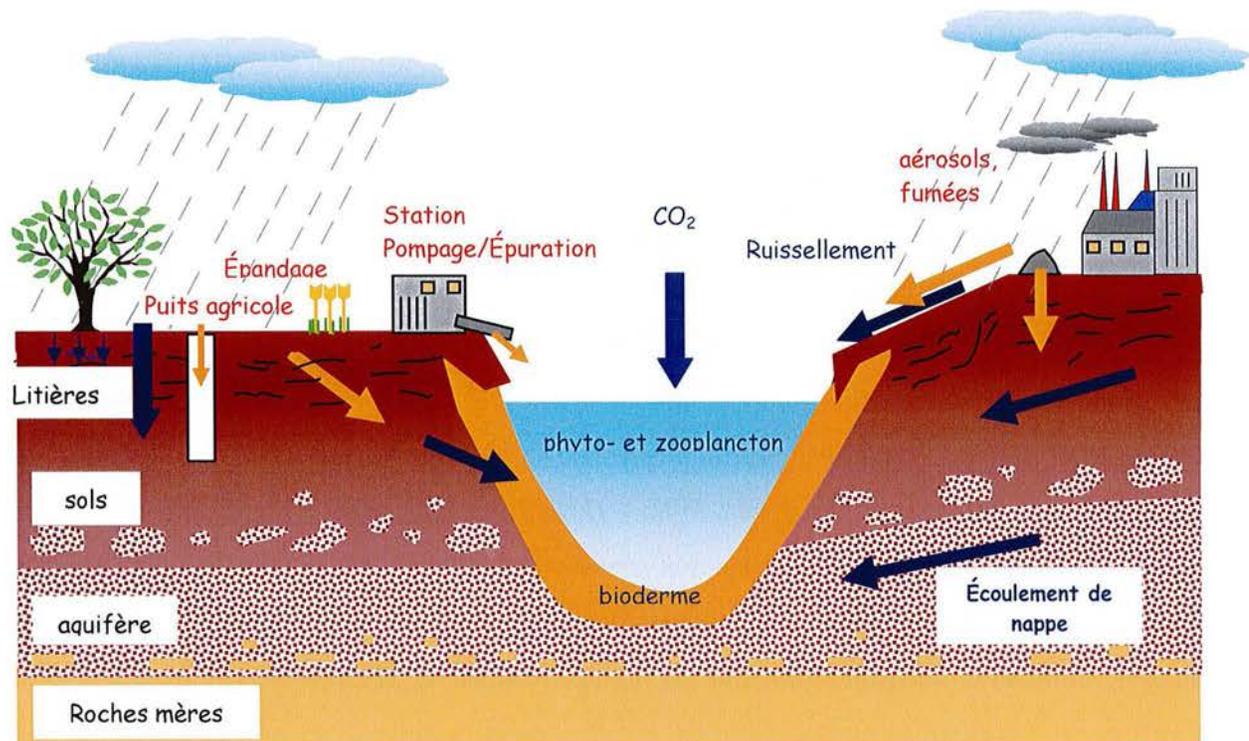


Figure I.2(1)
Apports de Carbone Organique (Veyssey, 1998).

¹ La frontière entre MO particulaires et dissoutes sera discutée plus longuement dans la partie I.2.2.

Chaque type de MO présente une gamme d'âge différente. La MO autochtone est fraîchement synthétisée donc facilement assimilable tandis que la majeure partie de la MO allochtone est plus âgée, reflétant un caractère plus réfractaire à sa dégradation (Meybeck, 1993).

Les apports aux rivières et aux fleuves se font par voie photosynthétique pour la MO autochtone et par des vecteurs hydrologiques (ruissellement, écoulements hypodermiques et de nappe), éoliens ou par chute directe pour les MO allochtones.

a) Matières organiques autochtones

Les principales sources de carbone autochtone sont le phytoplancton et les bactéries en suspension (libres ou attachées). On trouve également les plantes aquatiques (macrophytes), les mousses, les excréments d'invertébrés et de la microflore associée aux détritiques et l'épilithon (bioderme benthique) (Wetzel, 1992 ; Veyssy, 1998).

Généralement, la production de carbone organique autochtone augmente de l'amont vers l'aval du cours d'eau et est liée à la largeur du chenal (Tate et Meyer, 1983).

À l'échelle globale, le carbone organique particulaire (COP)² autochtone joue apparemment un rôle mineur dans les flux exportés vers les océans (Ludwig et al., 1996), 2% du COP total d'après Meybeck, 1993. Le carbone organique dissous (COD)² d'origine autochtone est difficile à mettre en évidence du fait de sa réactivité. Les augmentations de teneurs en COD sont généralement associées aux blooms planctoniques (Heikinen, 1994). Le bioderme benthique, biofilm qui tapisse le fond éclairé des rivières, possède un pouvoir auto-épurateur. Bien que peu étudiée, sa participation à l'exportation totale de carbone organique (CO)² fluvial semble très limitée (Veyssy, 1998).

À l'échelle annuelle, la contribution autochtone par rapport à la contribution allochtone est largement minoritaire, toujours inférieure à 10% du flux annuel (Meybeck, 1993). Elle ne peut toutefois être négligée, au printemps et en été avec les blooms planctoniques (Relexans et Etcheber, 1982 ; Dessery et al., 1984 ; Meybeck, 1988). En Meuse, pendant le bloom, le phytoplancton représente 60% du COP et est supérieur à l'azote organique particulaire (Descy et Gosselain, 1994). En revanche, si la turbidité excède une certaine limite, la production biologique est inhibée (Cauwet et Mackenzie, 1993).

² Ces notions seront définies au paragraphe 1.2.2.

b) Matières organiques allochtones

La source majeure de MO fluviatile allochtone est le réservoir de carbone de la biosphère terrestre. Ce réservoir inclut la biomasse vivante, la biomasse détritique peu ou pas dégradée constituant les litières et le CO des sols qui résulte de la décomposition des litières.

Les MO allochtones provenant de la végétation sont plus ou moins indépendantes des apports minéraux. Au contraire, celles qui sont issues des sols et des roches mères sont liées à la matrice minérale des suspensions par des liaisons fortes ou faibles, suite à des réactions microbiologiques enzymatiques ou physico-chimiques de précipitation, chélation, polycondensation, adsorption, etc. (Walling, 1983 ; Li et al., 1994 ; Arrouays et al., 1995). Les liaisons entre matière organique et matière minérale peuvent donc être covalentes, de complexation, électrostatiques, de type Van der Waals.

Une partie de ce matériel est expulsée du réservoir terrestre par érosion sous forme de COP ou est lessivée à partir des litières et des sols, formant le COD. C'est ce dernier qui est responsable de la coloration paille ou thé des eaux (Esser et Köhlmayer, 1991).

Les apports des litières le long de la rivière sont variables en nature et en quantité, selon l'occupation des sols, la saison et les capacités de rétention et d'échange des différents compartiments de la rivière, suivant sa structure géomorphologique. Ainsi, pour des couvertures de tourbe qui constituent des zones d'accumulation, les apports sur les bassins versants sont particulièrement importants (Heikinen, 1994 ; Hope et al., 1994). La présence d'aluminium ou de fer dans des horizons subsuperficiels peut entraîner l'adsorption du COD par complexation sur les oxyhydroxydes métalliques (Moore, 1989 ; Moore et Jackson, 1989 ; Fiebig et Lock, 1991). La complexation des MO retarde leur lessivage et constitue l'un des phénomènes responsables de la rétention des MO dans les sols.

On peut noter que l'apport majeur des litières est généralement celui des feuilles, mais pour les zones de forêts de conifères, les apports ligneux sont dominants par rapport à ceux des aiguilles (Ward et Aumen, 1986). Le taux de fragmentation semble alors supérieur au taux de minéralisation.

D'après de nombreuses études (Degens, 1982 ; Thurman, 1985 ; Spitzky et Leenheer, 1991), les MO dissoutes ou particulières proviennent majoritairement des sols. La mise à nu des sols agricoles en hiver, l'étendue des monocultures favorisent l'érosion et l'apport de MES dans les rivières. La présence de MES diminue la transparence de l'eau, la photosynthèse et l'oxygénation. Un excès de charges solides en rivière peut nuire à des espèces sensibles, en colmatant les ouïes des poissons et les branchies des mollusques. Ces matières colmatent le fond et les berges de la rivière, interdisant la reproduction aux espèces

de poissons qui frayent sur des graviers (Entreprises pour l'environnement, 1996 ; Maneux, 1998).

On peut s'étonner que la fraction organique des suspensions décroisse lorsque la concentration en matières en suspension augmente. En période d'étiage, les fortes teneurs en COP, essentiellement d'origine autochtone, sont diluées en hiver par l'apport de matières minérales provenant de l'érosion des sols (Ittekkot et Laane, 1991).

Outre les remises en suspension (transport par saltation) de litières dégradées et de COP (agrégats organo-minéraux) déposés en fin de crues, l'érosion des berges est un facteur d'apport important de CO principalement particulaire. Kattan, 1989, estime, de façon empirique, la contribution de l'érosion des berges par rapport au flux de sédiments : de 18 à 26% pour la Moselle et la Mossig et de 20 à 30% pour l'ensemble des fleuves.

À noter que les berges et fonds de fleuves et de rivières sont les zones de nourrissage des nappes phréatiques associées. Ces zones sont donc de la plus haute importance dans les relations quantitatives et qualitatives entre rivières et nappes.

1.2.1.2. Origine anthropique des matières organiques

Les matières organiques anthropiques présentes dans les rivières peuvent avoir différentes origines : domestiques, industrielles ou agricoles. Le Tableau I.2(1) présente les différentes activités anthropiques responsables d'apports de MO dans le compartiment aqueux, et les compare en termes de flux. Les apports liés aux zones urbaines, dus au lessivage et aux déchets domestiques, apparaissent prédominants.

Tableau I.2(1)
Différents apports de populations en kg / hab / an (Leroy, 1994).

SOURCES	PARAMETRES					
	MES	DCO	N	P	Pb	
Apports atmosphériques	80 (a)		8,9 (a) 10 (b)	0,30 (a) 0,75 (c)		
Flux en milieu rural	260 (a) 40 (d)	110(d)	25 à 35 (a) 20 à 40 (c)	0,43 (a) 0,6 à 2 (c)	0,008	
Flux d'origine routière	France Allemagne	200 à 750 850	230 à 400 550 à 670		0,5 à 1,2 1,15 à 1,33	
Flux dus au ruissellement urbain	Finlande France	100 à 1000 300 à 1100	100 à 500 160 à 460	2 à 10 3 à 16	0,2 à 2 0,6 à 5	0,1 à 1,5 0,2 à 0,4
Flux domestiques non traités (e)	50 hab/ha 200 hab/ha 400 hab/ha	1642 6570 13140	2053 8212 16425	274 1095 2190	73 292 585	0,28 (h) 1,10 (h) 2,20 (h)
Flux domestiques traités	50 hab/ha 200 hab/ha 400 hab/ha	82 328 657	328 1314 2628	137 547,5 1095	5,5 22 44	0,14 (g) 0,55 (g) 1,10 (g)
(a) CEMAGREF (zone à vocation céréalière)		DCO = 750 mg/L MES = 600 mg/L		MES = 30 mg/L (g) Base de calcul		
(b) Hénin		Norg + NH ₄ = 100 mg/L		[Pb] = 50 µg/L. Directives CEE de concentration en Pb dans les eaux de surface		
(c) Benneton		(f) Bases de calcul		(h) [Pb] = 100 µg/L		
(d) France autoroutes (zone boisée)		150 L/hab/j ² P = 2 mg/L		(i) Cathelain		
(e) Bases de calcul 150 L/hab/j P = 26,7 mg/L		DCO = 120 mg/L				

a) Eaux résiduaires urbaines

Elles comprennent les eaux résiduaires domestiques et les eaux de pluie. Les eaux résiduaires domestiques regroupent les eaux de vannes (eaux des diverses toilettes) et les eaux ménagères (lavages). Les composés organiques dissous ou associés aux MES sont issus des particuliers mais également des collectivités (bâtiments scolaires, hôpitaux), des commerces (charcuterie, blanchisseries), de l'artisanat (teintureries, ateliers de photographie).

Fort heureusement, en France, depuis la loi sur l'eau de 1964 et les diverses directives européennes de plus en plus sévères, les eaux usées ne sont plus directement rejetées dans l'environnement mais préalablement épurées dans des stations de traitement. Néanmoins, les rejets de ces stations induisent des perturbations de l'écosystème.

Un orage en zone urbaine, surtout après une longue période de sécheresse, constitue un lessivage des surfaces urbaines très efficace, qui va tout entraîner. Au contact des surfaces urbaines, les eaux de pluie se chargent en MES riches en polluants organiques, minéraux et

sels solubles (Thévenot, 1993). Les principales sources sont les lubrifiants, les carburants et les pots d'échappement, les débris dus à l'usure des véhicules et des chaussées, les déjections d'animaux, les produits divers répandus sur la chaussée, le lessivage des gouttières et toitures (métaux). Les rejets pluviaux urbains constituent, pour les eaux réceptrices, la source principale des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et de polychlorobiphényle (PCB), qui sont des polluants particulièrement dangereux pour la faune et la flore, et rémanents dans le milieu aquatique (Bachoc et al., 1993).

Longtemps considérée comme un problème mineur, la pollution apportée par les rejets urbains à forte charge organique devient une préoccupation majeure pour la protection du milieu naturel (Veyssy, 1998). El Samrani et al., 2004b, a montré la présence de différents porteurs (minéraux argileux, oxyhydroxydes, zircons et terres rares) pour un métal lourd donné et a mis en évidence l'importance de l'analyse des traces dans l'appréhension du cycle des éléments lourds en milieu urbain.

b) Eaux résiduaires industrielles

La teneur en composés organiques des effluents industriels varie selon l'activité de l'entreprise et quelquefois selon la saison, comme dans le cas des campagnes saisonnières des conserveries alimentaires. Les eaux résiduaires industrielles peuvent être néfastes à l'environnement de par leur concentration ou leur toxicité. La présence d'hydrocarbures (tributyléthylène, hydrocarbures aromatiques polycycliques, etc.) et de détergents est souvent incriminée. Ces composés peuvent provenir de nombreuses industries.

c) Agriculture

L'usage intensif de pesticides et herbicides (atrazine, simazine, acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D)) et autres produits phytosanitaires en agriculture entraîne des contaminations des nappes souterraines et des rivières alentours, par infiltration et ravinement lors de précipitations (Sannino et al., 1997 et 1999). Cependant, la future réglementation fait obligation aux fabricants de ces substances de donner les éléments de traitabilité des eaux en vue de leur élimination. Plusieurs substances à usage agricole sont à l'examen en tant que substances prioritaires par la Commission Européenne, *i.e.*, leur rejet dans le milieu naturel serait à long terme prohibé. Parmi ces substances, on retrouve l'atrazine, herbicide jusqu'alors très répandu pour les cultures de maïs.

d) Apports induits

Les résidus des traitements des stations d'épuration ou de détoxification peuvent également être la source de pollution organique dans l'environnement. Les boues de station d'épuration, riches en bactéries, peuvent après stabilisation et éventuellement déshydratation, être utilisées en épandage agricole, comme amendement ou co-amendement.

e) Conclusion sur l'origine des matières organiques

Le CO fluvial (dissous ou particulaire) provient essentiellement des sols, des litières, des rejets anthropiques ou de la production interne. Le CO transporté est majoritairement d'origine allochtone (sols et litières). Toutefois, les deux autres sources peuvent être ponctuellement non négligeables, comme dans le cas des grandes agglomérations, ou périodiquement comme dans le cas des blooms phyto-planctoniques en période d'été.

I.2.2. Nature de la matière organique naturelle

La matière organique présente dans les rivières se répartit sur un grand domaine de taille (Figure I.2(2)). Elle se caractérise également par une diversité des groupements chimiques représentés et par conséquent par une diversité de propriétés chimiques et physiques.

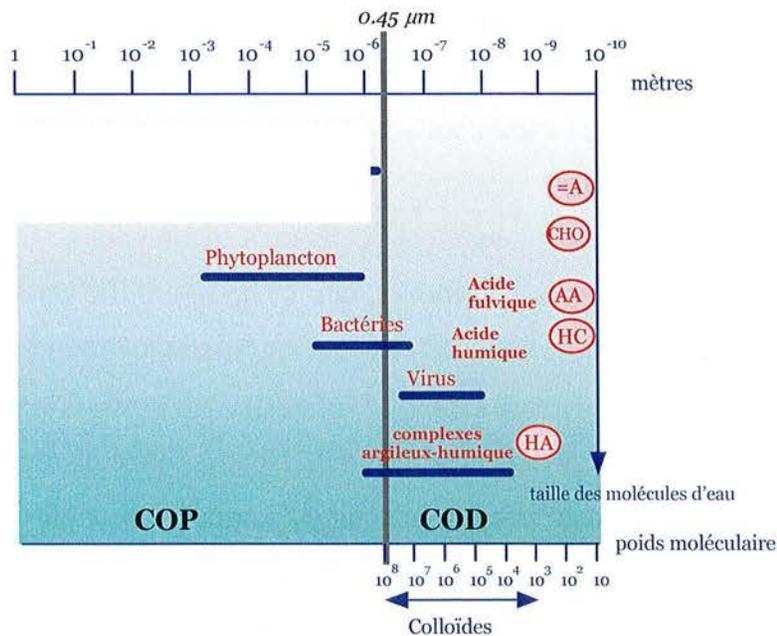


Figure I.2(2)

Taille du carbone organique dissous (COD) et particulaire (COP) dans les eaux naturelles (Thurman, 1985).

Une première méthode de classification des espèces organiques présentes dans le milieu aqueux est la distribution granulométrique, séparant **carbone organique dissous (COD)** et **carbone organique particulaire (COP)**. La séparation granulométrique à 0,45 μm entre les matières organiques dissoutes et les matières organiques particulaires ne correspond à aucune rupture dans les propriétés chimiques des composés en question. La partie dissoute inclut généralement la matière colloïdale. En pratique, la séparation entre matière organique dissoute et matière organique particulaire est difficilement réalisable parce que les distributions de tailles des composants aquatiques sont continues de quelques angströms à quelques microns. Il est plus judicieux de différencier la matière organique selon les groupements chimiques présents, la solubilité, le caractère hydrophile ou lipophile, la réactivité acido-basique ou oxydo-réductrice, plus brièvement en fonction de ses propriétés physico-chimiques en solution. La nature, et par conséquent les propriétés, des espèces organiques va dépendre de leur origine et de leur temps de résidence dans le milieu aqueux, ou plus précisément de leur stade de dégradation.

Au vu de la considérable diversité des apports allochtones vers le milieu aqueux, on s'attend à une grande variété de composition de la matière organique des eaux de surface, même en absence de pollutions organiques d'origine anthropique. La matière organique naturelle est le résultat direct ou indirect de la photosynthèse et de la biodégradation. Il n'est donc pas surprenant que l'on y retrouve des molécules ou des familles de molécules habituellement trouvées dans la biochimie. Dans le cas de matières organiques peu évoluées, on pourra aussi retrouver les métabolites de certaines molécules d'origine naturelle ou anthropique comme certains dérivés méthylés. Ces composés forment, en quelle que sorte, la frontière entre les composés naturels et les composés anthropiques. Enfin, les processus d'oxydoréduction abiotiques peuvent former des composés difficilement biodégradables, voire potentiellement toxiques.

La majorité de la matière organique naturelle est sous forme dissoute ou colloïdale. La Figure I.2(3) présente les grands groupes de composés organiques le plus souvent rencontrés dans les eaux de rivière ainsi que leurs relatives prédominances. La moitié du COD est représentée par les substances humiques. La matière organique particulaire est constituée du phytoplancton, des microorganismes, des virus, des fibrilles (bactériens ou mycéliens).

Les **sucres**, les polysucres ou **polysaccharides**, les **lipides** et **acides gras**, les **protéines** et **acides aminés**, les **acides nucléiques** (matériel génétique de la biomasse) sont

universellement répandus et constituent une source énergétique pour la biomasse autochtone du milieu aqueux. En fonction de leur temps de résidence, de leur origine et de leur mode de transfert vers la rivière, ces composés seront plus ou moins hydrolysés, dégradés en composés intermédiaires, en molécules de plus petites tailles.

Les **acides hydrophiles** sont des acides organiques dissous, non retenus par les résines XAD non ioniques (voir Chapitre III, analyse des matières organiques). Ils sont encore mal définis et contiennent des acides sacchariques comme les acides polyuroniques.

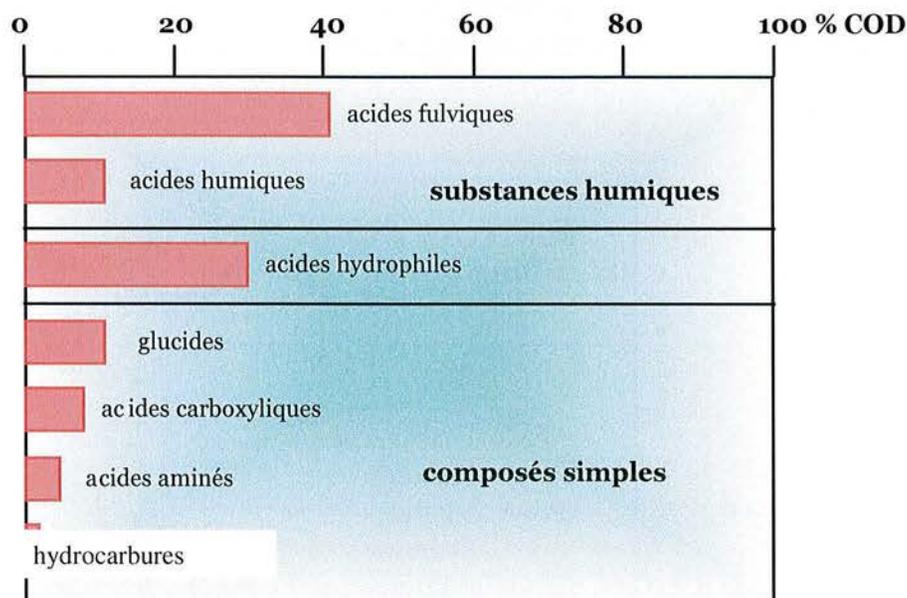


Figure I.2(3)
Distribution du carbone organique dissous dans une eau de rivière qui contient 5 mg/L de COD (Sigg et al., 1992).

Le Tableau I.2(2) présente de manière condensée, un éventail simplifié des substances biologiques naturelles et de leurs produits de dégradation, accompagné d'une liste abrégée des composés simples communément rencontrés dans les eaux naturelles.

Tableau I.2(2)
Produits de dégradation de la biomasse (Sigg et al., 1992).

Substances biologiques	Produits intermédiaires de dégradation	Produits intermédiaires et finaux qui se trouvent dans les eaux naturelles non polluées
Protéines	Polypeptides → acides aminés → RCOOH, RCH ₂ OHCOOH, RCH ₂ OH, RCH ₃ , RCH ₂ NH ₂	NH ₄ ⁺ , CO ₂ , HS ⁻ , CH ₄ , peptides, acides aminés, urée, phénols, indoles, acides gras, mercaptans.
Lipides Graisses Cires Huiles Hydrocarbures	Acides gras + glycérine → RCH ₂ OH, RCOOH, RCH ₃ , RH	CO ₂ , CH ₄ , acides aliphatiques, acides acétique, lactique, citrique, glycolique, maléique, stéarique, oléique, glucides hydrocarbures.
Glucides Cellulose Amidon → (C _x (H ₂ O) _y) Hémicellulose Lignine	Monosaccharides Hexoses Polysaccharides → Pentoses Chitine Glucosamine	CO ₂ , CH ₄ , glucose, fructose, galactose, arabinose, ribose, xylose.
Porphyrines et pigments de plantes Chlorophylle Hémine Carotène Xanthophylle	Chlorine → Phéophytine → Hydrocarbures	Phytol, pristane, caroténoïdes, isoprénoïdes, acides, alcools, cétones, porphyrines.
Acides nucléiques	Polynucléotides → Nucléotides	CO ₂ , CH ₄ , H ₃ PO ₄ , purines, pyrimidines, ribose, désoxyribose.
Substances complexes formées à partir de produits intermédiaires	Phénols, Quinones et acides aminés → Acides aminés et Produits de décomposition des glucides	Mélanines, substances humiques. Acides humiques et fulviques, tanins.

Les **substances humiques**, macromolécules complexes, constituent un groupe à part, en tant que matière réfractaire, peu biodégradable. Nos études se sont portées sur ces substances.

Nous présentons donc dans la partie suivante ses principales caractéristiques et propriétés, dans l'objectif de la mise en place des possibilités des interactions avec les micropolluants.

I.2.3. Les substances humiques

Les substances humiques constituent une classe de substances organiques, réfractaires, existant dans tous les environnements terrestres et aquatiques (Aiken, 1985). Elles sont issues d'un processus appelé humification correspondant à un ensemble de réactions de dégradation et de polymérisation. Ces substances humiques représentent la plus grande part de la fraction organique des sols (60 à 70% selon Woodwell et al., 1978).

I.2.3.1. Origine et formation

La formation des substances humiques ou humification résulte d'un ensemble de processus biologiques et abiotiques, liés aux conditions physico-chimiques et biologiques du milieu. Ce processus consiste en une polymérisation de molécules organiques issues de la dégradation de matière organique plus complexe ou produites par des organismes vivants.

Nous avons vu (Tableau I.2(2)) que différents composés sont présumés être des précurseurs des substances humiques, essentiellement du fait de leur stabilité. Les mélaniodines, issues de la réaction à température élevée entre les protéines et les glucides ont longtemps été considérées comme les précurseurs des substances humiques.

La formation des substances humiques a donné lieu à un certain nombre d'hypothèses quant aux mécanismes impliqués.

a) Théorie de la lignine (dans Stevenson, 1994)

Selon la théorie de Stevenson, 1994, illustrée à la Figure I.2(4), les substances humiques dériveraient de résidus de lignine incomplètement dégradés. Les sous-unités de lignine perdraient des groupements méthoxy (-OCH₃) pour former des ortho-hydroxyphénols et les chaînes aliphatiques s'oxydéraient pour former des fonctions acide.

La déméthylation et l'oxydation des chaînes aliphatiques entraîneraient la formation de produits enrichis en groupements fonctionnels avec une diminution de la quantité de

carbone et une augmentation de la quantité d'oxygène par rapport à la molécule de départ. Le contenu en -COOH serait faible en regard de la quantité de groupements contenus dans les substances humiques, des groupements -COOH pourraient cependant apparaître du fait de la rupture de noyaux aromatiques. Ces sous-unités se réarrangeraient ensuite avec l'azote de composés comme les protéines (Stevenson, 1994).

Les biopolymères résistants issus des végétaux (lignine, cutine, subérine) et microbiens (mélanine, paraffines) seraient les précurseurs à partir desquels les substances humiques évolueraient. Les biopolymères seraient préservés sélectivement et deviendraient une partie de ce qui est défini sous le terme d'humine. Une dégradation croissante conduirait à la formation de macromolécules qui auraient à peu près le même poids moléculaire, mais seraient enrichies en groupements fonctionnels contenant de l'oxygène. L'évolution conduirait tout d'abord aux acides humiques puis aux acides fulviques, la fraction la plus humifiée des substances humiques (Stevenson, 1994).

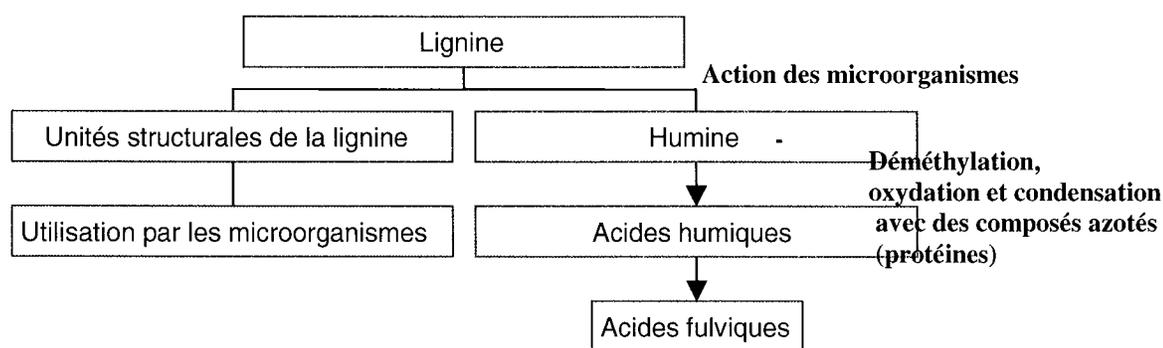


Figure I.2(4)
Formation des substances humiques selon la théorie de la lignine
(Stevenson, 1994).

b) Théorie des polyphénols (dans Stevenson, 1994)

Les quinones d'origine lignineuse ou bactérienne seraient les constituants principaux à partir desquels les substances humiques seraient synthétisées. Ce modèle, représenté dans la Figure I.2(5) consiste en une dégradation de tous les biopolymères végétaux en unités structurales monomères dont certaines polymériseraient par voie enzymatique ou spontanément (oxydation) pour produire des substances humiques de complexité croissante.

L'ordre de formation des substances humiques serait le suivant : acides fulviques, acides humiques, puis humine.

Selon cette théorie, la dégradation de la lignine ainsi que la synthèse microbienne sont à l'origine de ces polyphénols. Leur contribution aux substances humiques a été mise en

évidence de façon indirecte par des études dégradatives permettant d'obtenir des fragments de structures typiques de la lignine (dérivés syringyl, guaiacyl, *p*-coumaryl) et des microorganismes (flavonoïdes). Selon les conditions environnementales, les contributions de chacune de ces deux sources peuvent varier. Les unités phénoliques sont préalablement déméthylées, permettant la formation de groupements -OH libres. Les composés aldéhydes sont oxydés, les chaînes latérales subissent des décarboxylations et des hydroxylations. La transformation en quinone permet la réaction de polymérisation avec des composés contenant de l'azote (osamines ou acides aminés), ce qui aboutirait à la formation de substances humiques. De nombreux acides aromatiques mono-, di- ou tri-hydroxyphénoliques peuvent servir d'unités de base pour la synthèse de substances humiques.

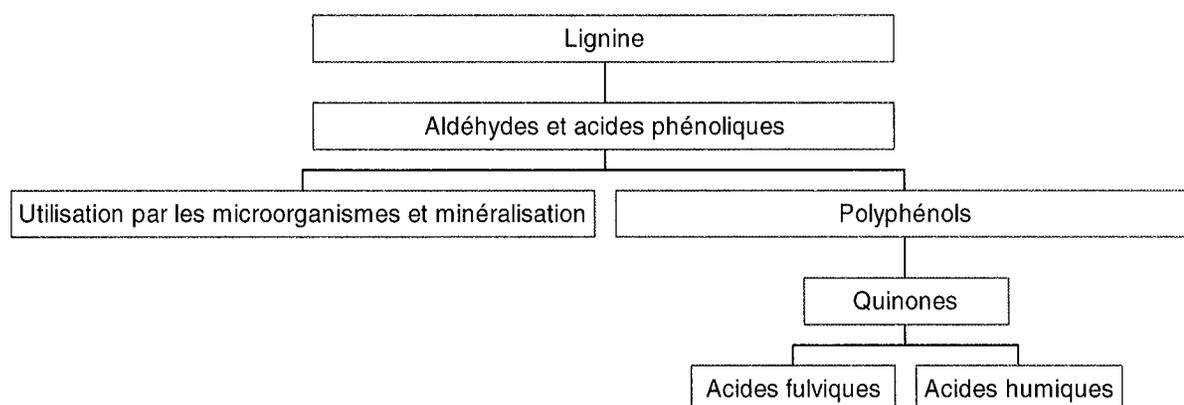


Figure I.2(5)
 Formation des substances humiques d'après la théorie des polyphénols
 (Stevenson, 1994).

c) Réaction de Maillard (Maillard, 1912)

Un autre processus a été proposé pour la formation des substances humiques. Il est basé sur la réaction de Maillard entre les sucres et les amines (Maillard, 1912). Cette voie s'avère peu probable dans les conditions naturelles du milieu (Saiz-Jimenez, 1996). Cependant, des changements drastiques et fréquents dans le sol ou l'eau de rivière (gel et dégel, humidité et sécheresse) en même temps que le mélange des molécules organiques avec des minéraux pouvant jouer le rôle de catalyseurs pourraient faciliter ces réactions (Stevenson, 1994).

d) Conclusion sur l'humification

Les substances humiques peuvent vraisemblablement être formées par tous les processus cités précédemment. La voie impliquant la condensation des polyphénols et des

quinones semble être l'hypothèse la plus retenue actuellement. L'association d'unités structurales telles que celles décrites précédemment constituerait le noyau de la structure à laquelle viendrait s'associer d'autres molécules organiques et des constituants aliphatiques (Stevenson, 1994).

1.2.3.2. Caractérisations et classifications des substances humiques

Comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs voies sont supposées conduire à la formation des substances humiques. Cependant, outre les phénols, de nombreuses autres molécules, reconnaissables biochimiquement ont été mises en évidence au sein des substances humiques. Par ailleurs, de nombreuses techniques analytiques comme la spectrométrie infra-rouge ont révélé dans certains acides humiques la présence d'azote sous des formes très variées (liaisons peptidiques, amines) de même que la présence de fractions aliphatiques, ou la présence de polysaccharides. Les **techniques d'hydrolyse** associées à des techniques de **détection** ou de **purification** ont permis d'apporter un certain nombre d'informations sur la présence de sucres, d'acides aminés ou de lipides associés aux fractions humiques (Grasset et Amblès, 1998a et 1998b). La pyrolyse couplée à la chromatographie en phase gazeuse avec spectrométrie de masse (**Py/CG-SM**) et la **thermolyse** couplée à la chromatographie gazeuse et à un spectromètre de masse sont des techniques dégradatives récemment utilisées pour essayer de déterminer les constituants des macromolécules humiques de diverses origines (McKinney et Hatcher, 1996 ; del Rio et al., 1998). Les fragments obtenus peuvent ensuite être comparés à ceux décrits dans la littérature pour différents types de macromolécules ayant subi l'un ou l'autre des traitements, regroupés sous le terme générique d'hydrolyse et méthylation assistées thermiquement (THM) d'après Challinor, 2001. Les résultats obtenus par ces **techniques dégradatives** de THM, sont en accord avec ceux obtenus par différentes méthodes dégradatives comme les **méthodes oxydatives** (KMnO_4) qui libèrent des fragments identiques et les techniques non-dégradatives telles que la RMN (Hatcher et Clifford, 1994 ; Saiz-Jimenez, 1994 et 1996).

Ces techniques donnent des aperçus globaux de la composition des substances humiques.

Le Tableau I.2(3) résume ainsi les classes majeures de composants identifiés dans les substances humiques et les origines possibles associées grâce aux différentes voies de formation précédemment mentionnées.

Tableau I.2(3)
 Classes principales de composés et de biomacromolécules
 trouvées dans les substances humiques (Saiz-Jimenez, 1996).

Classe de composés	Origine possible
Hydrocarbures aliphatiques	
Alcanes	Microorganismes/ Végétaux/ Polluants
Alcools	Microorganismes/ Végétaux/ Polluants
Acides aliphatiques	
Acides gras	Microorganismes/ Végétaux/ Polluants
Acides gras hydroxylés	Microorganismes/ Végétaux/ Polluants
Acides dicarboxyliques	Microorganismes/ Végétaux/ Polluants
Composés aromatiques substitués	
Alkylbenzène	Polluant/ Artefact
Alkylnaphtalène	Polluant/ Artefact
Alkylphénols	Microorganismes/ Végétaux
Dialkylphtalates	Polluant
Hydrocarbures aromatiques	
HAP	Polluant
Acides aromatiques	
Acides benzoïques	Microorganismes/ Végétaux
Acides phénoliques	Microorganismes/ Végétaux
Autres hydrocarbures	
Tocophénols	Microorganismes/ Végétaux
Chlorophylle	Microorganismes/ Végétaux
Terpènes	Microorganismes/ Végétaux
Stéroïdes	Microorganismes/ Végétaux
Biomacromolécules	
Cires	Végétaux
Polysaccharides	Microorganismes/ Végétaux
Protéines	Microorganismes/ Végétaux
Lignine	Végétaux
Macromolécules aliphatiques	Microorganismes/ Végétaux

Les substances humiques ne correspondent donc pas à une entité chimique unique, leur structure ne peut être décrite en termes chimiques précis. De même, les substances humiques ne sont pas prédestinées biologiquement à subir des actions biochimiques spécifiques et ne peuvent être définies en termes fonctionnels.

Elles doivent être définies de façon opérationnelle, c'est-à-dire sur la base des procédés qui permettent de les isoler.

Ainsi, elles sont généralement divisées en trois catégories majeures, définies en fonction de leur solubilité (Aiken, 1985):

- les **acides fulviques (AF)** : fraction des substances humiques solubles à tous les pH.
- les **acides humiques (AH)** : substances solubles en pH alcalin mais précipitant à pH inférieur à 2,5.
- l'**humine (H)** : cette fraction rassemble des substances organiques de diverses natures insolubles ou inextractibles. Elle forme un mélange particulièrement complexe et résistant avec la matière minérale du sol. Duchaufour, 1994 distingue trois types d'humines :
 - i) l'humine microbienne comprenant les corps microbiens vivants et morts,
 - ii) l'humine héritée, constituée de débris végétaux (matière organique fraîche lignifiée) peu transformée,
 - iii) l'humine évoluée, composée de molécules comparables aux acides humiques, mais rendues insolubles et inextractibles.

Les acides humiques et fulviques contiennent les mêmes acides aminés que ceux présents sous forme libre dans les sols mais dans des proportions différentes. Les acides humiques contiendraient davantage d'acides aminés basiques mais de plus faibles quantités d'acides aminés acides. Par ailleurs, une partie des polysaccharides est liée aux acides humiques et fulviques par des liaisons ester ou autres liaisons covalentes (Stevenson, 1994). Schnitzer et Neyroud, 1975, ont mis en évidence l'association d'acides gras et d'alcane avec les acides humiques et fulviques. Selon ces auteurs, les acides organiques se présentent sous deux formes, adsorbés physiquement ou liés chimiquement, cette dernière catégorie étant la plus importante. D'autres études soutiennent ces hypothèses (Martin et al., 2001). Globalement, différents composés provenant des protéines et des polysaccharides ont été détectés dans les acides humiques, mais en moindre quantité que les produits dérivés de lignine (del Rio et al., 1998). Récemment, Zang et al., 2000, ont montré la contribution importante des protéines dans le stock d'azote organique des acides humiques. Ces résultats ont été confirmés par d'autres études portant sur les AH (Zang et al., 2001) et l'humine (Knicker et al., 2001). Selon Zang et al., 2000, ces matériaux protéiques subissent un

processus d'« encapsulation » au sein des structures humiques. Les auteurs ont émis l'hypothèse d'une protection impliquant la fraction aliphatique des acides humiques.

La fraction protéique peut donc être physiquement « encapsulée » dans la matière organique réfractaire des sols et ainsi préservée de la dégradation chimique et biologique.

Il existe une analogie entre la structure des AF, des AH et des humines. Par ailleurs, l'étude des propriétés physico-chimiques (masse molaire, composition élémentaire, présence et distribution des groupements fonctionnels) des AF et AH démontre qu'il n'existe pas une séparation nette entre les deux catégories, mais plutôt une évolution graduelle de ces propriétés quand on passe d'une catégorie à l'autre (Giannissis, 1987).

Il est difficile de savoir si, dans ces catégories de molécules définies de façon opérationnelle, les acides fulviques sont les précurseurs des acides humiques ou inversement.

Les acides humiques se différencient des acides fulviques (Giannissis, 1987) par :

- une **teneur en carbone** plus élevée, ainsi qu'une teneur en oxygène plus faible,
- une faible quantité des **groupements carboxyliques**,
- un rapport **carbone aromatique/carbone aliphatique** plus élevé,
- un **poids moléculaire** plus important de 500 à 2 000 Daltons pour les acides fulviques (Thurman et Malcolm, 1983) et de 24 000 à 1 360 000 Daltons pour les acides humiques (Hayes et al., 1989).

Les substances humiques comprennent des fonctions carboxyliques (5 à 10 par molécule), phénoliques, alcools, cétones et en quantité moindre des groupements azotés ou soufrés. Les substances humiques agissent globalement comme un ensemble de différents complexants organiques : l'acide salicylique, l'acide phtalique, l'acide malonique, le pyrocatechol (souvent nommé catéchol) ou l'antraquinone (Figure I.2(6)).

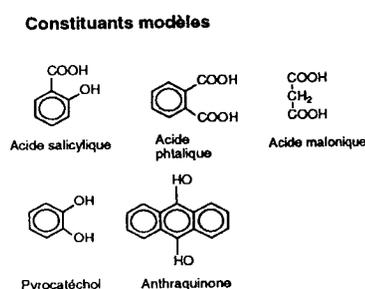


Figure I.2(6)

Composés organiques pouvant servir de modèles par leurs propriétés complexantes analogues pour les substances humiques (Sigg et al., 1992).

Les **propriétés globales** des substances humiques naturelles peuvent se définir par le rapport des éléments (O/C, C/H, C/N, ...), le degré d'aromaticité, la teneur en groupements carboxyliques et la composition des groupements majoritaires. Un fort rapport O/C indique une forte polarité de la substance humique et une plus grande solubilité dans l'eau. Les acides humiques (AH) ont des poids moléculaires plus grands que les acides fulviques (AF). Il en est de même des substances humiques des sols (ou terrestres) par rapport aux substances humiques aquatiques (Tableau I.2(4)).

Tableau I.2(4)
Propriétés des substances humiques (International Humic Substance Society)
(Murphy et al., 1990).

Sample	Carbox ³	Arom ³	Aliph ³	f _a ³	C ³	O ³	O/C ³	COOH ³ meq/g	OH ³ meq/g	Mw ³	Moles COO ⁻
Suwannee FA	20	24	33	0,24	53,5	41,29	0,58	6,0	1,2	829	7,4
Suwannee HA	19	37	21	0,37	54,34	39,43	0,54	4,1	2,1	1600	13,8
Nordic FA	24	31	18	0,31	53,44	40,78	0,57	5,5	1,7	2137	22,8
Nordic HA	19	38	15	0,38	55,15	38,50	0,52	4,4	1,8	3264	28,5
Peat FA	28	34	20	0,34	51,54	42,58	0,62				
Peat HA	20	47	19	0,47	56,82	34,91	0,46				
Leonardite HA	15	58	14	0,58	63,08	30,69	0,36			7550	71,5

³ f_a : degré d'aromaticité ; COOH et OH : groupements déterminés par titration potentiométrique ; Mw : poids moléculaire moyen ; Moles COO⁻ : calculs fondés sur la RMN et le poids moléculaire moyen.

Suwannee et Nordic sont des substances humiques aquatiques, Peat et Leonardite sont des substances humiques des sols. Les pourcentages en groupements carbonés sont déterminés par RMN liquide du ¹³C (Groupes carboxyliques : 190-165 ppm ; Aromatiques : 165-100 ppm ; Aliphatiques : 60-0 ppm).

Bien que les **réactions acido-basiques** des substances humiques soient principalement déterminées par les groupements carboxyliques (-COOH) et phénoliques (-φ-OH), il n'est pas possible de les décrire simplement (par titrage par exemple) à cause de l'influence des différents substituants. En effet, le domaine des pK_A est relativement étendu pour l'ensemble des constituants humiques, car la valeur de cette constante dépend notamment du radical rattaché au groupement acide.

Par ailleurs, l'effet de l'**environnement géochimique** et climatique sur les propriétés des substances humiques peut être illustré par la comparaison des propriétés chimiques et des distributions des groupements chimiques sur une série de substances humiques naturelles bien

caractérisées (Murphy et al., 1990). La taille moléculaire et l'ionisation des substances humiques sont contrôlées par les conditions chimiques et physiques du milieu aqueux.

I.2.3.3. Modèles structuraux proposés pour les substances humiques

De nombreuses représentations des acides humiques ont vu le jour au fil des années, suite aux progrès analytiques réalisés. Ces représentations sont très variables selon le mode d'humification considéré et l'interprétation des données analytiques. Nous présentons ici brièvement les différentes représentations données dans la littérature de façon chronologique.

a) Structure micellaire selon Wershaw

Wershaw, 1986, a été un des premiers auteurs à évoquer une structure micellaire pour les substances humiques, structure permettant de justifier les interactions des substances humiques avec les polluants hydrophobes du milieu. En effet, comme le montre la Figure I.2(7), le modèle proposé associe des régions internes hydrophobes qui pourraient être principalement composées des fonctions aldéhydes et cétones et de régions externes hydrophiles composées de groupements chargés (fonctions carboxyliques, phénoliques et amines).

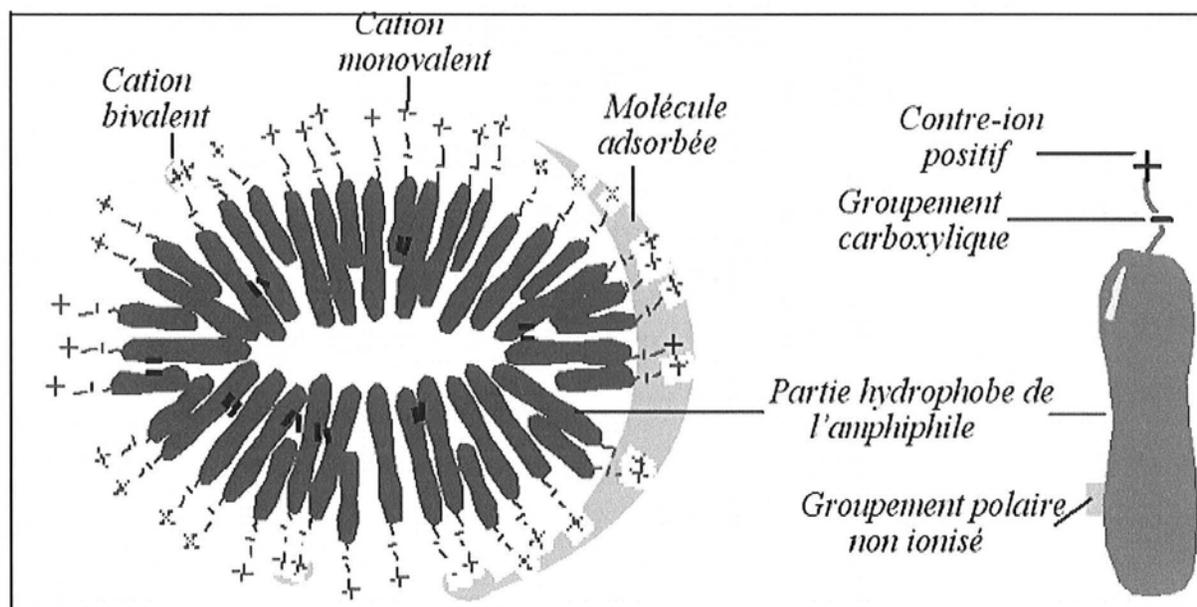


Figure I.2(7)
Représentation schématique d'une micelle d'acide humique
(Wershaw, 1986).

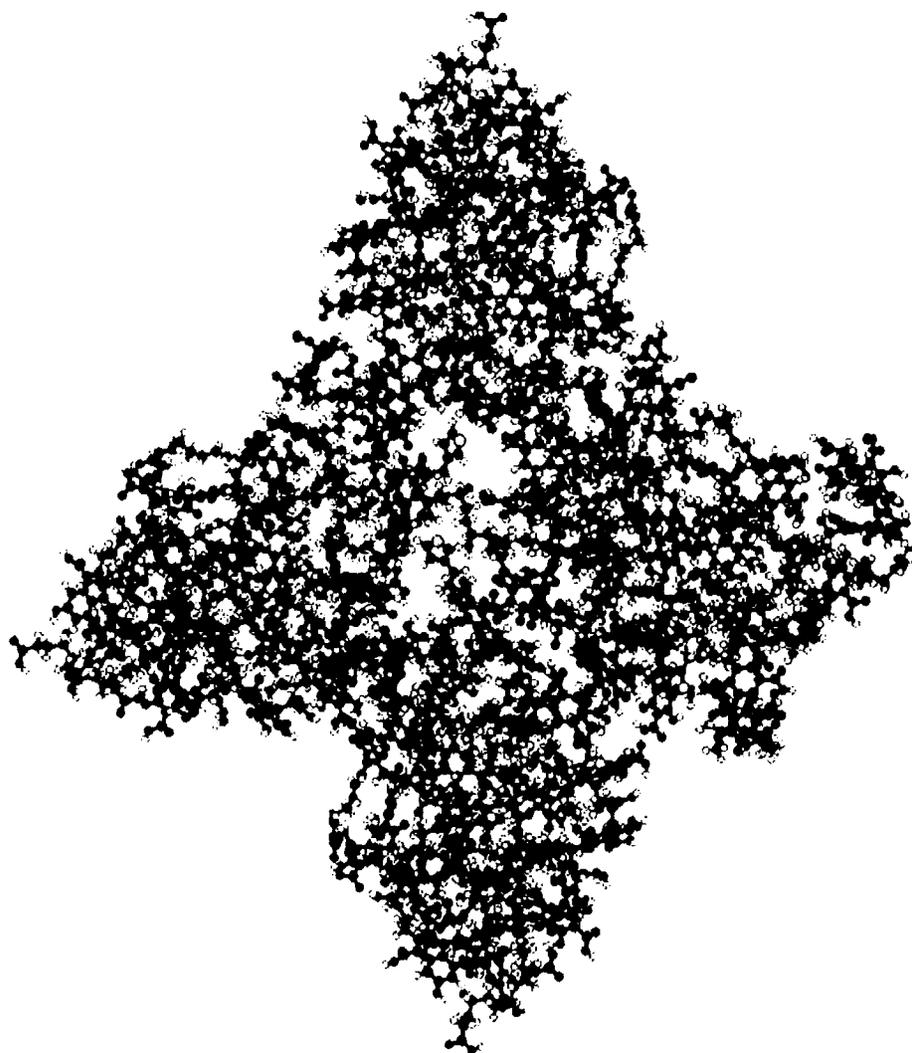


Figure I.2(9)

Modèle 3D de matière organique colloïdale dissoute de type acide humique résultant d'une modélisation assistée par ordinateur⁴ (Schulten et Gleixner, 1999).

⁴ calculée avec 5 048 atomes. Les liaisons covalentes et les angles calculés pour cette conformation ont permis de calculer des vides de volumes optimums dans la structure permettant l'emprisonnement et la liaison avec des substances de nature anthropogénique.

c) Structure en hélice selon Sein

Sein et al., 1999, ont proposé un modèle de conformation en hélice (surface semi-hydrophile/partie interne hydrophobe) pour les substances humiques. Ce modèle, rejoignant la structure en micelle précédemment proposée, a été élaboré à partir de calculs de modélisation basés sur la chiralité des substances humiques (Figure I.2(10)) et d'analyses chimiques par Py/CG-SM.

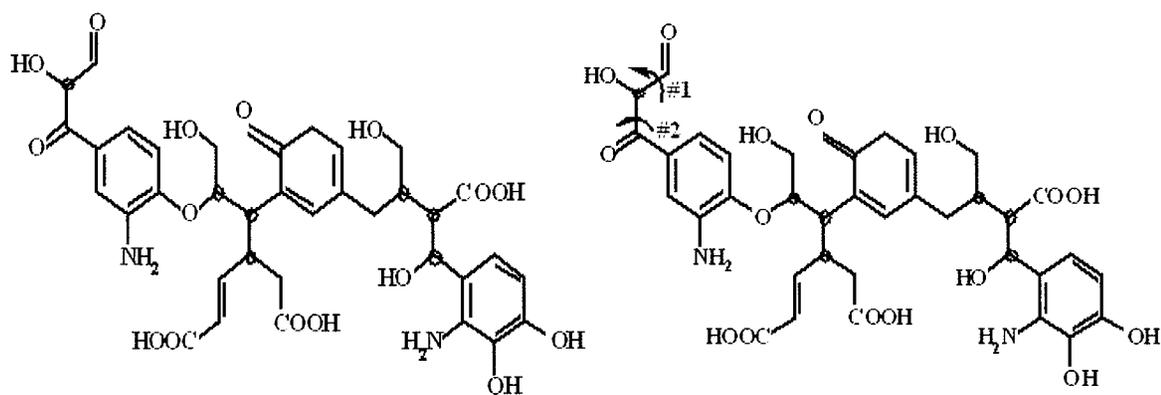


Figure I.2(10)

Structure moléculaire d'un monomère d'acide humique avec sa variation de conformation autour d'un centre chiral (Sein et al., 1999).

d) Structure supramoléculaire selon Piccolo et al.

Enfin, les études les plus récentes (Conte et Piccolo, 1999 ; Piccolo, 2001) rejoignant les théories de Schnitzer et Khan, 1978, et Wershaw, 1986, ont suggéré que les substances humiques extraites de sols n'avaient en fait pas de structure « macropolymère », mais plutôt supramoléculaire. D'après ces auteurs, cette structure serait révélée à pH neutre. A ce pH, la présence de petites molécules hétérogènes (< 1 000 Da), assemblées par des forces faibles (Van der Waals, π - π et liaisons CH- π) au sein de conformations de taille moléculaire apparemment plus grandes, aurait été décelée.

En effet, cette « superstructure » formée d'assemblages moléculaires plus petits est aisément dissociable en présence d'acides organiques (Piccolo et al., 1992). Les études ont été réalisées en chromatographie d'exclusion stérique, résonance magnétique nucléaire, pyrolyse couplée à la chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse à électroionisation. Ces résultats ne vont pas à l'encontre des anciennes représentations des substances humiques, car la conformation supramoléculaire peut effectivement être stabilisée en une structure polymère « vraie », mais cette pseudo-phase d'équilibre ne serait qu'une vue de l'esprit. Cela a été démontré par l'augmentation de la taille moléculaire (HPSEC) de matériaux humiques soumis à une réaction oxydative catalysée par une enzyme de type peroxydase (Piccolo et al., 2000).

Cette compréhension innovante de la chimie des substances humiques peut être également utilisée pour comprendre la stabilisation de composés organiques rentrant dans les structures par des forces d'interaction et par des réactions de polymérisation *in situ*.

I.3. La matière organique et ses interactions avec les micropolluants anthropiques

Il s'agit de définir le lien entre les propriétés physico-chimiques des substances humiques et les interactions avec les polluants du milieu.

Les composés organiques rencontrés dans les eaux naturelles peuvent donc être définis selon leurs propriétés chimiques. Ce sont des électrolytes qui interviennent dans les réactions acido-basiques, la formation de complexes métalliques et la régulation des activités des ions métalliques libres. Ils peuvent également jouer le rôle de réducteurs (donneurs d'électrons) dans les cycles biochimiques et dans le cycle du carbone. Ces groupements fonctionnels peuvent agir comme des ligands et jouent un rôle important dans la complexation, le transport ou l'immobilisation des polluants. La présence de nombreux groupements à atomes d'oxygène ou d'azote, augmente la probabilité de formation de liaison hydrogène avec les espèces chimiques présentant des groupements chimiques complémentaires, bien qu'il y ait une forte compétition pour ces sites avec les molécules d'eau. Des pesticides acides, tels que les acides chlorophénoxyalkanoïques et les esters, peuvent être adsorbés par liaison hydrogène sur des substances humiques à des valeurs de pH inférieures aux pK_A résultant des groupements $-COOH$ ou $-COOR$.

La diversité des groupements fonctionnels présents dans les substances humiques engendre une grande variété de réactions avec les groupements réactifs des polluants organiques. Ces réactions provoquent la formation d'une liaison covalente avec incorporation du polluant, ou le plus souvent, des produits et sous-produits de dégradation, dans la structure macromoléculaire des substances humiques. Les différentes propriétés chimiques du polluant organique, telles celles données dans le Tableau I.3(1), donneront plusieurs possibilités de mécanisme de rétention pour les polluants et peuvent aboutir à des combinaisons des différents types de liaisons. La molécule organique peut être initialement adsorbée sur des sites de haute énergie, avec une liaison forte, suivie d'une adsorption sur des sites de plus en plus faibles en énergie au fur et à mesure que les sites de forte énergie sont occupés. Une fois adsorbé, le polluant peut subir d'autres processus affectant la fixation. Par exemple, certains polluants peuvent réagir davantage pour devenir liés de manière covalente et irréversible, alors que d'autres peuvent être simplement piégés physiquement dans la matrice humique. Les processus peuvent donc varier du réversible à l'irréversible, c'est-à-dire que le polluant peut être libéré facilement ou libéré avec différents degrés de difficulté, ou ne pas être libéré du tout.

Le Tableau I.3(1) résume l'ensemble de ces propriétés et leur rôle sur les mécanismes d'interaction avec les polluants.

Tableau I.3(1)
Résumé des problèmes inhérents à la présence de matière organique dans l'eau
(Malleval, 1993).

MACROMOLECULES	PROBLEMES « Séquestration »	Croissance bactérienne	Compétition dans l'élimination des micropolluants ou microorganismes	
			Procédé d'adsorption	Oxydation/procédés de désinfection
Protéines	+	+++	+	+
Polyhydroxyaromatiques	+++	+	++	++
Polysaccharides	0	+	+ ?	0
Amino sucres	0	?	?	?

Le transport de la matière organique est contrôlé à la fois par des facteurs chimiques reliés à la fixation des molécules naturelles ou xénobiotiques sur des surfaces immobiles (sédiments) et par des facteurs hydrologiques qui déterminent le flux aqueux. On peut donc décrire le transport de la matière organique comme un système à deux phases, une phase immobile et une phase mobile (Figure I.3(1)).

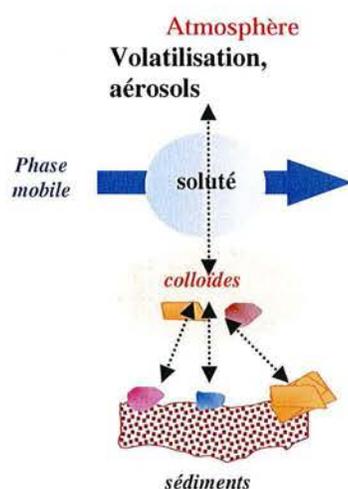


Figure I.3(1)
Distribution des polluants entre les compartiments
air, eau, colloïdal et sédimentaire (Hayes et al., 1989).

Les molécules organiques de faible solubilité et celles présentant une forte affinité pour les surfaces minérales chargées ou encore pour les substances organiques adsorbées sur ces surfaces minérales sont généralement considérées comme relativement immobiles (Hayes et al., 1989). Cette proposition est justifiée dans le cas où la concentration en matière organique naturelle est faible, car dans ce cas, il n'y a pas de colloïdes minéraux stables dans la phase mobile. Cependant, la présence de matière organique naturelle dissoute ou en suspension, qui entre en compétition avec les surfaces des sédiments, augmente la solubilité apparente des polluants organiques dans la phase mobile et favorise ainsi la mobilité des polluants organiques.

L'influence de la matière organique naturelle sur le transport des molécules organiques xénobiotiques et des polluants métalliques dépend de plusieurs facteurs. Il faut tout d'abord évaluer la partition des espèces chimiques polluantes entre les différents compartiments : solide, aqueux et phase organique naturelle. Il faut donc évaluer l'affinité du polluant pour la matière organique naturelle. Ensuite, en second point, il faut définir la mobilité de la matière organique naturelle, les distances effectivement parcourues. La matière organique naturelle conserve la capacité de s'adsorber sur les surfaces minérales des sédiments et des colloïdes minéraux. Dans le premier cas, elle augmente la capacité d'adsorption de la phase immobile en augmentant la teneur en carbone organique. Dans le second, elle stabilise les agrégats colloïdaux.

I.3.1. Revue bibliographique des méthodes de caractérisation des interactions entre la matière organique et les micropolluants pour les trois compartiments du milieu (dissous, colloïdal et particulaire)

Le développement de **techniques spectroscopiques**, telles que la RMN (Laor et al., 1998) ou la spectrométrie infra-rouge à transformée de Fourier (Piccolo et Celano, 1994), a permis de mettre en évidence les différents processus d'interaction entre la matière organique naturelle et les polluants, allant de la fixation sur un site d'adsorption à la vraie partition entre les phases aqueuses, organiques et minérales tridimensionnelles.

Les études complètes, concernant les interactions de polluants avec la MON dans les trois compartiments du milieu, sont relativement peu abondantes, seules des études régionales de spéciation des polluants dans les compartiments du milieu ont été réalisées (Delon et al., 1996 ; Bardot et al., 2001). Lick et Rapacka, 1996, ont ainsi évalué grâce à des

analyses quantitatives les dynamiques de sorption de trois dérivés de polychlorobiphényles et d'hexachlorobenzène sur la MON particulaire, dissoute et colloïdale. Karapanagioti et al., 1999, ont également étudié la sorption du phénanthrène sur la MON de ces trois compartiments pour un milieu aquifère grâce à des séparations granulométriques. Enfin, Cox et al., 2000, ont étudié la répartition entre la simazine et le 2,4-D par rapport aux compartiments organiques dissous et particulaire.

Concernant le **compartiment sédimentaire** du milieu, la plupart des études réalisées jusqu'à aujourd'hui a utilisé des isothermes d'adsorption/désorption en présence des phases majoritaires du milieu. Hwang et Cutright, 2002, ont encore récemment décrit l'égale importance du rôle de la MON et des matériaux minéraux (argiles notamment) dans les mécanismes de sorption des polluants. Cette méthode de mise en évidence des associations passe par le calcul de coefficients de partage eau/sol pour les polluants. La technique de RMN ^{13}C (Huang et al., 1998 ; Weber et al., 1999) a permis d'approfondir les données d'adsorption et de mieux appréhender les mécanismes en présence. Ce sont les HAPs, dosés par chromatographie liquide haute performance (Huang et al., 1998) ou encore par des mesures de fluorescence dans le surnageant (Hwang et Cutright, 2002), qui ont fait l'objet des plus nombreuses études.

Les travaux réalisés avec des systèmes tensio-actifs seuls sont relativement moins abondants. Par contre, Haigh, 1996, ainsi que Fox et al., 1997, ont étudié l'influence de la présence de tensio-actifs (dérivés linéaires d'alkylbenzène sulfonate ASL et d'alcool éthoxylé AEL) sur la sorption du 2,4-D (pesticide) sur des particules de sols de différents teneurs en matière organique.

La chromatographie liquide (haute performance et en phase inverse) a permis la détermination de coefficients de partage sols/eau pour plusieurs types de polluant : Szabo et al., 1999, ont ainsi étudié l'atrazine, le diuron, l'isoproturon, le nitrobenzène, des dérivés de phtalate et d'aniline, le fluoranthène, le phénanthrène et le pyrène et ont obtenu de très bonnes corrélations avec les données reportées dans la littérature pour des valeurs déterminées par des mesures d'adsorption/désorption.

Le Tableau I.3(2) résume les principales études réalisées sur ce compartiment.

*Tableau I.3(2)
Récapitulatif des études concernant les interactions MO-polluants
du compartiment sédimentaire.*

Matrice	Polluants	Technique d'investigation	Référence
Sédiments naturels	HAP Pyrène, naphtalène, anthracène, phénanthrène, tétracène, benzène	Isothermes d'adsorption	Karickhoff et al., 1979
Calcite-montmorillonite-AH	Pyrène, anthracène	Isothermes d'adsorption	Onken et Traina, 1997
Goethite- hématite- montmorillonite (Ca ²⁺ et Cu ²⁺)-AH	Phénanthrène	Isothermes d'adsorption + Quenching de fluorescence RMN/ calorimétrie	Laor et al., 1998 Weber et al., 1999
Goudron-argile	Pyrène, naphtalène, anthracène, phénanthrène, tétracène, benzène	Chromatographie à ionisation de flamme	Ghosh et al., 2000 Bayard et al., 2000
	TENSIO-ACTIFS		
Particules aquatiques Sédimentaires	Nonylphénol, octylphénol et nonylphénol- monoéthoxylé	Isothermes d'adsorption	Isobe et al., 2001
Biotite	Chlorure de tétradécylammonium	Isothermes d'adsorption	Cases et al., 2002
	HERBICIDES/ PESTICIDES		
Sédiments naturels	Chloro-s-triazines, Dinitroanilines	Isothermes d'adsorption	Brown et Flagg, 1981
Particules d'eau d'estuaire	Perméthrin et dérivés de phtalate	Isothermes d'adsorption	Zhou et Rowland, 1997
Particules de sol riches en Carbone	Alachlor	Isothermes d'adsorption	Guo et al., 1993
Argiles organiques- fractions peptidiques, glucosidiques, tanniques et humiques	Atrazine	Isothermes d'adsorption	Bottero et al., 1994a Khatib, 1994 Célis et al., 1998

Pour l'étude des interactions dans le **compartiment dissous** du milieu, les techniques analytiques employées sont beaucoup plus diversifiées. Cette hétérogénéité des techniques fait apparaître la complexité des séparations mises en œuvre et des interprétations données par les différents auteurs.

Le Tableau I.3(3) récapitule les polluants qui ont été étudiés en présence d'acides humiques extraits de sols.

*Tableau I.3(3)
Récapitulatif des études concernant les interactions MO-polluants
du compartiment dissous.*

Polluant	Technique d'investigation	Référence
HERBICIDES atrazine 2,4,5 trichlorophénol glyphosate simazine et atrazine fenuron	^{14}C ^{14}C IR après lyophilisation Résonance électronique de spin + IR Fluorescence + chromato. exclusion stérique	Bertin et al., 1991 Khatib, 1994 Piccolo et Celano, 1994 Senesi et al., 1995 Richard et al., 2002
HPA pyrène	Hydrolyse à haute température sur les résidus/dosage par CG/SM Osmose inverse Extraction sur phase solide Fluorescence + chromato. exclusion stérique Fluorescence	Richnow et al., 1997 Peuravuori, 2001 Xing, 2001 Persson et al., 2002 Ganaye et al., 1997 Kazpard, 2001

Sur le compartiment dissous du milieu, nous constatons donc que la plupart des études réalisées passe par des préparations d'échantillons pouvant fortement affecter la nature des interactions ou des méthodes d'étude destructrices pour la matière organique ou encore nécessitant des concentrations de travail en matière organique et/ou en polluants suffisamment élevées et étant donc inadaptées pour une étude aux concentrations du milieu aquatique.

Pour notre étude, nous avons dans un premier temps porté notre choix sur la méthode de spectrofluorimétrie, présentant de nombreux avantages pour l'étude des interactions MON/polluants dans le compartiment dissous. D'une grande sensibilité, elle permettrait d'étudier les interactions de façon directe, sans préparation pré-analytique particulière et aux concentrations du milieu aquatique naturel.

I.3.2. Revue bibliographique des méthodes de fluorescence d'intérêt pour la caractérisation de la matière organique dissoute, l'organisation macromoléculaire et la mise en évidence des interactions avec les micropolluants anthropiques en solution aqueuse

La fluorescence a été utilisée pour de nombreux travaux de recherche en science du sol comme moyen de distinguer différents types de matière organique, toutefois souvent sans grand succès. Les spectres enregistrés en simple excitation ou émission de fluorescence sont généralement larges et non significatifs. Des pics plus caractéristiques ont pu être obtenus grâce à la technique d'émission synchrone (Senesi et al., 1991 ; Miano et Senesi, 1992), mais ces spectres sont souvent modifiés par l'effet de diffusion Raman. Pour l'étude des interactions matière organique-pesticides, Spark et Swift, 1994, ont montré que les mécanismes d'interactions dépendaient fortement de la longueur d'onde d'excitation utilisée.

Il est reconnu que plusieurs fluorophores, difficilement isolables, composent les spectres de fluorescence des molécules humiques (Aguer, 1995). Comme les molécules humiques sont des systèmes multi-chromophoriques, leur comportement de fluorescence diffère de façon importante des spectres classiques de molécules fluorescentes plus simples. En particulier, la longueur d'onde du maximum d'émission de fluorescence dépend de la longueur d'onde d'excitation. Par ailleurs, l'interprétation des spectres de fluorescence est rendue plus complexe par les phénomènes de transferts d'énergie photophysiques et d'absorption des espèces en présence. L'enregistrement classique de spectres de fluorescence peut donc conduire à des résultats non représentatifs pour les molécules organiques étudiées.

Cependant, sous certaines conditions de mesure, la technique de fluorescence, par sa sensibilité et son caractère non destructif, se prête à l'étude des interactions entre la matière organique dissoute et les polluants. La mesure de la fluorescence intrinsèque des substances humiques contient notamment les informations relatives à leur structure, à leur conformation et prend en compte l'hétérogénéité des substances humiques en terme de propriétés photophysiques dynamiques et des possibilités d'interactions inter- et intramoléculaires de ces substances et permet des mesures de polarité (Leenheer et al., 1989 ; Lochmuller et Saavedra, 1986 dans Mobed et Hemmingsen, 1996).

Enfin, la technique plus récente de fluorescence en mode d'enregistrement excitation-émission permet une représentation cartographique de l'empreinte des différents types de chromophores et phénomènes photophysiques intervenant dans le processus radiatif.

1.3.2.1. Caractérisation des molécules organiques naturelles

a) Caractérisation des spectres de fluorescence et corrélations avec la chimie moléculaire

Pour leur étude par fluorescence d'AH et d'AF extraits de sol, les premiers travaux de Seal et al., 1964, cités par Choudry, 1984, ont montré que le signal de fluorescence pouvait s'interpréter par la présence de noyaux aromatiques substitués par au moins un groupe électro-donneur ou par un système conjugué insaturé capable d'un haut degré de résonance.

Puis Datta et al., 1971, ont montré que la fluorescence de composés humiques et fulviques sous forme sodique présentait un maximum de fluorescence à 470 nm en solution aqueuse et que cette valeur restait inchangée pour les résidus obtenus après une hydrolyse en présence d'HCl 6 N. Ces auteurs en ont déduit que les fluorophores ne provenaient pas de dérivés des parties acides aminés des substances humiques, susceptibles d'être détruits par hydrolyse.

Pour chaque fluorophore présent dans les AH, il existe de nombreux chromophores non fluorescents (Matthews, 1996). Cela est confirmé par le faible rendement quantique de fluorescence des AH (typiquement 1%, défini par rapport à la référence sulfate de quinine, d'après la méthode de Belin et al., 1993) et par une absence de superposition du spectre d'excitation et d'absorption des AH. L'effet d'autoinhibition (ou de filtre interne) pour lequel la fluorescence observée décroît aux teneurs élevées en AH s'explique par la présence de ces chromophores non fluorescents.

Si la concentration en substances humiques change, l'émission relative de fluorescence change, ce phénomène résulte des processus de transferts d'énergie radiatifs et non radiatifs et du quenching dynamique (Matthews, 1996).

Par la suite, la technique d'excitation-émission matricielle (EEM) en représentation tridimensionnelle a été essentiellement utilisée pour caractériser la fluorescence intrinsèque de substances humiques. Pour des substances humiques provenant de la Société Internationale des Substances Humiques (IHSS), Mobed et Hemmingsen, 1996, ont ainsi fait la distinction entre des substances humiques à caractère plutôt pédogénique (provenant des sols) d'autres substances humiques aquagéniques (dérivant directement du milieu aquatique).

Matthews, 1996, ont déterminé une position de 485 nm +/- 10 nm pour le maximum d'émission de fluorescence de différents acides humiques extraits de coraux, constante obtenue pour tous les échantillons étudiés. Ce **maximum** serait en réalité composé de 2 pics d'après ces mêmes auteurs : **310/430 et 340/450 nm** en longueur d'onde d'excitation et d'émission respectivement. Ces résultats sont cohérents avec les travaux de Mopper et

Schultz, 1993, qui ont trouvé un maximum de fluorescence à 350/450 nm et un massif secondaire à 310/440 nm pour des échantillons marins. Coble, 1996, n'a mentionné qu'un seul massif dans la région 340/(420-450) nm, mais Mopper et Schultz, 1993, l'ont placé à 310/(420-450) nm. Sierra et al., 2001, ont proposé un modèle bichromophorique pour les AH extraits de MON marines avec 2 pics à 310/440 nm et à 340/500 nm. Belin et al., 1993, ont attribué la fluorescence du massif 313/426 nm aux substances hydrophiles des AH contenant les acides aminés, les sucres et les acides carboxyliques et qui pourrait contribuer au signal de fluorescence des eaux naturelles de surface jusqu'à 35%. Les AH commerciaux d'Aldrich et de Fluka montrent quant à eux des massifs aux alentours de **480/540 nm**. Des valeurs aussi faibles en énergie seraient plus représentatives de la fluorescence **d'AH terrestres (dérivés de la lignine)**.

Il est à mentionner que seulement trois acides aminés constitutifs des protéines sont fluorescents : il s'agit des composés aromatiques suivants : la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. Seul le **tryptophane** explique la fluorescence observée à **280/350 nm** sur les spectres de MON. Il a été suggéré par Matthews, 1996, que la fluorescence de ce massif était directement liée à l'activité phytoplanctonique des eaux de surface, pour lesquelles la fluorescence des AH peut être atténuée par des processus photochimiques dus à l'éclairement naturel.

Grâce à des études réalisées en parallèle sur le développement d'algues vertes, Parlanti et al., 2000, ont démontré que la composante β (310-320/380-410 nm) des matrices d'EEM collectées pour des eaux côtières permettait d'évaluer qualitativement et quantitativement l'activité biologique d'une zone soumise à l'activité anthropique. Ces mêmes auteurs sont allés jusqu'à distinguer 5 composantes chromophoriques pour des eaux côtières soumises à l'activité anthropique (Figure I.3(2) et Tableau I.3(4)).

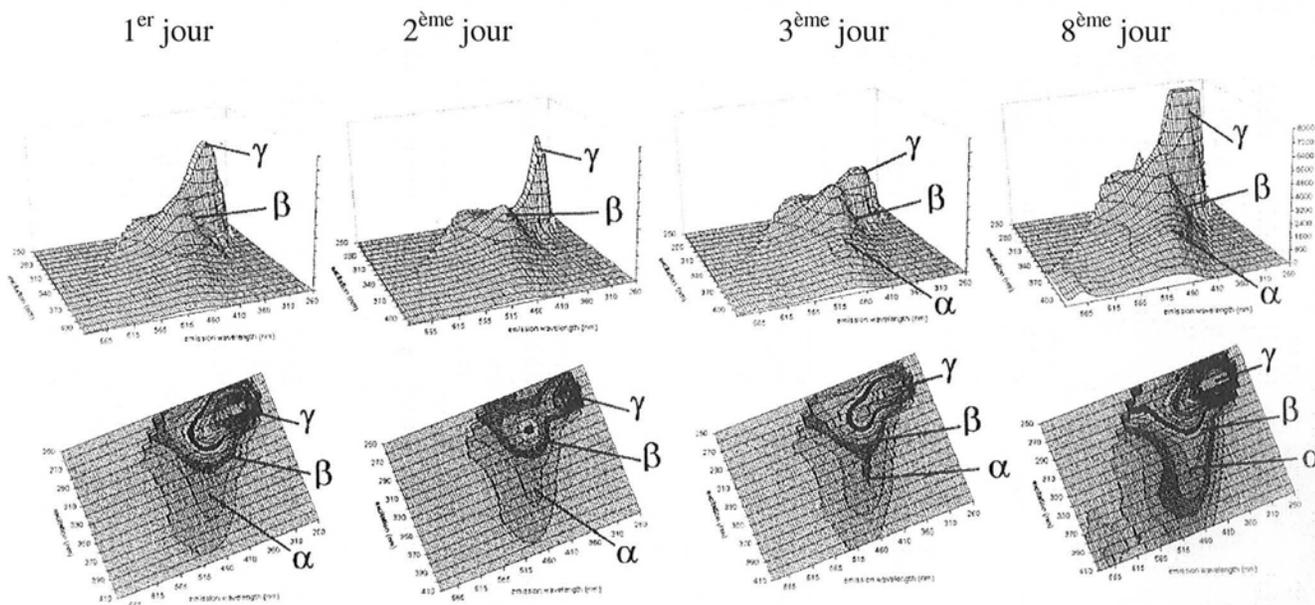


Figure I.3(2)

Evolution de la dégradation de la fluorescence d'une zone côtière soumise à une activité anthropique (décomposition d'algues vertes au 1^{er}, 2^{ème}, 3^{ème} et 8^{ème} jour) (Parlanti et al., 2000).

Tableau I.3(4)

Récapitulatif des principaux domaines de fluorescence de la MO suivant les différentes attributions données par les auteurs selon son origine.

Type de MO ou origine	Pic 1 ($\lambda_{\text{ex max}} / \lambda_{\text{em max}}$) nm	Pic 2 ($\lambda_{\text{ex max}} / \lambda_{\text{em max}}$) nm	Nom	Référence
Humique	250-260 / 380-430		α' ou A	Parlanti et al., 2000 ou Coble, 1996
Humique		330-350 / 420-480	α ou C	Parlanti et al., 2000 ou Coble, 1996
Humique marin	310-320 / 380-420		β ou M	Parlanti et al., 2000 ou Coble, 1996
Tyrosine ou protéine	270-280 / 300-320		γ ou B	Parlanti et al., 2000 ou Coble, 1996
Tryptophane, protéine ou phénol	270-280 / 320-350		δ ou T	Parlanti et al., 2000 ou Coble, 1996
MO de coraux	310 / 430	340 / 450	-	Matthews et al., 1996
MO eau de mer	310 / 430 310 / 420-450 310 / 420-440	- -	-	Mopper et Schultz, 1993 Sierra, 2001
Substances hydrophiles	313 / 426	-	-	Belin et al., 1993
Humique commercial ou Humique terrestre	-	480 / 540	-	Belin et al., 1993
Fulvique fleuve Amazone	260 / 445	-	A	Mounier et al., 1999
Humique fleuve Amazone	-	330 / 445	C	Mounier et al., 1999

b) Distinction de différentes fractions de substances humiques : indices d'humification et d'hydrophobie

Mounier et al., 1999, ont distingué différentes fractions extraites d'eau du fleuve Amazone par les valeurs du rapport $r_{a,c}$ des intensités des 2 mêmes **fluorophores A (260/445 nm) et C (330/445 nm)**. Les résultats ont montré que les espèces fluorescentes provenant d'eaux riches en matériel humique sont préférentiellement retenues par le seuil de coupure de 5 kDa (type humique C, de masse moléculaire plus élevée que les composés fluorescents de type A). Les composés de types A et C sont par contre présents dans toutes les fractions de taille (particulaire 0,22 μ m, colloïdal 100 kDa et dissoute < 5 kDa).

D'après ces mêmes auteurs, les composés de types A et C auraient des caractéristiques les rapprochant respectivement des acides fulviques et humiques.

La mesure de la fluorescence des AH dans le temps (Lead et al., 2000) a permis de déterminer des **coefficients de diffusion** pour différentes molécules organiques de type humique et fulvique : les valeurs trouvées sont plus importantes pour les secondes. Une diminution des coefficients de diffusion a été constatée par ces mêmes auteurs aux pH acides, indiquant un plus faible degré d'agrégation des molécules entre elles.

D'une manière générale, en ce qui concerne l'**intensité** du signal de fluorescence, les AF ont un signal plus intense que les AH (Lévesque, 1972, cité par Choudry, 1984). Cela a été attribué aux structures aromatiques hautement substituées des AH, aux possibilités de liaison inter- et intramoléculaires ou à l'auto-quenching des AH en solution. Belin et al., 1993, ont établi la relation suivante : un **rendement quantique** faible et un maximum d'émission de fluorescence de longueur d'onde élevée se corrèlent bien avec un poids moléculaire élevé d'AH. A l'inverse, les AH de poids moléculaires les plus faibles ont ainsi un rendement de fluorescence plus important et un maximum d'émission de fluorescence à des courtes longueurs d'onde.

Par ailleurs, les acides humiques ont un **maximum** de fluorescence à des valeurs de longueur d'onde plus grandes en excitation et en émission que les acides fulviques correspondants, Mobed et Hemmingsen, 1996. Ce déplacement vers le « rouge » des spectres des AH par rapport à ceux des AF s'explique par la présence de plus nombreuses fractions de poids moléculaires élevés dans les AH ainsi que par la présence de groupes substituants accepteurs d'électrons et par un degré de conjugaison plus élevé (Mobed et Hemmingsen, 1996). La présence de groupes électro-donneurs dans les structures de types AF contribue au déplacement du pic du maximum de fluorescence à des longueurs d'onde plus courtes que celui des AH.

Fang et al., 1998, en se basant sur le travail de Taylor et al., 1993, ont introduit un **indice d'hydrophobie** de la MON défini par le rapport des intensités de fluorescence à 395 nm et à 350 nm obtenues en mode synchrone (Figure I.3(3)). En effet, ces auteurs ont attribué le pic à 350 nm aux composés fulviques et celui à 395 nm aux composés humiques. Comme les acides fulviques sont généralement plus hydrophiles que les acides humiques, plus le ratio ainsi défini est important, plus grande sera l'hydrophobie de l'échantillon mesuré.

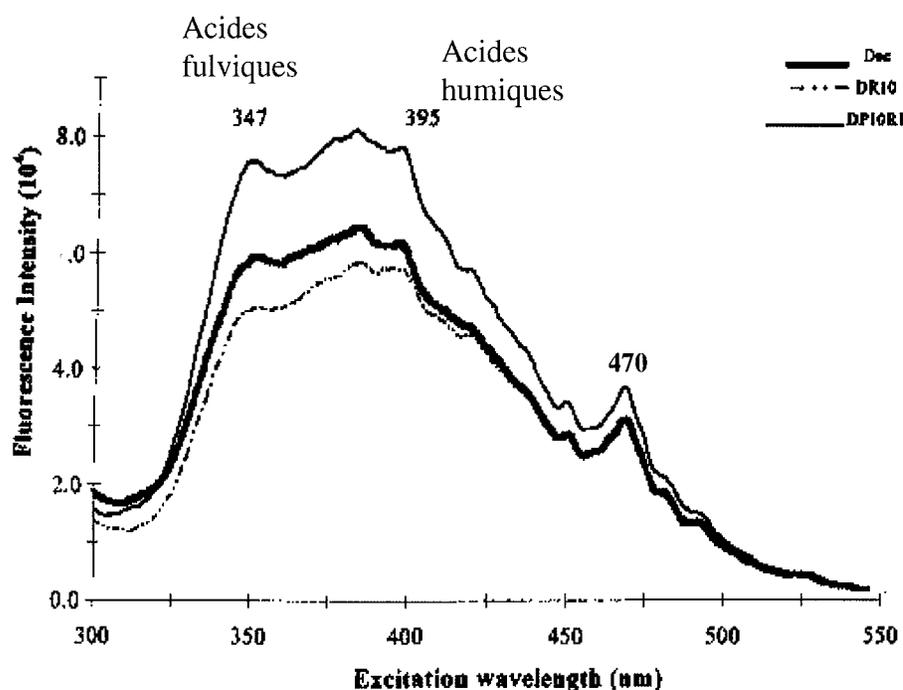


Figure I.3(3)
Détermination de l'indice d'hydrophobie (Taylor et al., 1993).

Zsolnay et al., 1999, ont introduit un **indice d'humification (HI)** défini comme le rapport des aires de fluorescence intégrées sur [300-345] nm par rapport à [435-480] nm (sous la courbe de fluorescence comme montré sur la Figure I.3(4)). En corrélant ces indices d'humification avec les valeurs des intensités de fluorescence normalisées au COD, ils ont pu distinguer plusieurs groupes de substances organiques extraites de sols : les acides humiques issus de la biomasse et plus condensés en terme d'aromaticité sont ceux possédant les HI les plus élevés.

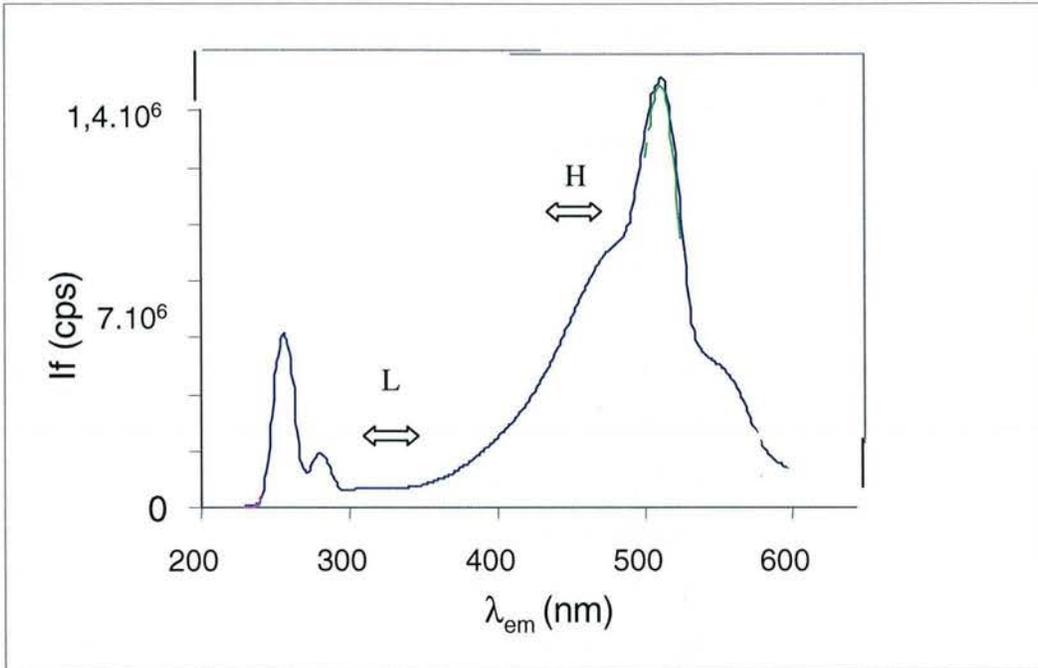


Figure I.3(4)
 Détermination de l'indice d'humification HI pour un acide humique
 $HI = H/L$ (rapports des aires L : [330-345] nm et H : [435-480] nm)
 (Zolsnay et al., 1999).

c) Que peut-on attendre de la fluorescence en milieu naturel ?

Le suivi par fluorescence de la matière organique dissoute a très souvent été utilisé pour distinguer la provenance d'eaux de différentes sources (Mopper et Schultz, 1993 ; Coble, 1996 ; Matthews, 1996), pour suivre la distribution de masses d'eau (Cabaniss et Schumann, 1987 ; Chen et Bada, 1992) ou également pour suivre le processus de mélange des eaux entre des flux d'origine côtière et marine à l'estuaire (Berger et al., 1984 ; Laane et Kramer, 1990 ; De Souza Sierra et al., 1997).

Récemment, la technique a été utilisée en recherche océanographique pour étudier la MON marine (Mopper et Schultz, 1993 ; Coble, 1996). La variabilité des spectres EEM indique clairement que la MON marine contient plusieurs types de chromophores, en particulier les fluorophores de types protéines et de type humique en différentes proportions.

Provenance d'eaux de différentes sources

Coble, 1996, a travaillé sur le rapport entre le **pic de fluorescence d'excitation UV** ou **pic A** (260 nm) et le **pic d'excitation « visible »⁵** ou **pic C** (300-370 nm) de différents acides humiques terrestres ou marins. Il a démontré que, pour tous les échantillons, les positions du maximum de fluorescence en longueurs d'onde d'excitation et en émission dépendaient de la longueur d'onde d'observation. Un déplacement vers les plus grandes longueurs d'onde d'émission est constaté si la longueur d'onde d'excitation augmente et vers les plus grandes longueurs d'onde d'excitation si la longueur d'onde d'émission augmente. Le rapport $\lambda_{\text{ex max}}/\lambda_{\text{em max}}$ **du pic C**, calculé de manière à s'affranchir des conditions d'acquisition en longueur d'onde, a permis de confirmer la différence de comportement spectral pour les différents types d'eau : pour les échantillons marins, ce rapport est maximum aux courtes longueurs d'onde d'excitation et d'émission contrairement aux échantillons d'eau douce⁶.

De Souza Sierra et al., 2000, ont montré que les propriétés de fluorescence d'eaux d'infiltration proches de zones d'estuaire étaient les mêmes que celles d'AF extraits de sédiments marins, cela confirmant la prédominance de ces molécules dans l'eau brute de mer. Le faible déplacement vers le bleu de la longueur d'onde du maximum d'émission pourrait indiquer que dans les eaux d'estuaires, comme dans les eaux de rivière, la fluorescence des substances humiques peut être masquée par des composés de faible poids moléculaire comme les substances hydrophiles.

Suivi du mélange des eaux

De Souza Sierra et al., 1997, ont pu distinguer par fluorescence la contribution des fluorophores marins de ceux d'eau de rivière (Gironde) lors du processus de mélange des eaux à l'estuaire. Un **indice d'efficacité apparente de fluorescence** est défini comme le rapport entre les intensités de fluorescence intégrée et calibrée pour des échantillons filtrés à 0,45 μm et la valeur d'absorbance des mêmes solutions prise à la longueur d'onde d'excitation de fluorescence (313 nm). Cet indice a été utilisé auparavant par Donard et al., 1989. Les valeurs d'émission de fluorescence obtenues pour cette longueur d'onde d'excitation étaient respectivement de 438 nm pour l'eau douce et de 400 nm pour l'eau de mer. Les résultats obtenus au laboratoire pour des échantillons synthétiques, préparés

⁵ N'appartient pas au domaine visible stricto sensu qui se situe au-delà de 400 nm, mais s'en rapproche en comparaison du pic A.

⁶ Les positions moyennes données pour les maxima pour les différents échantillons sont donnés dans le tableau récapitulatif I.3(5).

à différents taux de salinité, ont confirmé ce déplacement de 40 nm environ entre les deux types d'eau. Outre la différence de nature des chromophores, ces écarts pourraient s'expliquer par une perte de molécules de poids moléculaires les plus élevés provenant des eaux douces lors du processus de mélange des eaux.

Corrélations envisageables

Christman et Ghassemi, 1966, cités dans Choudry, 1984, ont été les premiers à montrer l'existence d'une relation de linéarité entre la **coloration** des solutions de substances humiques et leur intensité de fluorescence et ont noté qu'il n'y avait pas de déplacement de la longueur d'onde du **maximum** de fluorescence (centré à 490 nm) lors de l'ajout de base ou d'acide, alors que l'intensité de fluorescence était dépendante du pH.

Plus récemment, d'autres corrélations mentionnées ci-dessous ont été établies en sciences environnementales entre les mesures de fluorescence et certains paramètres physico-chimiques fondamentaux du milieu.

Teneurs en sels

Des études en océanographie (Chen et Bada, 1992) ont montré l'existence d'une relation de linéarité entre les intensités de fluorescence d'échantillons d'eau récoltés à des profondeurs moyennes de quelques centaines de mètres avec les teneurs en nitrates et nitrites d'une part et avec celle en phosphate d'autre part. Ce résultat suggérerait la possibilité de régénération ou de formation de molécules fluorescentes lors de l'oxydation et de la reminéralisation des particules organiques en suspension.

Carbone Organique Dissous

Buffle et al., 1982, ont été les premiers après Smart et al., 1976, à évoquer la possibilité de corrélérer des mesures de fluorescence et de COD dans les eaux de surface. Ils ont constaté une rupture dans l'évolution des longueurs d'onde d'excitation et d'émission du maximum de fluorescence au-delà de 100 mg/L de COD (Figure I.3(5)). En dessous de cette teneur, les valeurs de longueur d'onde restent sensiblement constantes pour tous les échantillons étudiés, alors qu'elles augmentent toutes les deux de façon parallèle aux plus grandes teneurs de COD. Ces résultats ont été interprétés comme l'auto-association des molécules fulviques modifiant ainsi les propriétés du signal de fluorescence mesuré. De même, ces auteurs ont constaté une nette diminution de la largeur à mi-hauteur du pic d'émission de fluorescence au-delà de 100 mg/L. Au-delà de 30 mg/L, les valeurs des

intensités de fluorescence tendent vers un pallier. De bonnes correspondances entre les valeurs de $\lambda_{em\ max}$, $\lambda_{ex\ max}$ et $\Delta\lambda$ de composés de référence (acide salicylique et dérivés de naphthalène) avec celles des AF ont été trouvées. En revanche, le calcul du rapport de l'intensité du maximum de fluorescence sur la teneur en COD des échantillons présente une plage de variations beaucoup plus étendue que celle mesurée pour des échantillons naturels (Tableau I.3(5)).

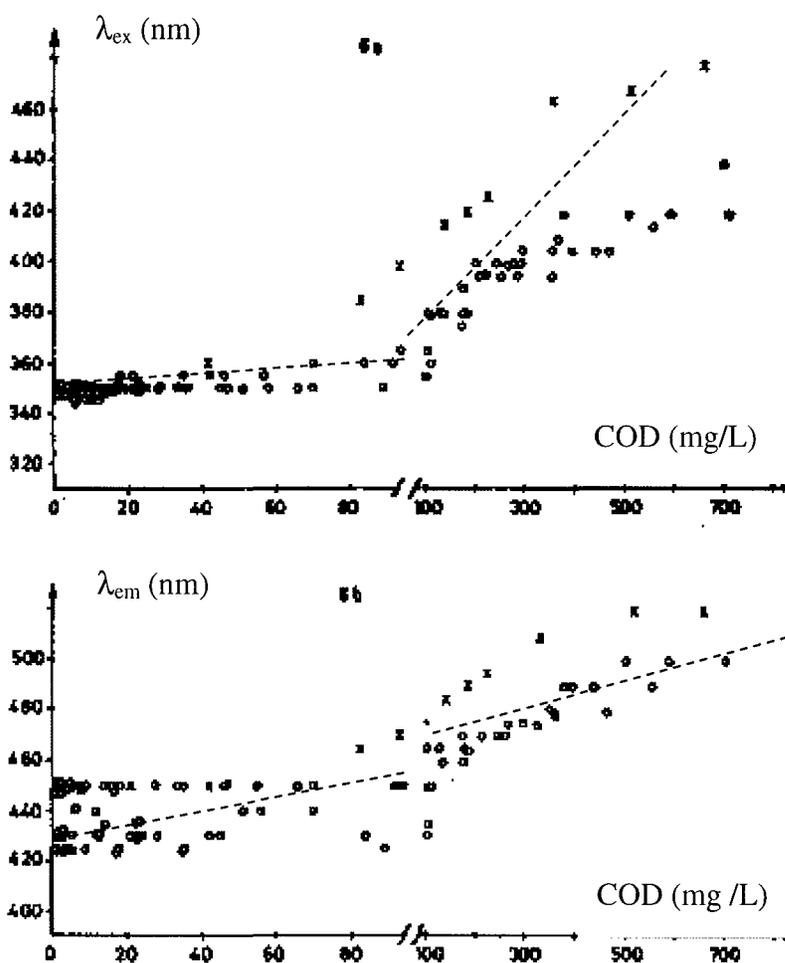


Figure I.3(5)
 Evolution des intensités de fluorescence à l'excitation et à l'émission
 pour différentes valeurs en COD (Buffle et al., 1982).

Tableau I.3(5)
 Identification de composés de référence (Buffle et al., 1982).

Composé	$\lambda_{\text{ex max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	I_f / COD (g/L)
Phénol	274	296	35	1020
Acide benzoïque	-	-	-	0
Catéchol	280	310	45	350
Résorcine	277	303	41	660
Acide phtalique	-	-	-	0
Acide Téréphtalique	-	-	-	0
Acide Salicylique	302	402	60	8250
Acide 4-OH-benzoïque	269	333	42	50
Acide 3,4-di-OH-benzoïque	295	336	59	180
Acide 3,5-di-OH-benzoïque	302	351	60	490
Gaïacol	277	306	44	680
Acide vanillique	290	323	46	700
Acide syringique	284	333	57	210
1-naphtol	306	457	87	980
2-naphtol	327	348	50	5980
Acide 1-naphtoïque	312	385	72	170
Acide 2-naphtoïque	287	350	46	4980
Acide 1-naphtyl-acétique	287	330	35	4990
Acide 2-naphtyl-acétique	282	335	35	3130
1,3-di-OH-naphtalène	332	374	87	8900
Coumarine	327	375	78	20
1,2,10-tri-OH-anthracène	328	475	87	10

Belin et al., 1993, ont reconstitué le signal de fluorescence total en sommant les contributions des différentes fractions d'AH pondérées par les valeurs de COD leurs correspondant. Mopper et Schultz, 1993, ont évoqué la possibilité d'utiliser la fluorescence du centre protéinaire comme traceur du COD « bio-réactif » des eaux de surface.

Parlanti et al., 2000, estiment que la majeure partie du COD est composée de substances fluorescentes, mais cependant jamais en totalité. Il reste donc toujours une incertitude sur la possibilité de corrélation de l'intensité de fluorescence avec la teneur en COD. Par contre, afin de comparer les échantillons d'eau prélevés à différentes périodes et à différents points de l'estuaire, ces auteurs ont représenté les valeurs des intensités de fluorescence des composantes α , β et γ normalisées par rapport aux valeurs de COD trouvées,

ainsi que les ratios suivants : β/α , γ/α et γ/β . L'évolution dans l'espace et dans le temps entre ces ratios et les valeurs normalisées des intensités par rapport au COD sont similaires.

D'autres études plus récentes ont confirmé la linéarité entre les valeurs de fluorescence et celles du COD (jusqu'à des valeurs de 20 mg/L) pour des eaux d'infiltration de zone côtière (Sierra et al., 2001).

Carbone Organique Total (COT)

Mounier et al., 1999, ont corrélié les intensités des pics A et C de fluorescence d'eaux de fleuve avec les valeurs de COT et ont constaté l'absence de corrélation entre ces paramètres. Par contre, le rapport des intensités I_A/I_C des 2 pics A et C semble suivre une tendance inverse à celle du COT. La décroissance des valeurs de ce rapport pour les valeurs les plus fortes en COT obtenues pour des eaux naturelles, après concentration par ultrafiltration tangentielle, montre que le carbone organique retenu par les différents seuils de coupure peut contenir une forte proportion de fluorophores de type C et qu'ils sont également plus riches en carbone que les fluorophores de type A.

Demande Biologique en Oxygène sur 5 jours (DBO₅)

Reynolds et Ahmad, 1997, ont mis en évidence une relation de linéarité entre la DBO₅ d'une eau usée et l'intensité de fluorescence (280/340 nm) mesurée avec un spectrophotomètre classique équipé d'une lampe au Xénon. Ahmad et Reynolds, 1999, utilisent plutôt une corrélation de la DBO₅ avec l'intensité de fluorescence (248/440 nm) obtenue avec une source laser (excimère KrF). Ils ont en effet constaté la présence de trois bandes caractéristiques dans le spectre de fluorescence d'eaux usées centrées à 350 nm (bande principale), 390 et 430 nm. Après traitement de l'eau par digestion aérobie, une réduction importante de l'intensité du pic à 350 nm et dans une moindre mesure des deux autres bandes a été constatée. Les composés biodégradables ont donc été considérés comme responsables de la totalité du signal de fluorescence récolté dans cette étude. D'après ces mêmes auteurs, la relation entre la DBO₅ et l'intensité de fluorescence est valable spatialement et temporairement pour des fluorophores présents de façon uniforme dans le milieu, à des valeurs de pH comprises entre 3 et 7 et pour des températures de mesures de 10 à 80°C. En dehors de ces conditions de mesure, plus aucune relation de linéarité n'est envisageable.

Détection *in situ* des polluants fluorescents et applications industrielles

Baker, 2002, a suivi géographiquement les rejets d'une industrie papetière dans la rivière Park Burn (Royaume Uni). L'importance du pic de **fluorescence T (tryptophane)**, contribuant de façon majoritaire au COT, a été attribuée aux rejets de composés de type lignines et sucres relargués lors des opérations de pulpage et recyclage de la pâte à papier. Les cycles du procédé de recyclage ont ainsi pu être rigoureusement suivis par fluorescence.

Des études assez récentes (Jiji et Booksh, 1999) ont montré la possibilité de détermination *in situ* de polluants tels les pesticides (carbamate et carbofuran), leurs dérivés (1-naphtol) et des PAH (pyrène, anthracène et fluoranthène) jusqu'à des teneurs de l'ordre de quelques parties par milliards (ppb). Ils utilisent des programmes de calibration et de décomposition du signal en composantes factorielles.

Les avancées les plus récentes dans ce domaine vont dans le sens d'un couplage de la technique EEM avec des systèmes de détection laser par fibres optiques utilisables *in situ* (Pepper et al., 2002).

1.3.2.2. Etude des systèmes micellaires ou pseudo-micellaires : recherche d'organisations moléculaires en solution

Von Wandruska, 1992, a réalisé une étude bibliographique complète de l'utilisation de la spectroscopie de fluorescence pour les recherches de phase organisée en solution.

a) Utilisation de sondes de polarité

Systèmes polymères « chimiquement bien contrôlés »

La fluorescence permet de déterminer des **concentrations micellaires critiques** (CMC) grâce aux modifications des caractéristiques de certaines sondes de fluorescence lors de la formation des microdomaines des systèmes micellaires. Le pyrène a été la sonde de fluorescence la plus utilisée à cet effet, car les variations de son spectre d'émission de fluorescence étaient bien établies en fonction de la polarité du milieu environnant (Nakajima, 1976 ; Kalyanasundaram et Thomas, 1977 ; Dong et Winnik, 1982).

Cette méthode a ainsi permis de déterminer les concentrations micellaires d'agrégation de nombreux systèmes micellaires classiques tels le sodium dodécyl sulfate (SDS), le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB), le bromure de décyltriméthylammonium (DeTAB),

le chlorure de dodécyltriméthylammonium (DAC), le polyéthylèneoxy *p*-di-*tert*-butylphénoxy éther (triton X-100) (Kalyanasundaram et Thomas, 1976).

Anthony et Zana, 1994, ont utilisé le pyrène dans différents systèmes polymères de savons pour déterminer les **longueurs de chaîne carbonée** n'intervenant pas dans la formation des microdomaines hydrophobes.

D'autres sondes appartenant à la famille des HAP sont également mentionnées par Von Wandruska, 1992, et Ragle et al., 1997 : l'antracène (Weber et Teale, 1957 ; Sawicki et al., 1960) et ses dérivés (Tran et Fleet, 1988), le fluoranthène (Parker et al., 1964), le naphthalène (Hofstraat et al., 1988), et le phénanthrène (Weber et Teale, 1957 ; Sawicki et al., 1960 ; Laha et Luthy, 1992). Des travaux actuels s'intéressent à la synthèse de nouvelles sondes dérivées du pyrène, sous forme anionique comme pour Mizusaki et Morishima, 1998, ou Caruso et al., 1998, ou encore préparées à partir d'amines modifiées stériquement (Bucsiova et al., 2001) permettant la compréhension de l'organisation en microdomaines.

Intérêt de l'utilisation de sondes fluorescentes pour l'étude de la MON

Ganaye et al., 1997, ont déterminé le coefficient de partage eau/matière organique de sol et de boue activée par la mesure de la variation du rapport de la première bande de fluorescence du pyrène sur la troisième bande. Kazpard, 2001, a déterminé une concentration minimale d'agrégation pour un modèle d'acide humique synthétisé à partir de catéchol et de glycine à l'aide de cette technique.

b) Détermination des nombres d'agrégation

Les nombres d'agrégation micellaire ⁷ peuvent être déterminés par trois méthodes.

La première méthode est le **quenching de fluorescence** introduite par Turro et Yekta, 1978, qui permet de déterminer ces nombres jusqu'à des valeurs de 120.

Pour des valeurs supérieures, la deuxième méthode est le **quenching de fluorescence résolu dans le temps**, applicable dans le cas de quenching dynamique en solution (Hauser et Klein, 1973). Malliaris et al., 1986, ont montré que des sondes (pyrène) immobiles dans des micelles de tensio-actifs ioniques (le chlorure de dodécylméthylammonium (DMAC) et le chlorure de cetyltriméthylammonium (CTAC)) pouvaient migrer de micelles en micelles à l'échelle de temps du signal de fluorescence. Ces auteurs ont également montré que la

⁷ Nombre de molécules monomères libres nécessaires pour former une micelle en équilibre en solution.

migration ne s'effectuait ni par des processus intermicellaires (en solution aqueuse, la sonde est presque insoluble) ni par des collisions entre les micelles entières de tensio-actifs. Il s'agirait plutôt du résultat d'un équilibre dynamique entre les micelles totalement organisées et de petits agrégats micellaires agissant comme transporteurs de la sonde.

La troisième méthode a été utilisée pour la première fois par Atik et al., 1979, qui ont établi une **relation entre les valeurs des intensités** de la sonde pyrène utilisée comme monomère dans les systèmes micellaires, prises à différents instants et les nombres d'agrégation.

c) Etude de « microviscosité »

La détermination de paramètres de microviscosité peut également être déterminée par la spectrofluorimétrie pour les systèmes micellaires. Elle s'obtient par des mesures **d'anisotropie de fluorescence résolue dans le temps** utilisée par Anthony et Zana, 1994, pour des systèmes polymères de savons et par Grätzel et Thomas, 1973, pour des systèmes tensio-actifs classiques (CTAB, SDS) en présence de sonde pyrène. Engebretson et von Wandruska, 1997, ont introduit un indice d'association interne pour des molécules d'AH en solution par des mesures d'anisotropie de fluorescence avec la sonde PPO (diphényloxazole).

Pour des sondes formant des excimères intramoléculaires, une autre possibilité est la mesure entre l'intensité d'émission de fluorescence de l'excimère formé et celle du monomère (Hauser et Klein, 1973).

d) Tailles, formes et structures des micelles

Les tailles, formes et structures de systèmes micellaires sont principalement déterminées par des mesures de temps de fluorescence pour un inhibiteur donné. Malliaris et al., 1986, ont par exemple déterminé des nombres d'agrégation micellaire pour plusieurs tensio-actifs cationiques (ammonium), grâce à des mesures de temps de relaxation de fluorescence.

1.3.2.3. Interactions MO-polluants

Depuis la fin des années 80, il existe deux techniques principales de fluorescence permettant la mise en évidence semi-quantitative de l'interaction matière organique/polluants : le quenching de fluorescence et l'excitation-émission synchrone.

Les mesures d'anisotropie de fluorescence apportent des renseignements complémentaires aux techniques précédentes, puisqu'elles permettent d'obtenir des informations sur les mouvements de rotation diffusionnelles des molécules en solution. L'équation de Perrin permet notamment de relier l'anisotropie de fluorescence au temps de relaxation vibrationnelle des molécules (von Wandruska, 1992).

La fluorescence photo-induite permet quant à elle d'étudier la décomposition de composés fluorescents par irradiation UV (von Wandruska, 1992).

a) Inhibition de fluorescence (analyse de Stern-Volmer)

Gauthier et al., 1986, ont été les premiers à introduire le quenching de fluorescence comme méthode non destructive pour déterminer les **constantes d'équilibre** lors de l'interaction de substances humiques avec des hydrocarbures aromatiques synthétiques.

Pour l'étude du naphthalène et du 1-naphtol en présence d'acide humique naturel, Morra et al., 1990, ont pu mettre en évidence l'existence d'un quenching dynamique entre ces espèces.

Sanchez et al., 1992, ont établi une méthode spectrofluorimétrique d'analyse de l'herbicide bentazone avec une limite de détection de quelques ng/L. Après avoir réalisé une étude complète de la variation de fluorescence de cet herbicide pour des solvants de différentes polarités, ils ont établi une procédure d'extraction permettant le dosage du polluant dans les céréales.

Puchalski et al., 1992, ont utilisé la technique de quenching pour étudier l'interaction du difenzoquat avec des AH commerciaux et extraits de sols. Les auteurs mentionnent la nécessité de corriger l'effet de filtre interne et ont mis en évidence l'existence de deux types de mécanismes d'interactions. La courbe de Stern-Volmer et les spectres d'absorption UV/Visible permettent en effet de distinguer le quenching statique du quenching dynamique dans le processus d'interaction intervenant. L'allure de la courbe est également similaire à celle obtenue pour des expériences de quenching en milieu micellaire « vrai » (représenté par exemple par un système tensio-actif classique de type SDS).

Fang et al., 1998, ont utilisé un acide humique commercial (Aldrich) comme inhibiteur de la fluorescence des pesticides de type carbamates (carbofurane, carbaryle et aldicarbe). Les constantes de liaison de ces pesticides avec l'AH ont ainsi pu être déterminées.

Cox et al., 2000, ont étudié la fluorescence de différents types de « matériaux humiques » commerciaux ou extraits de sols en présence de simazine et de 2,4-D en simple émission (excitation à 254 nm). Ils ont repris l'indice d'humification introduit par

Zsolnay et al., 1999, pour caractériser les extraits organiques des différents sols. Les valeurs de ces indices d'humification se sont avérées être directement reliées aux valeurs de densités optiques (DO) mesurées en absorption UV/Visible pour ces mêmes sols. Les études d'interaction avec les polluants se sont faites par des mesures d'adsorption (isothermes de Freundlich). Il a finalement été montré que les sols contenant les substances humiques de plus haut degré d'humification étaient les meilleurs adsorbants pour la simazine, mais pas pour le 2,4-D.

b) Excitation-émission synchrone

La technique de fluorescence en mode synchrone a tout d'abord été utilisée pour suivre qualitativement la matière organique dissoute dans les milieux naturels (Cabaniss et Schuman, 1987). La fluorescence synchrone permet également la mise en évidence de mécanismes de liaisons entre la MON et les polluants.

Pesticides - herbicides

Spark et Swift, 1994, ont étudié par fluorescence d'excitation synchrone les interactions entre l'atrazine, le 2,4-D, l'isoproturon et le paraquat avec des substances humiques sous forme sodique et calcique extraites de sols pour trois longueurs d'onde d'excitation (340, 390 et 450 nm). Les résultats obtenus pour cette étude par dialyse couplée à la détection UV/Visible sont similaires aux résultats obtenus par fluorescence et ont montré une interaction importante entre le paraquat et les substances humiques, plus faible et de force décroissante avec le 2,4-D, l'atrazine et l'isoproturon respectivement.

Senesi et al., 1995, ont montré que les variations des intensités et des déplacements de fluorescence de plusieurs types d'acides humiques extraits de sols n'étaient pas modifiés de la même façon lors de la mise en présence avec la simazine et l'atrazine, molécules de type électro-donneur, et de diquat et paraquat, substances de type électro-accepteur : les AH s'associent dans tous les cas de façon plus importante avec les *s*-triazines qu'avec les composés de type bipyridinium. Les différences quantitatives des associations AH-polluants s'expliquent par les différentes complémentarités au niveau des groupes fonctionnels de AH, à savoir qu'ils sont plus ou moins capables de former des liaisons permettant le transfert de charges (par exemple suivant leur teneur en groupes quinoniques électro-accepteurs ou phénoliques (électro-donneurs)).

Fang et al., 1998, ont utilisé la technique de fluorescence synchrone pour calculer les rapports des intensités I_{395}/I_{350} correspondant respectivement aux pics des AH et des AF pour

différentes fractions d'AH extraits de sols forestiers. La corrélation entre ces ratios et les constantes de liaison déterminées pour ces mêmes fractions avec le carbofurane a été établie de façon non équivoque : plus le rapport est élevé, à savoir plus le degré d'hydrophobie de l'échantillon est important, plus la constante de liaison avec le polluant est élevée.

Autres polluants

Galapate et al., 1998, ont mis en évidence la présence d'un pic de fluorescence intense à 531 nm pour des rejets de déchets domestiques (effluents urbains) dans les eaux de surface de rivière et l'ont corrélié avec la quantité d'effluent rejetée.

c) Anisotropie de fluorescence

L'étude par polarisation de fluorescence des systèmes AH-naphtalène et AH-1-naphtol (Morra et al., 1990) a permis de montrer l'absence de liaisons fortes entre ces molécules. Les sondes naphtalène et 1-naphtol seraient confinées dans un espace micellaire humique non rigide permettant les collisions entre les molécules sondes et engendrant deux **types de mécanismes** de quenching (statique et dynamique).

d) Fluorescence photo-induite

Coly et Aaron, 1999a et 1999b, ont montré qu'il était possible de détecter des dérivés fluorescents de chlorsulfuron, metsulfuron, 3-rimsulfuron et méthylsulfométuron formés par irradiation UV en milieu micellaire (SDS et CTAC) dans les eaux de rivière.

Kim et al., 1999, ont utilisé la mesure de la fluorescence intrinsèque de la chlorophylle pour étudier l'impact de la sulcotrione, du norflurazon et du diuron sur les feuilles de végétaux traitées et ont suggéré que la sulcotrione inhibait le transport d'électrons lors de la photosynthèse.

e) Spectroscopie de fluorescence résolue dans le temps, induite par excitation laser

Des travaux récents couplent l'extraction sur phase solide (SPE) à une **détection des polluants** par spectroscopie de fluorescence résolue dans le temps. Whitcomb et al., 2002, ont ainsi étudié la détection du benzo-[a]-pyrène extrait d'eau de rivière par cette technique et ont obtenu de très bons résultats (limite de détection de l'ordre de quelques parties par milliards, ppb).

f) Travaux les plus récents

Les avancées les plus récentes en spectroscopie de fluorescence utilisent un couplage des différents paramètres de mesure précédemment mentionnés. Ainsi, des appareils de microscopie confocale d'épifluorescence utilisant l'excitation laser pulsée et résolue dans le temps ont été mis au point récemment. Cette technique permet d'obtenir des informations « quadri-dimensionnelles » de fluorescence : intensité, temps de vie, anisotropie, longueurs d'onde spectrales d'excitation et d'analyse. Elle permettrait d'obtenir des renseignements sur les modifications conformationnelles de macromolécules fluorescentes en temps réel.

Enfin, pour détecter *in situ* des contaminants dans les milieux naturels aquatiques, Lamotte et al., 2001, ont utilisé la spectrofluorimétrie en mode synchrone sur phase solide adsorbante (bloc de polydiméthyl-siloxane) pour détecter des HAP (1-hydroxy-pyrène et 9-hydroxy-phénanthrène) et des BTX (benzène, toluène, xylène) dans l'eau. L'avantage essentiel de ce type de technique repose sur la non utilisation de solvants organiques d'extraction des contaminants susceptibles de modifier la matrice et le recours aux techniques chromatographiques.

I.4. La coagulation de la MON

Comme nous l'avons mentionné dans le paragraphe précédent (I.3), la MON est la matrice qui contrôle fréquemment les liaisons, le transport, la dégradation et la toxicité des polluants organiques et inorganiques. La MON est essentiellement à l'origine de la couleur, des goûts et des odeurs que peut avoir l'eau, soit directement, soit au travers de ses sous-produits. Elle peut fixer ou remobiliser des polluants lors des opérations de traitement de l'eau et peut notamment conduire à la formation de produits cancérigènes (les trihalométhanes (THMs)) et cause la corrosion des conduites d'alimentation en eau potable. La potabilisation d'eaux de surface nécessite donc l'élimination de la MON. Le traitement le plus efficace actuellement est la coagulation par des sels métalliques, suivie d'une adsorption sur charbon actif.

Depuis son lieu de pompage sur la rivière jusqu'à son arrivée chez le consommateur, l'eau subit une série de traitements visant à la rendre potable. Classiquement, l'eau passe par une étape de clarification (Figure I.4(1)), puis de désinfection. L'étape de clarification comprend généralement une phase de coagulation-floculation, puis une sédimentation et enfin une filtration sur filtre à sable ou sur membrane. L'étape de coagulation-floculation consiste à déstabiliser la matière colloïdale en suspension par ajout d'un réactif chimique approprié. Ensuite ces particules s'agrègent sous forme de floes décantables.

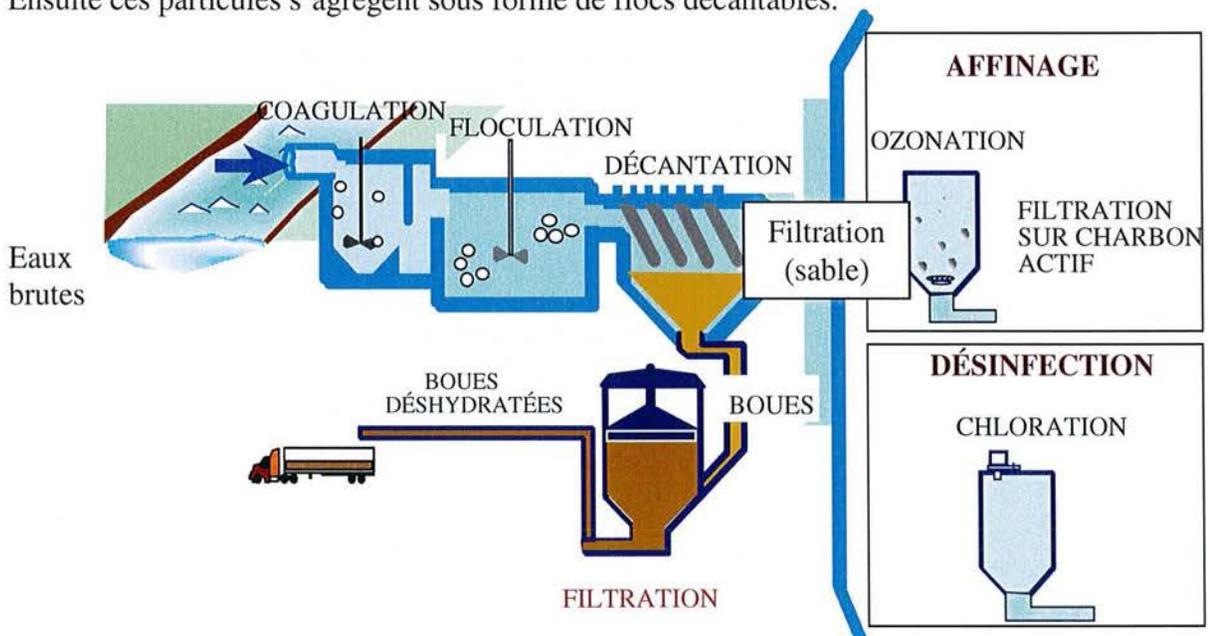


Figure I.4(1)
Les étapes de la clarification des eaux de surface.

Pour le traitement d'eau, ce procédé d'agrégation se décompose en deux étapes :

- Réduction ou annulation, par ajout d'un réactif chimique, des forces inter-particulaires de répulsion qui assurent la stabilité de la suspension colloïdale.
- Mise en contact des particules déstabilisées par agitation mécanique qui provoque la formation d'agrégats.

Toujours dans le domaine du traitement des eaux, la terminologie en usage associe le phénomène de déstabilisation des particules à la coagulation et celui du transport à la floculation, sans que l'emploi de ces deux termes ne préjuge des mécanismes physico-chimiques correspondants (Fiessinger et Bersillon, 1977).

En chimie des colloïdes, coagulation et floculation font référence à un mode de déstabilisation déterminé. Pour La Mer et Healy, 1963, le terme de coagulation doit être utilisé pour désigner le type d'agrégation obtenu après addition d'électrolyte à une suspension de particules colloïdales. Le terme de floculation doit être réservé au processus d'agrégation où une macromolécule, adsorbée simultanément sur deux particules ou plus, établit entre celles-ci un ensemble de ponts.

I.4.1. La coagulation par les sels métalliques

Dans ce procédé, l'addition d'un ou plusieurs produits, appelés coagulants, entraîne la coagulation des matières organiques et des particules. Les coagulants les plus utilisés sont des sels de métaux hydrolysables, à savoir Fe^{III} et Al^{III} . Avant d'aborder les réactions de coagulation proprement dites, il convient de rappeler brièvement la chimie aqueuse de ces deux éléments en l'absence de ligands.

Par ailleurs, les variabilités des paramètres physico-chimiques du milieu naturel, notamment la présence de cations et anions, vont directement interagir avec les conditions de traitement de la MON par coagulation. En solution, ces espèces chimiques vont notamment être susceptibles de rentrer en compétition avec le coagulant dans l'accessibilité aux sites potentiels de liaison avec la MON ou au contraire favoriser le phénomène de coagulation.

Enfin, les caractéristiques intrinsèques de la matière organique vont influencer son élimination.

I.4.1.1. Hydrolyse des sels de fer

La polymérisation du fer, *via* le processus d'hydrolyse, aboutit à la formation de petits clusters pouvant s'agréger et ainsi se transformer en une phase infinie, gel ou précipité amorphe. Ce mécanisme est à la base de la formation des oxyhydroxydes de fer bien cristallisés comme la goethite, mais le passage des phases amorphes vers les phases cristallisées n'est pas totalement élucidé.

Une littérature abondante décrit les différentes réactions ayant lieu lors de l'hydrolyse des ions ferriques. Le processus général d'hydrolyse d'une solution de Fe^{III} peut être décrit par la réaction suivante :



En fait, l'ion $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ libérant ses protons agit comme un acide en solution et la réaction d'hydrolyse, mettant en jeu des équilibres acido-basiques $\text{Fe}^{3+}/\text{OH}^-$, est assimilable à une titration. L'examen de cette courbe de titration à partir de 0,1 M de Fe^{III} , qui est la concentration de notre solution mère de coagulant, permet de différencier trois régions distinctes (Figure I.4(2)).

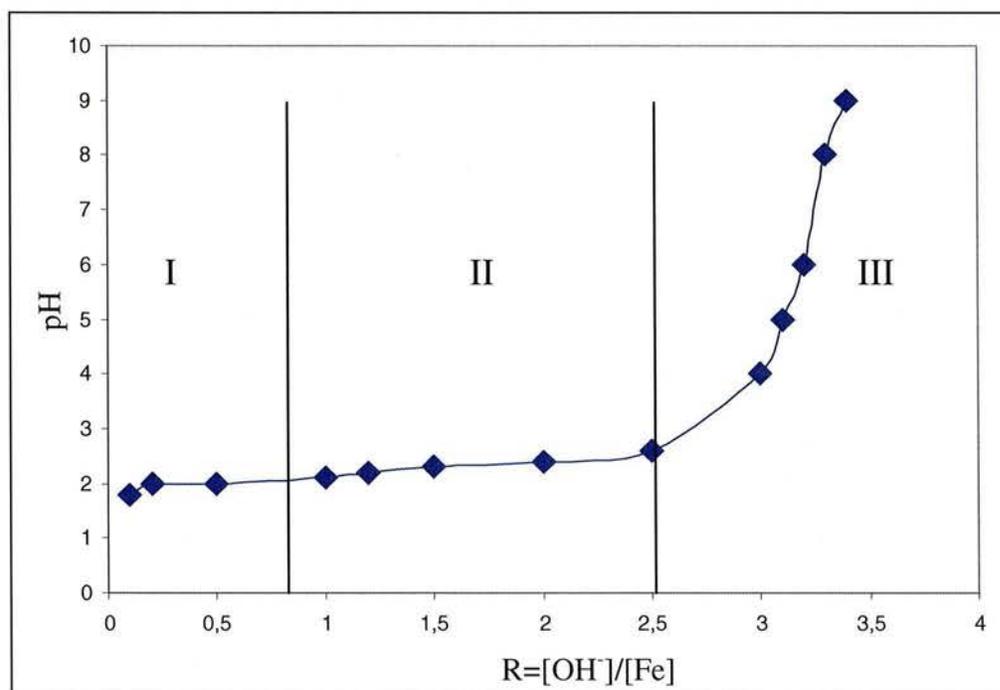


Figure I.4(2)

Titration d'une solution 0,1 M Fe^{III} (Dousma et de Bruyn, 1976 ; Combes et al., 1989).

Dans la suite, nous utiliserons le rapport $R=[OH^-]/[Fe]$ définissant les 3 régions présentées sur la Figure I.4(2).

Région I : $0,2 < R < 0,75$

Dans cette zone, les ions $[Fe(H_2O)_6]^{3+}$ subissent une déprotonation issue des molécules d'eau de leur couche de solvatation.

Région II : $0,75 < R < 2,5$

Cette zone se caractérise par une constance du pH aux alentours de 2,3, malgré l'ajout d'une base en grande quantité en solution. Il y a apparition et développement d'espèces polycationiques du type $[Fe_n(OH)_m]^{(3n-m)+}$. Pour des solutions fraîchement hydrolysées, Murphy et al., 1976, considèrent que la taille des polycations est indépendante de la nature du sel de fer utilisé. En fait, l'étude de ces colloïdes par diffusion aux petits angles des rayons X (DAX) (Bottero et al., 1991 ; Tchoubar et al., 1991) montre qu'il existe des différences de taille en fonction du sel ferrique utilisé. De plus, ces différences sont aussi présentes au niveau structural (Combes et al., 1989 ; Bottero et al., 1994b).

L'évolution de la structure des colloïdes en fonction du temps n'aboutira pas à la même phase cristallisée en fonction du sel ferrique utilisé. De plus ces différences sont aussi présentes au niveau structural (Bottero et al., 1994b ; Combes et al., 1989).

L'évolution de la structure des colloïdes en fonction du temps n'aboutira pas à la même phase cristallisée en fonction du sel ferrique utilisé. Il semble que pour les solutions de $Fe(NO_3)_3$, le précipité obtenu soit constitué d'un mélange de goethite et de lépidocrocite (Murphy et al., 1976 ; Van der Moude et al., 1984) alors que pour les solutions de $FeCl_3$, le composé obtenu soit de l'akaganéite (Murphy et al., 1976 ; Combes et al., 1989 ; Bottero et al., 1994b). Ces évolutions n'ont été observées que pour des taux d'hydrolyse supérieurs à 1,5.

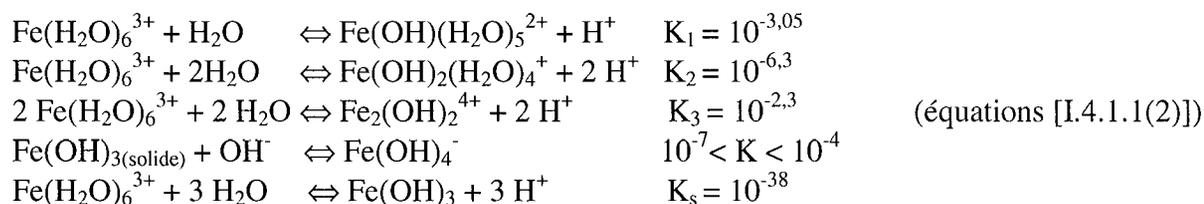
Région III : $2,5 < R < 3$

Cette région est caractérisée par l'apparition de particules en suspension (dès $R = 2,5$), puis de la précipitation d'un gel ferrique ($R = 2,8$) de couleur brun-rouge. La consommation d'espèces hydroxylées va provoquer une neutralisation de surfaces des particules polymères chargées positivement pour des pH inférieurs au point de charge nulle (PCN⁸ = 7).

⁸ Le PCN est la valeur du pH correspondant au point isoélectrique.

Ainsi, l'hydrolyse du fer dépend du type de sel utilisé.

Il est possible de résumer les différentes étapes de l'hydrolyse à l'aide des équilibres suivants (Schneider, 1984) donnant les valeurs des constantes K correspondantes :



Ces équilibres ont permis : i) de modéliser les spectres UV (Mulay et Selwood, 1955 ; Knight et Sylva, 1975) et ii) de tracer le diagramme de spéciation du fer en solution présenté sur la Figure I.4(3).

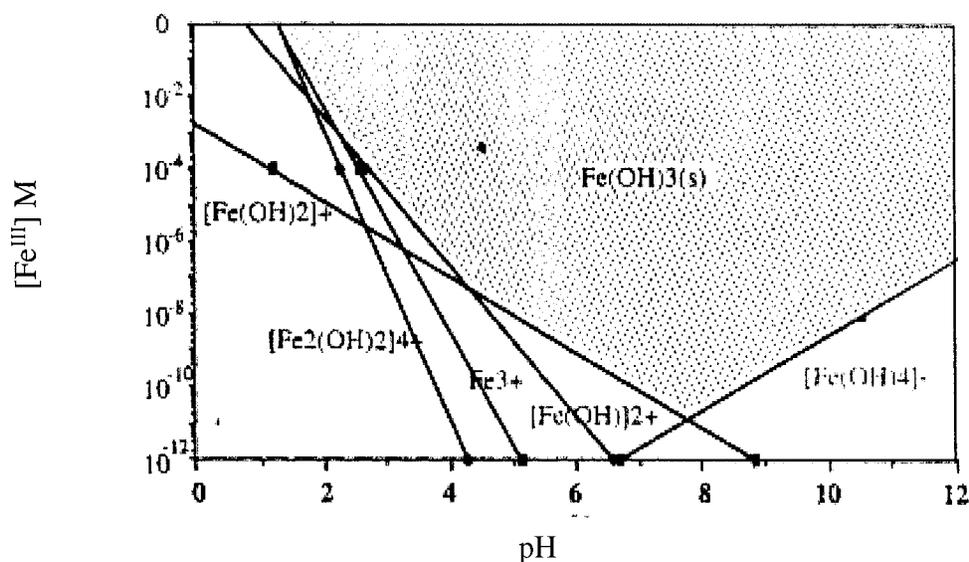
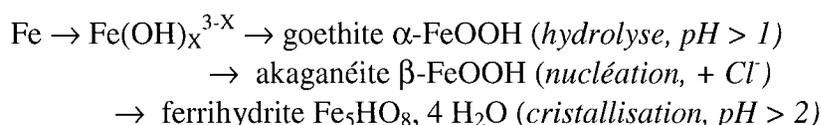


Figure I.4(3)
Diagramme de spéciation de Fe^{III} en solution.

En fonction du mode d'hydrolyse, de la solution initiale de fer et des conditions de vieillissement, le produit cristallisé final diffère (Schwertmann et Cornell, 1991).

Ici, seuls les sels de Fe^{III} sont considérés. Les équations de formation des oxyhydroxydes sont les suivantes :



Certaines questions se posent quant à la structure des polycations se formant dans les premiers stades de l'hydrolyse du fer (faibles taux d'hydrolyse et solutions fraîchement synthétisées, hors équilibre). La structure des clusters préfigure-t-elle la phase cristallisée ultérieure ? Dans le cas du chlorure ferrique, la réponse est oui, et les différentes étapes de l'hydrolyse vont être rappelées, mais dans le cas du nitrate ferrique, la réponse est moins directe comme nous le détaillons dans ce qui suit.

Hydrolyse du chlorure ferrique : Rose, 1996, a montré que la structure des polycations formés lors de l'hydrolyse du chlorure ferrique semblait suivre un certain nombre d'étapes bien précises. La polymérisation du fer apparaît peu chaotique et les oligomères formés tout au long de la croissance préfigurent la phase cristallisée finale. La première étape correspond à l'association d'octaèdres de fer par arêtes pour former des dimères. La deuxième étape est la formation de trimères, un troisième octaèdre se liant au dimère par double sommet. Ensuite, ces trimères vont se condenser pour former le polycation Fe_{24} (Figure I.4(4)).

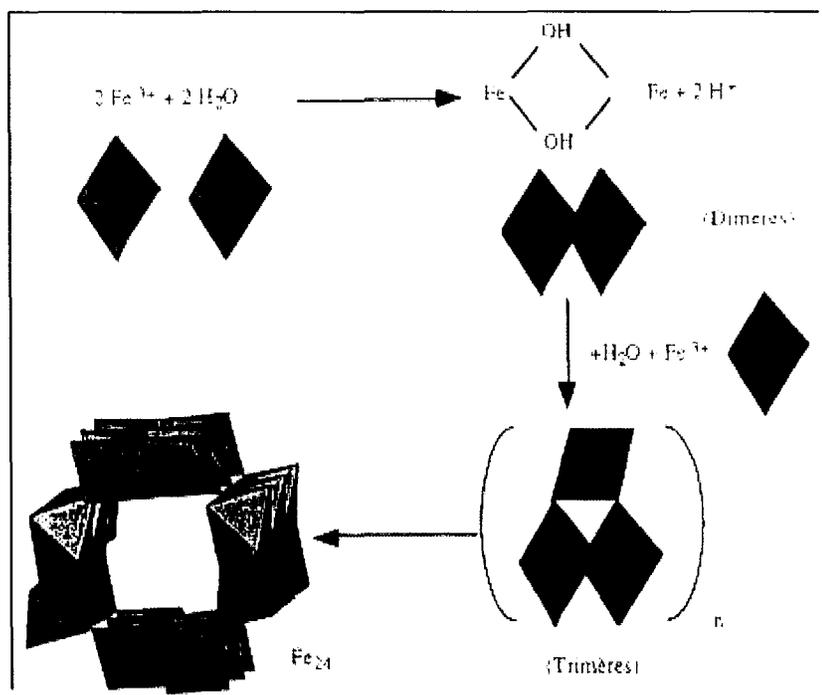


Figure I.4(4)

Evolution des polymères de fer lors de l'hydrolyse de $FeCl_3$ (Rose, 1996).

Hydrolyse du nitrate de fer : Il semble que l'hydrolyse du nitrate de fer suive des étapes plus ou moins chaotiques. Vilgé-Ritter et al., 1999, ont montré que chaque taux d'hydrolyse évoluait différemment en fonction du temps. Il ne semble donc pas y avoir de logique nette de croissance. Les colloïdes présents en solution ne semblent pas posséder de structure similaire à celle des oxyhydroxydes de fer cristallisés, mis à part pour des taux d'hydrolyse de 2,5 et des temps de maturation de 20 jours. Dans ce cas (Rose et al., 1997), il semble que la structure locale des colloïdes représente un mélange de particules avec une structure proche de la lépidocrocite et d'autres avec une structure proche de la goethite. Les particules amorphes ne préfigurent donc pas celles des phases cristallisées.

I.4.1.2. Les théories de la coagulation de la MON

Le principal objectif de la coagulation est la déstabilisation des particules colloïdales pour les agglomérer ; cette agrégation de particules permet ensuite une clarification efficace de l'eau à traiter par sédimentation (Johnson et Amirtharajah, 1983). L'addition de coagulant permet cette déstabilisation colloïdale. Jusqu'à ces vingt dernières années, le mécanisme d'interactions des coagulants avec la MON était expliqué par les phénomènes présentés sur la Figure I.4(5).

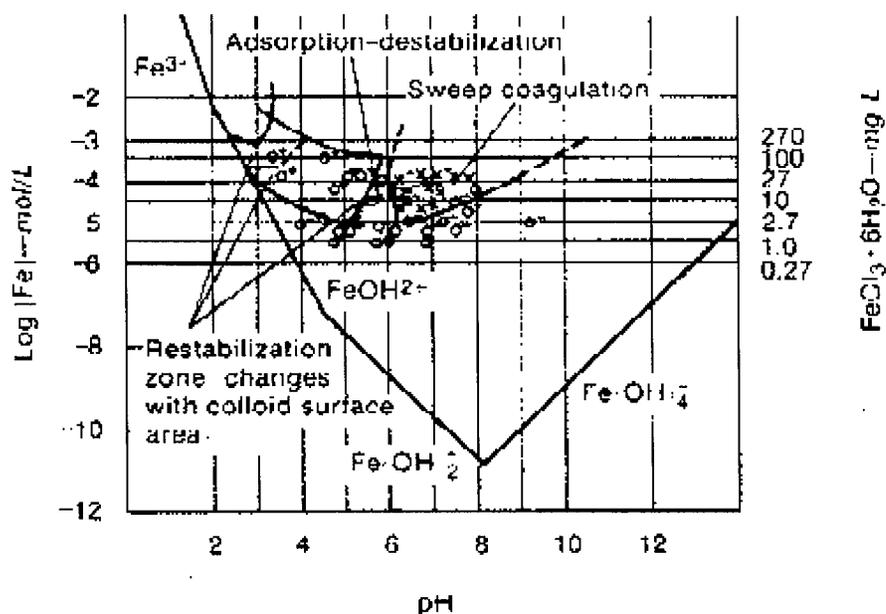


Figure I.4(5)
Diagramme de coagulation de Fe^{III} (Johnson et Amirtharajah, 1983).

L'adsorption et la neutralisation de charge se produisent à faible dose en coagulant. Il s'agit d'adsorption électrostatique (échange d'ions), physique, chimique ou spécifique sur les produits d'hydrolyse métallique de charge opposée à la MON. L'adsorption peut être complétée ou suivie par un pontage. Enfin, l'emprisonnement physique des colloïdes dans la formation du précipité peut se produire pour des concentrations en sels métalliques plus élevées.

Le Tableau I.4(1) résume les mécanismes proposés par différents auteurs ayant travaillé sur le sujet.

*Tableau I.4(1)
Les différentes grandes catégories de mécanisme d'élimination de la MON.*

Complexant	Type de MO considérée	Doses de traitement	pH	Mécanisme envisagé	Référence
Al ³⁺ monomères	Humates ou fulvates	Toutes doses	< 5	Neutralisation de charges	Dempsey et al., 1984 Vilgé-Ritter, 1997
Al ³⁺ polymères	Acides fulviques	Faibles doses Fortes doses	5-7	Précipitation Ennoiement	Dempsey et al., 1984
Précipité Al(OH) ₃	Substances humiques	Toutes doses	neutre	Adsorption	Dempsey et al., 1984 Vilgé-Ritter, 1997

1.4.1.3. Influence des paramètres « externes » sur la coagulation de la MON

La coagulation de la MON est influencée par au moins 3 types de paramètres cités ci-après.

a) Les doses de coagulant

L'élimination de la MON suit généralement deux modèles illustrés sur la figure I.4(6) (Randtke et Jepsen, 1981 dans Vilgé-Ritter, 1997) :

- Le modèle 1 à une forme sigmoïdale : le pourcentage de MON diminue d'abord de façon lente puis rapidement jusqu'à un palier.

- Le modèle 2 suit une décroissance régulière jusqu'à un palier dont la valeur est plus élevée que pour le modèle 1 (moins efficace que le modèle 1).

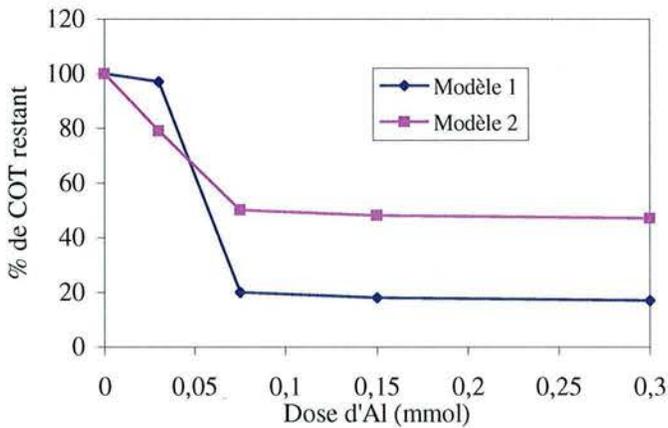


Figure 1.4(6)

Courbes typiques d'élimination de la MON en fonction de la dose en coagulant.

D'après Randtke et Jepsen, 1981, le modèle 1 est caractéristique d'un mécanisme de précipitation et est associé à des faibles valeurs de pH, à de fortes concentrations en MON et à de la MON relativement « homogène ». Il semblerait que ce type d'élimination soit stœchiométrique, la dose optimale de coagulant étant proportionnelle à la concentration en MON. Le modèle 2 est généralement associé à des pH forts, à des concentrations en MON relativement faibles et à de la MON plutôt hétérogène, contenant des matériaux non humiques. Des doses en coagulant plus fortes sont nécessaires.

b) Le pH

L'influence du pH peut s'expliquer en terme de réaction acide-base, mais aussi en terme de spéciation du fer ou de l'aluminium. En augmentant le pH, on favorise la formation de polycations de fer ou d'aluminium et leur agrégation. Le pH optimum pour la coagulation de la MON avec des sels d'aluminium se situe dans une gamme entre 5 et 6. Il est légèrement plus faible pour des sels de fer, entre 4 et 5.

c) Les ions inorganiques

Les ions inorganiques peuvent aussi influencer la coagulation de la MON. Les cations, particulièrement les divalents comme Ca^{2+} , peuvent réduire la dose de coagulant nécessaire en se fixant sur les groupements fonctionnels des molécules organiques (Tipping, 1993). En revanche, des anions comme les sulfates ou les hydroxydes peuvent bloquer l'élimination de la MON. En effet, ils entrent en compétition avec les molécules organiques anioniques en formant des complexes avec les produits cationiques d'hydrolyse des métaux.

El Samrani et al., 2004a, ont suggéré une participation des phosphates dans le mécanisme d'hydrolyse des espèces de Fe^{III} pouvant modifier de façon significative les conditions de traitement par coagulation de matière organique dissoute (étude réalisée sur les eaux usées).

I.4.2. Interaction MON - espèces coagulantes

I.4.2.1. Influence des caractéristiques intrinsèques de la MON sur sa coagulation et spéciation de la matière organique lors de son élimination (statut du carbone)

Un des paramètres les plus importants vis-à-vis de la capacité de coagulation de la MON est le **caractère aromatique** des composés. Le rapport $\text{DO}_{254 \text{ nm}}/\text{COD}$ est souvent utilisé comme critère de coagulation (Peel, 1980 ; Randtke et Jepsen, 1981 ; Bersillon, 1983). Plus ce rapport est élevé, plus l'abattement du COD lors de la coagulation sera important. Plus le rapport carbone aromatique sur carbone aliphatique est élevé et plus l'élimination de la MON est importante.

Le **poids moléculaire** de la MON est également un paramètre qui influence la coagulation à savoir que les fractions présentant le poids le plus important sont préférentiellement éliminées.

Peu d'auteurs ont en réalité travaillé sur la caractérisation de la MON coagulée. Gray et Simpson, 1996, ont étudié la **nature chimique** de la matrice organique de plusieurs eaux de surface par Py/CG-SM et son comportement au cours de la coagulation. Ils ont montré que pour l'eau du Colorado, la coagulation avec le **chlorure de fer** permet d'éliminer plutôt les composés aromatiques. Certaines auteurs ont travaillé avec des molécules organiques modèles (Lefebvre et Legube, 1990 ; Julien et Guéroux, 1994). Lefebvre et Legube, 1993, ont étudié la coagulation par le chlorure de fer de quelques acides organiques et phénols en solution aqueuse. Ils ont montré que les composés aromatiques présentant un seul groupement fonctionnel $-\text{COOH}$ ou $-\text{OH}$ ou encore deux ou trois de ces groupements non contigus ne sont pas coagulés, alors que les composés aromatiques présentant au moins deux groupements fonctionnels $-\text{COOH}$ et/ou $-\text{OH}$ en position ortho sont retenus par le chlorure de fer. Aucune conclusion n'a donc pu être établie sur les mécanismes mis en jeu. Ils peuvent être de deux types, un échange de ligand à la surface de FeOOH amorphe et une complexation ou un échange de ligand entre les monomères, dimères (ou petits polymères solubles) issus de l'hydrolyse du fer et les composés organiques. En travaillant dans les mêmes conditions expérimentales, Julien et Guéroux, 1994, ont mis en évidence par spectrophotométrie, la

formation de complexes, absorbant dans le visible, lors de la coagulation du chlorure de fer et de certaines molécules organiques, comme le pyrocatechol et l'acide salicylique.

Harrington et Bruchet, 1996, ont montré que la proportion de polyhydroxyaromatiques, calculée à partir des résultats de Py/CG-SM par la méthode de Bruchet, 1985, est corrélable à la fois avec le pic de carbone aromatique et celui de carbone carboxylique mesurés par RMN du ^{13}C .

Vilgé-Ritter, 1997, a montré notamment grâce à la Py/CG-SM que les composés polyhydroxy aromatiques fortement acides issus de MON d'eaux de Seine sont préférentiellement éliminés par le chlorure de fer. La présence des groupements $-\text{COOH}$ ou $-\text{OH}$ est donc fondamentale pour le processus de coagulation. Par ailleurs, il a été montré (Vilgé-Ritter, 1997) que les composés azotés tels les amino-sucres, s'ils sont présents en grande proportion dans l'eau de Seine, sont peu éliminés par coagulation, quelle que soit la nature du coagulant employé.

Si l'on suppose que la forte proportion d'amino-sucres dans les rivières est surtout liée à des rejets d'eaux résiduaires urbaines, ce résultat est très important pour la potabilisation des eaux. En effet, des traitements secondaires, plus adaptés à l'élimination de ces composés que la coagulation, seraient à prévoir.

Le **sulfate d'aluminium**, coagulant encore aujourd'hui très courant en traitement des eaux, a été utilisé fréquemment par les auteurs pour étudier la sélectivité dans l'élimination de différentes familles/groupes de biopolymères. Ainsi, nous pouvons mentionner les travaux de Croué et al., 1993, ayant montré une élimination plus forte des composés les plus hydrophobes par rapport à celle déterminée pour les substances hydrophiles sans caractère acide. Gray et Simpson, 1996, ont également montré une forte élimination par coagulation avec le sulfate d'aluminium des composés aromatiques d'une eau moyennement chargée en composés organiques (COT = 4 mg/L). Bose et Reckhow, 1998, ont séparé la matière organique naturelle en plusieurs fractions selon sa nature et/ou sa taille moléculaire et étudié leur interaction avec l'hydroxyde d'aluminium grâce à des isothermes d'adsorption sur des particules d'hydroxydes d'aluminium.

La Figure I.4(7) résume leurs principaux résultats qui doivent cependant être nuancés par une absence de considération de phénomènes de solubilisation pouvant exister antérieurement à celui d'adsorption.

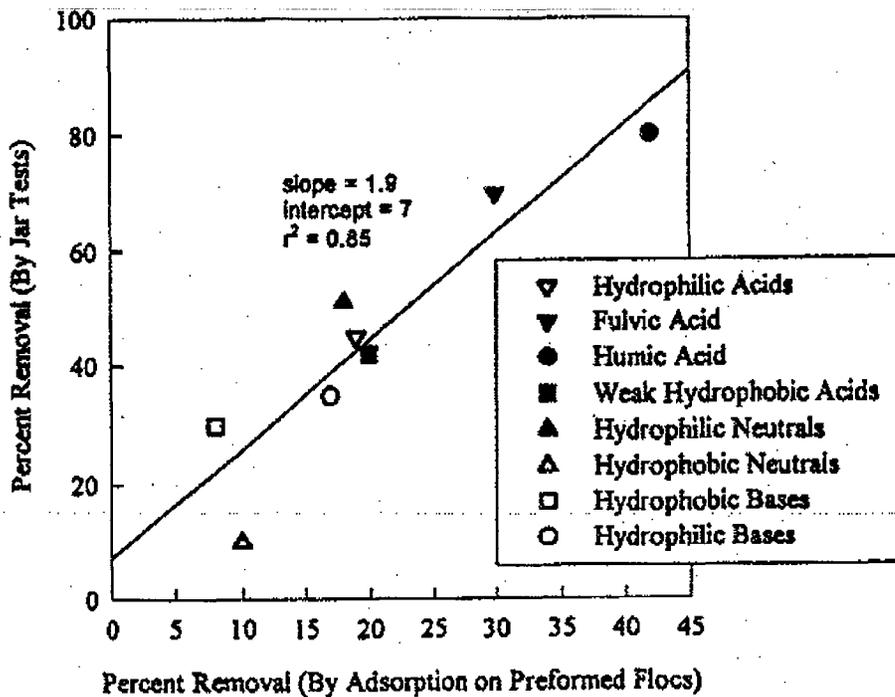


Figure I.4(7)

Comparaison de l'élimination de différentes fractions de MON par adsorption sur des floccs préformés d'hydroxydes d'aluminium et par jar-tests (concentration appliquée en Al : 5 mg/L ; COT : 5 mg/L) (Bose et Reckhow, 1998).

Plusieurs tendances ont pu être dégagées de cette étude (Figure I.4(8)):

- Les acides hydrophobes (*i.e.*, les acides fulviques et humiques) ont une affinité d'adsorption plus grande vis-à-vis des floccs d'hydroxydes d'aluminium que les fractions non-humiques.
- Les fractions ayant des densités de charge organiques plus faibles que les acides humiques (*i.e.*, les acides fulviques et hydrophiles) ont des capacités d'adsorption plus faible sur les floccs d'hydroxydes d'aluminium.
- Les molécules de plus haute taille moléculaire s'adsorbent de façon plus importante sur les hydroxydes d'aluminium que les fractions de taille moléculaire plus faible.

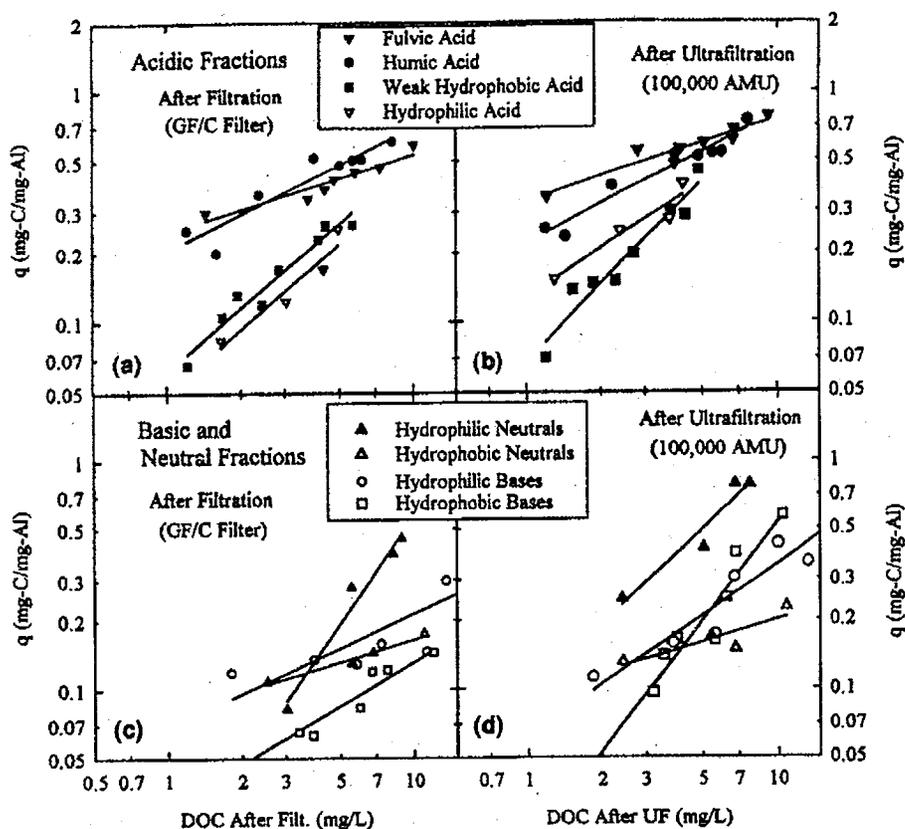


Figure I.4(8)

Isothermes de Freundlich pour l'adsorption de fractions de MON sur des floccs préformés d'hydroxydes d'aluminium :

- (a) Fractions acides (Séparation de phase : fibre de verre GF/C) ;
 - (b) Fractions acides (séparation de phase : 100 K en ultrafiltration) ;
 - (c) Fractions neutres et basiques (séparation GF/C) ;
 - (d) Fractions neutres et basiques (séparation de phase : 100 K ultrafiltration)
- (Bose et Reckhow, 1998).

I.4.2.2. Hydrolyse du coagulant en présence de matière organique (statut du fer)

Le statut du fer (vu à la fois comme coagulant du traitement des eaux, mais aussi comme élément métallique présent naturellement dans le milieu naturel sous différentes formes) va lui aussi jouer un rôle très important vis-à-vis de la rétention et du transport de la matière organique présente dans les eaux de rivière (Perdue et al., 1976 ; Bottero et Bersillon, 1989). L'étude de son statut vis-à-vis de la matière organique lors des opérations de traitement de l'eau va permettre de comprendre les mécanismes de coagulation en présence.

Les phénomènes d'adsorption de la matière organique sur les oxyhydroxydes de fer ont fait l'objet de nombreuses études. Nous pouvons nous baser sur les résultats obtenus pour

ces approches, étant donné les différentes étapes d'hydrolyse (et donc de passage par des phases d'oxyhydroxydes plus ou moins cristallisées) présentées au paragraphe 1.4.1.1.

Différents mécanismes ont ainsi été mis en évidence concernant l'origine de la fixation de la matière organique en surface des oxyhydroxydes (Gu et al., 1994) :

- échange d'anions (interaction électrostatique entre l'adsorbat et l'adsorbant)
- échange de ligands
- interactions hydrophobes
- liaisons hydrogène
- pontages cationiques

L'échange de ligand entre les OH et H₂O de surface des oxyhydroxydes de fer et la MO dissoute est avancé par de nombreux auteurs (Parfitt et al., 1977 ; Tipping, 1981 ; Davis, 1982 ; Murphy et al., 1990 ; Gu et al., 1994). De nombreux mécanismes sont actuellement proposés concernant les liaisons possibles pouvant être envisagées entre la MO et les oxyhydroxydes de fer (Figure I.4(9)).

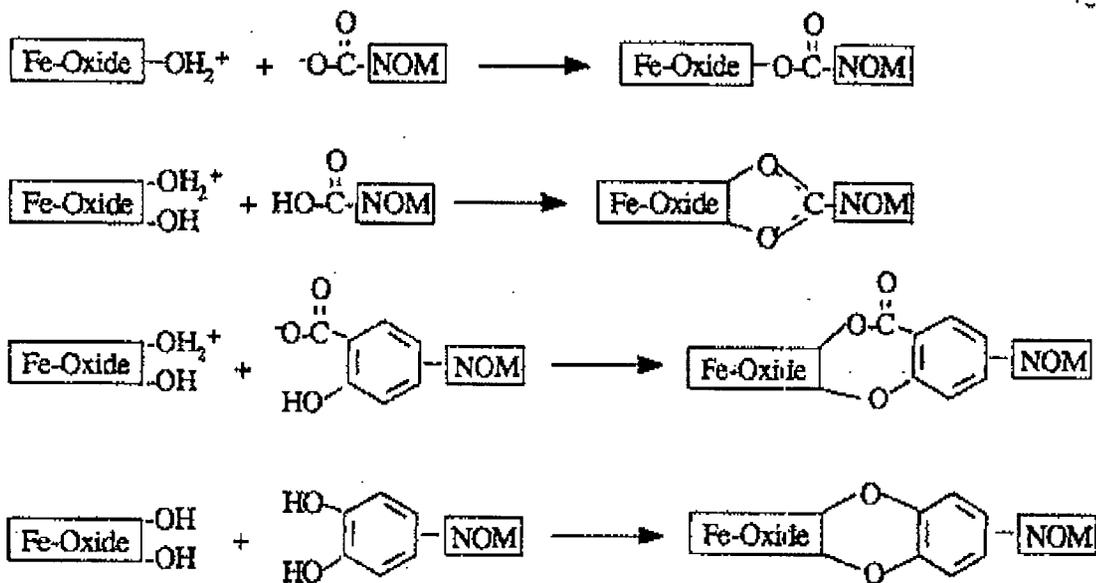


Figure I.4(9)
Différents modes d'interactions par échange de ligand entre les sites de MON et des oxyhydroxydes de fer (Gu et al., 1994).

Ainsi, suivant ces mécanismes, l'adsorption de l'acide fulvique sur la goethite a été proposée comme une complexation entre les groupements carboxylates des molécules

organiques et les -OH de surface du minéral. Les groupements fonctionnels -COO^- et OH^- des acides humiques et fulviques sont connus pour former des complexes stables avec Fe^{3+} (Gu et al., 1994). Certains sels (CaSO_4 , CaCl_2) peuvent augmenter l'adsorption des acides humiques sur des floes d'oxyhydroxydes de fer amorphes. Il semble que l'adsorption soit proportionnelle à la quantité de carbone aromatique et soit inversement proportionnelle au rapport O/C (Murphy et al., 1990).

Ces phénomènes d'adsorption par échange de ligand (Figure I.4(10)) peuvent aboutir à la complexation de surface (1), puis une lente dissociation du complexe organométallique se produit (2), les sites de surface étant ensuite régénérés par protonation.

Il a également été montré que la matière organique, sous certaines conditions spécifiques du milieu, pouvait aussi réduire les métaux, notamment en jouant le rôle de « médiateur électronique » entre les microorganismes et les minéraux d'oxyde de Fe^{III} .

Par exemple, l'oxalate, complexé au Fe^{III} aboutit à la formation de Fe^{II} et à une solubilisation du fer (Hoigné et al., 1994). Dans ce cas, la réduction est induite, dans les eaux superficielles, par l'énergie lumineuse. Rose, 1996, a d'ailleurs montré la très faible polymérisation du fer, dont l'hydrolyse semblait bloquée par la MO en milieu naturel. Il a mentionné l'interaction Fer-MO par l'apparition de liaisons Fe-O-C (suite à des échanges de ligands) par spectroscopie d'absorption des rayons X (EXAFS) au seuil K du fer. Concernant la détermination de la valence et de la coordinance du fer, il a trouvé tous les spectres EXAFS comparables à la goethite (aussi bien en amplitude qu'en énergie). Le fer était donc vu comme étant hexacoordonné. De même, en énergie, aucun déplacement entre un spectre de goethite et des échantillons colloïdaux contenant du fer n'a été observé. La valence résultante est donc de 3.

Il faut souligner que des interactions de type Fe-C ont pu être détectées, même si le nombre d'atomes de carbone dans l'environnement du fer déterminé par EXAFS reste approximatif (+/- 40%) vu le faible poids atomique de cet élément. Cette présence de carbone confirmait bien la complexation du fer par la MO naturelle. Cependant celle-ci ne semble pas réduire le Fe^{III} , ni modifier sa coordinance.

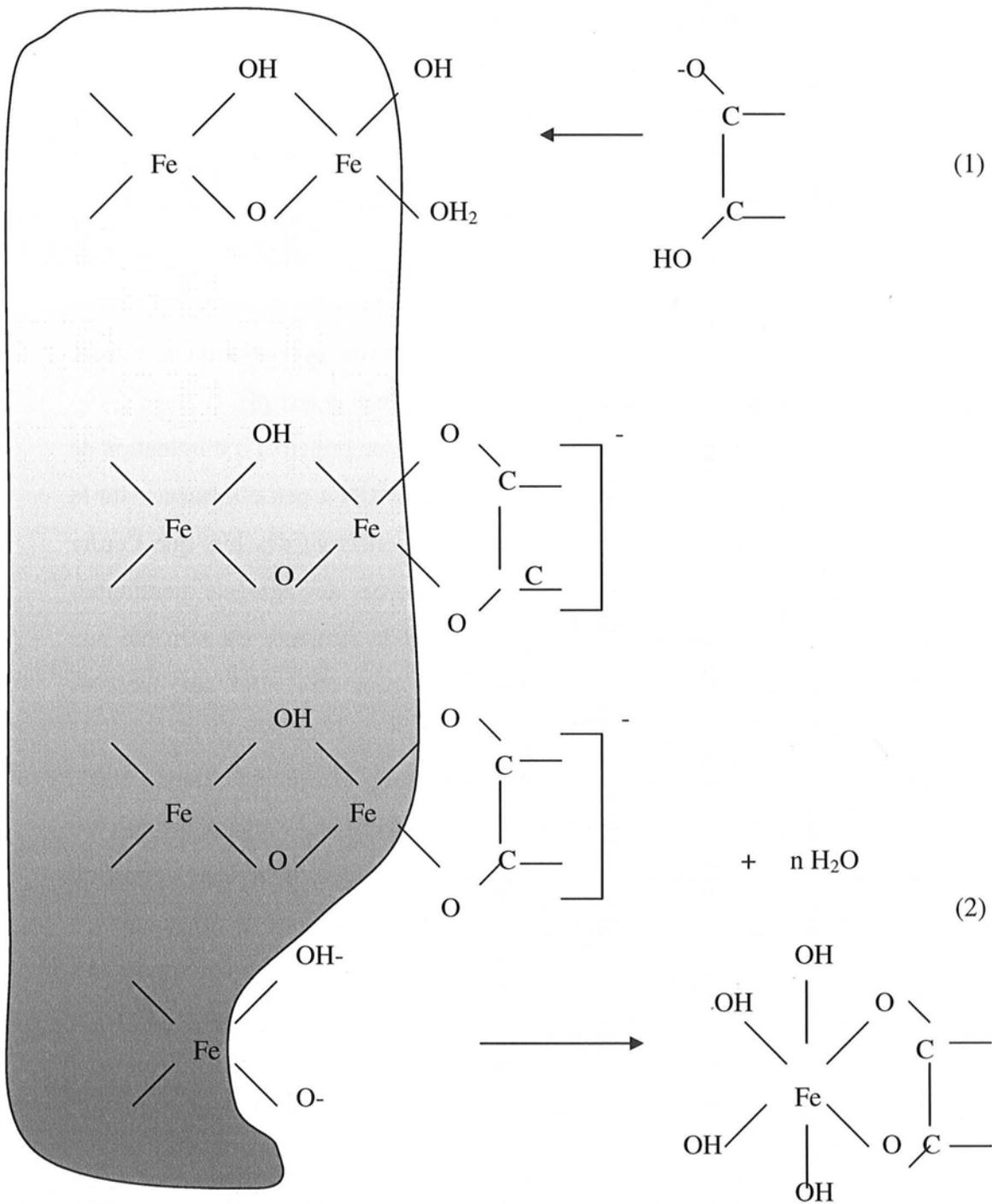


Figure I.4(10)
 Représentation schématique de la dissolution des particules d'oxyhydroxydes par des ligands organiques (Stumm et O'Melia, 1968).

Vilgé-Ritter, 1997, a étudié les agrégats formés en traitement de coagulation avec le chlorure ferrique pour la MON d'eaux de Seine en utilisant la spectroscopie d'absorption des rayons X (XANES et EXAFS) et diffusion aux petits angles des rayons X (DPAX) ⁹. Dans les floes étudiés, le fer n'est pas réduit par la MON. Dans les conditions expérimentales de l'étude sur les eaux de Seine, le fer est sous forme octaédrique et son degré d'oxydation est III malgré la présence de la MON. La complexation du fer par la MON bloque les sites de croissance des oxyhydroxydes ferriques et par conséquent, limite son hydrolyse au stade de petites espèces oligomères. La spéciation du fer déterminée à partir des données EXAFS et DPAX montre une prédominance de trimères (simple sommet) avec une variation de l'angle de liaison Fe-O-Fe. Cette spéciation est peu sensible aux types d'eau et aux pH.

D'après ces travaux, la complexation est donc le mécanisme principal d'élimination de la MON, même à des pH élevés. Cependant, si la nature de la MON a peu d'influence sur la spéciation et l'ordre local autour du fer, son rôle devient prépondérant dès lors que l'ordre semi-local est considéré. En effet, les dimensions fractales élevées des agrégats mentionnés dans cette étude, traduisent la présence d'objets denses dont la structure est sensible aux variations de pH et dont le mécanisme de formation ne peut être relié aux modèles d'agrégation de type cluster-cluster.

En parallèle de ces résultats expérimentaux, d'autres auteurs (Pullin et Cabaniss, 2003) ont évoqué la réduction « thermique » du Fe^{III} en Fe^{II} grâce aux substances organiques de type fulviques, elles-mêmes utilisées en temps que médiateur électronique, donc sans apport ou contributions extérieures de microorganismes, de lumière, et aux conditions de pH naturels, à savoir proches de la neutralité. Des mécanismes de ce type entre les parties quinoniques des substances humiques et le Fe^{III} ou par les groupements de type catéchol (Stumm et O'Melia, 1968) avaient déjà été évoqués antérieurement à ces études. Ces travaux rejoignent également ceux de Langford et al., 1979, pour lesquels plusieurs espèces de complexes acide fulvique-Fe^{III} existaient.

La Figure I.4(11) résume le modèle conceptuel du mécanisme de spéciation du fer et de ses transformations dans des eaux naturelles contenant des substances humiques, faisant abstraction des procédés photochimiques et biochimiques qui pourraient être associés.

⁹ Le XANES et l'EXAFS au seuil K du fer permettent en effet d'étudier le degré d'oxydation et la coordinance du fer ainsi que son environnement local : distance, nature et nombre de voisins atomiques dans un rayon d'environ 5Å autour du fer.

La modélisation du « pied » des courbes de DPAX permet aussi l'étude de la spéciation du fer dans les agrégats. La DPAX, en plus, donne des informations sur la structure des agrégats à l'échelle semi-locale.

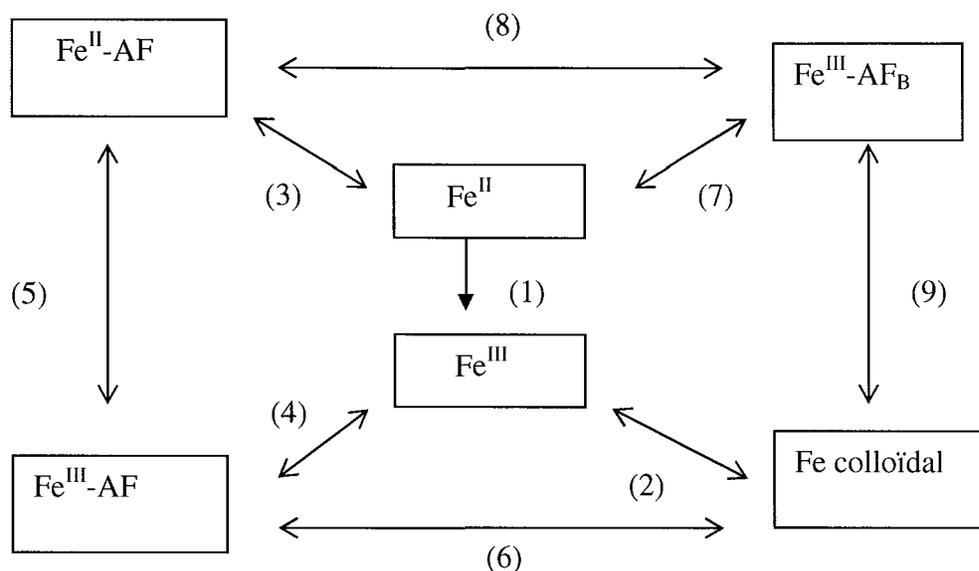


Figure I.4(11)

Modèle conceptuel de spéciation du fer en présence de substances fulviques (AF extrait de la rivière Suwanee) à 2 complexes A et B (Pullin et Cabaniss, 2003).

- 1) oxydation du Fe^{II} inorganique dissous pour former des espèces de Fe^{III} inorganique. La quantité de Fe^{II} et Fe^{III} exacte est dépendante du pH et des espèces anioniques en solution
- 2) formation de fer colloïdal à partir de Fe^{III} dissous
- 3) complexation du Fe^{II} dissous par AF pour former Fe^{II}-AF
- 4) complexation du Fe^{III} dissous par AF pour former Fe^{III}-AF_A
- 5) oxydation de Fe^{II}-AF_A
- 6) formation de fer colloïdal à partir de Fe^{III}-AF_A
- 7) complexation de Fe^{III} par AF pour former Fe^{III}-AF_B
- 8) oxydation de Fe^{II}-AF pour former Fe^{III}-AF_B
- 9) formation de fer colloïdal à partir de Fe^{III}-AF_B

I.4.3. Récapitulatif du comportement de la MON pendant sa coagulation

Randtke, 1993, a élaboré un modèle conceptuel de la coagulation de la MON pour organiser les informations concernant le comportement de la MON pendant la coagulation (Tableau I.4(2)).

Tableau I.4(2)
Modèle conceptuel de la coagulation de la MON proposé par Randtke, 1993.

Interaction	Résultats
MON + H ⁺	Précipitation d'AH si pH 1 ; coagulation améliorée des MON jusqu'à un point optimal, au-delà duquel les protons inhibent les interactions entre les MON et les hydroxydes métalliques.
MON + Hydroxydes métalliques	Précipitation de molécules organiques dont la solubilité est dépassée ; adsorption de MON sur les solides hydroxydes métalliques ; compétition MON-anions (OH ⁻ , SO ₄ ²⁻) capables de complexer les hydroxydes métalliques ; les protons réduisent la demande en coagulant et augmentent la charge des hydroxydes.
MON + Cations	Précipitation de molécules organiques dont la solubilité est dépassée ; réduction de la concentration d'hydroxydes métalliques utiles à la précipitation ou l'adsorption de la MON coagulable.
Caractéristiques des MON	Résultats
Hydrophobie augmente	Élimination augmente
Plus de sites de liaison par molécules	Élimination augmente, demande en coagulant plus grande et une brusque augmentation de l'élimination lorsque la dose de coagulant augmente ; mais la solubilité plus forte peut s'annuler.
Plus grand poids moléculaire	Élimination augmente (due à l'augmentation de l'hydrophobie et à plus de site de liaisons par molécule).
Hétérogénéité augmente	Augmentation plus progressive de l'élimination lorsque la dose de coagulant augmente.
Traitement	Résultats
Coagulation	Élimine la MON de large poids moléculaire et la plus hydrophobe ; les molécules organiques restantes s'adsorbent plus vite sur charbon actif en grains et vont plus profondément dans les pores, d'où une nette augmentation de la capacité adsorbante ; la vie des lits de sédimentation est augmentée du fait de la diminution de la charge organique ; réduction de la consommation de polarisation (formation de gel) sur membranes, réduction de la demande en oxydant.

La Matière Organique Naturelle (MON) provient de l'activité biologique, chimique et photochimique. Elle correspond aux sous-produits résultants de la décomposition bactérienne des composés biochimiques dérivés d'organismes morts (végétaux ou animaux) ainsi qu'aux composés générés par le métabolisme des organismes vivants.

Les macromolécules naturelles organiques, par leurs diverses propriétés physico-chimiques, sont l'un des composants les plus réactifs du milieu vis-à-vis des polluants. Leur piégeage et leur transport par la MON dépendra des caractéristiques propres à chacun d'entre eux (degré d'hydrophobie, capacité d'ionisation...).

Les mécanismes réactionnels et d'interaction entre la MON et ces polluants restent encore pour l'heure insuffisamment élucidés, ceci se justifiant par l'absence de maîtrise des propriétés propres à la matière organique. Dans le cadre de notre étude, nous avons ainsi choisi de mettre en place un plan d'expérimentation réalisé en parallèle sur des substances synthétiques modèles d'une part et sur des échantillons naturels d'autre part afin d'obtenir des résultats comparatifs et mieux maîtrisables.

Des micropolluants plus ou moins toxiques et biodégradables, ont été choisis pour leurs propriétés physico-chimiques distinctes et leur représentativité d'utilisation au sein des différentes activités anthropiques pour lesquelles ils sont utilisés au niveau du bassin versant de la Zone Atelier Moselle.

Par ailleurs, la grande hétérogénéité de propriétés de la MON précédemment exposée montre la difficulté de maîtrise des mécanismes d'élimination en présence au cours des étapes de potabilisation, notamment ceux concernant les phénomènes de relargage éventuels des micropolluants qui lui sont associés. La technique de coagulation-floculation, suivie d'une étape de filtration ou d'adsorption sur charbon actif étant la plus employée pour le traitement des eaux de distribution, nous avons choisi d'étudier l'élimination des substances humiques seules et en présence d'un polluant avec un sel de fer.

Nous avons vu dans ce Chapitre I que la matière organique naturelle (sols, sédiments et eaux continentales) pouvait être divisée en deux classes de composés, les matières non humiques comme les protéines, les polysaccharides, les acides nucléiques, de petites molécules telles les sucres et les acides aminés d'une part et les matières humiques d'autre part. La première part correspond à un ensemble globalement hydrophobe et la seconde à des constituants relativement amphiphiles.

La fraction humique de la MON (acides humiques et fulviques) est responsable de 60 à 70% de la matière organique des sols (Woodwell et al., 1978) et de 30 à 50% de la matière organique des eaux de surface (Thurman et Malcolm, 1981). Cette fraction de la matière organique sur laquelle nous avons choisi de porter notre étude peut jouer un rôle clé dans le milieu naturel aquatique. Généralement, deux classes de substances humiques chimiquement différentes sont considérées en milieu aquatique : les substances humiques pédogéniques et les substances humiques aquagéniques. Ces dernières proviennent directement de la dégradation d'organismes ayant évolué dans le milieu aquatique (algues, poissons...) de sorte qu'elles sont essentiellement constituées de protéines et de sucres et de fait riches en composés azotés. Les substances humiques pédogéniques sont formées en milieu terrestre et sont transportées jusqu'au milieu aquatique (ruissellement, percolation...). Elles sont plutôt composées de substances phénoliques (humification de débris végétaux) et donc moins riches en azote.

La teneur en azote (et par voie de conséquence le rapport C/N) étant le paramètre distinctif majeur entre les deux origines considérées, nous avons choisi de travailler sur deux modèles synthétiques distincts préparés au laboratoire : un polymère de catéchol et de glycine, mimant la composante pédogénique, et un polymère de catéchol et de triglycine, représentant hypothétique de la composante aquagénique de la MON aquatique.

L'investigation des interactions des substances humiques naturelles et synthétiques avec les micropolluants et de son élimination par coagulation a nécessité la mise au point de méthodes spécifiques d'étude, principalement la spectrofluorimétrie et la perte d'énergie aux seuils du carbone et du fer. L'ensemble de ces techniques est présentée dans le Chapitre II suivant.

Les différents types de matériaux organiques synthétisés, se composant d'une large gamme de molécules polydisperses en taille et en poids moléculaire, ont nécessité une caractérisation totale présentée dans l'ARTICLE I.

Chapitre II

Méthodes expérimentales et
matériaux d'étude

II.1. Méthodes d'analyse

II.1.1. Méthodes associées aux mises en évidence des interactions MO / polluants

II.1.1.1. La spectrofluorimétrie : principe, appareillage, quenching, mode synchrone, mode matriciel et précautions analytiques

a) Le phénomène de fluorescence moléculaire (Lakowicz, 1999)

Lorsqu'un faisceau lumineux traverse une solution exempte ou non de matières en suspension et que l'on observe la lumière émergeant latéralement, trois phénomènes sont observés (Figure II.1(1)):

- Une grande partie de la lumière incidente est diffusée dans toutes les directions (cas de particules dont la taille est inférieure à $3\lambda/2$).
Cette diffusion est homogène dans l'espace quand la taille des particules est inférieure à $\lambda/10$. On parle alors de « diffusion Rayleigh ». Ce phénomène ne met pas en jeu les niveaux énergétiques des molécules. Il s'agit de diffusion élastique (sans perte d'énergie) de la lumière excitatrice par les particules qui constituent le milieu.
De plus, l'intensité émise est fonction de $1/\lambda$, d'où une diminution de la diffusion pour les grandes longueurs d'onde.
- A une longueur d'onde très proche de l'effet Rayleigh, il existe une lumière émise due à l'effet Raman provenant de l'excitation des molécules du milieu par les photons incidents. Les photons incidents provoquent l'apparition de dipôles dans les molécules irradiées. Ce dipôle vibre avec une fréquence donnée ν . Il s'ensuit qu'une partie de la lumière réémise est modulée par la fréquence de vibration de la molécule. Il s'agit d'une diffusion inélastique.
- Le troisième phénomène est la fluorescence.

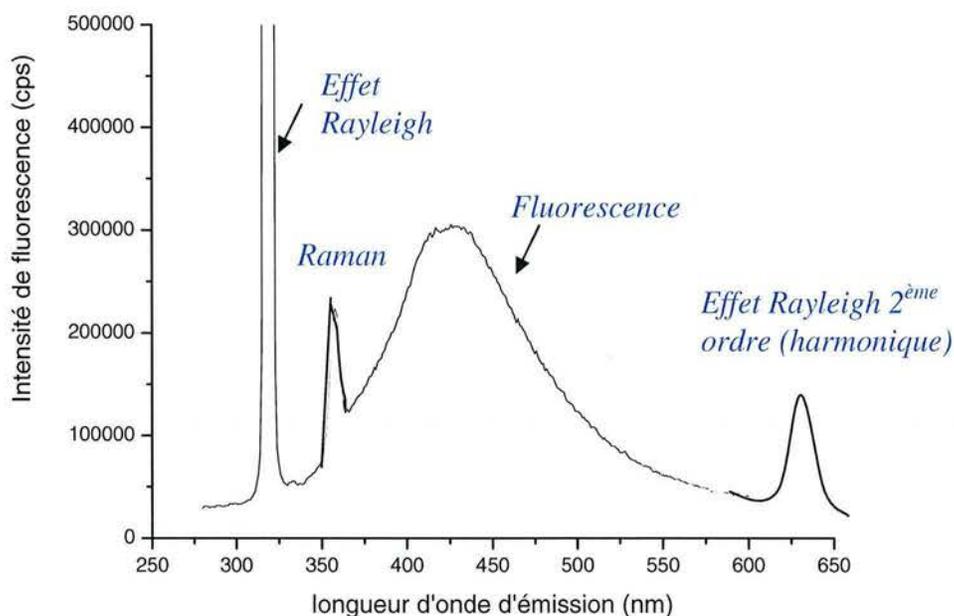


Figure II.1(1)

Visualisation des phénomènes observés lors de l'enregistrement d'un spectre d'émission de fluorescence (excitation à 320 nm).

L'excitation d'une molécule par un photon UV/Visible peut provoquer une transition électronique de l'état fondamental E_0 vers l'état d'énergie excité E_1 . Il y a simultanément une modification éventuelle des énergies vibrationnelles et rotationnelles. Le retour à l'état fondamental par émission spontanée de photons est le phénomène de fluorescence.

Conformément au principe de Pauli, le moment cinétique de spin noté S associé à l'état fondamental est généralement nul et, en conséquence, la multiplicité du niveau qui s'écrit $M = 2S + 1$ vaut 1. L'état est dit singulet et se note S .

A l'état excité, on est amené, par contre, à considérer le cas où la transition d'un électron vers un niveau d'énergie supérieure peut s'accompagner d'un changement de son moment cinétique de spin. Le moment résultant vaut alors $S = 1$ et la multiplicité s'écrit $M = 3$. L'état est dit triplet et se note T .

La figure II.1(2) résume le diagramme des niveaux d'énergie existant pour une molécule diatomique.

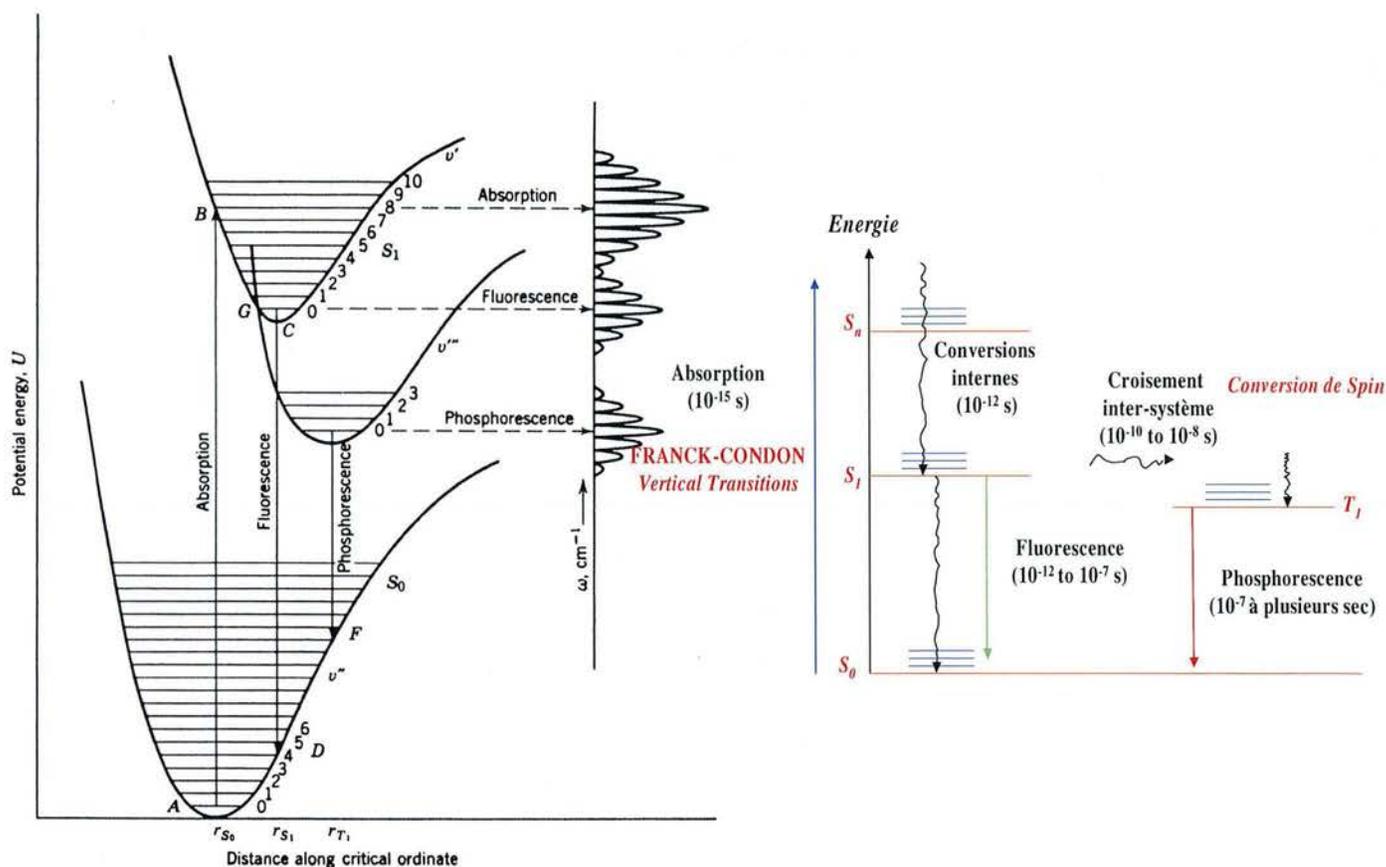


Figure II.1(2)
Diagramme de Jablonski.

Compte tenu des écarts en énergie, les spectres d'absorption mettant en jeu des transitions entre les niveaux électroniques se situent principalement dans l'ultra-violet et le visible. Le phénomène d'absorption est très bref, de l'ordre de 10^{-15} seconde, de sorte qu'il n'y a aucun changement des coordonnées des noyaux atomiques pendant la transition (principe de Franck-Condon). La structure la plus stable de l'état excité ne correspond généralement pas à la structure la plus stable de l'état fondamental. La transition d'absorption est, pour cette raison, le plus souvent suivie d'une conversion interne ramenant la molécule au plus bas niveau vibrationnel de l'état excité. Par ailleurs, dans la quasi-totalité des molécules, les états excités sont très rapprochés. On observe presque toujours, même pour les molécules excitées à un niveau d'énergie élémentaire, un retour rapide au premier état excité S_1 .

Les molécules dans leur état excité S_1 peuvent se désactiver selon 3 processus :

- $S_1 \rightarrow S_0$ par désactivation radiative, c'est le phénomène de fluorescence
- $S_1 \rightarrow S_0$ par désactivation non radiative

- $S_1 \rightarrow T_1$, transition non radiative analogue à la conversion interne mais qui se produit entre états de multiplicité différente. Si l'état excité T_1 se désactive par émission d'une radiation, on a alors le phénomène de phosphorescence.

En outre, le spectre d'émission de fluorescence se situe toujours dans un domaine de longueurs d'onde supérieur à celui du spectre d'absorption en raison de la perte d'énergie due à la relaxation vibrationnelle des états excités (loi de Stokes).

b) Appareillage

Les spectres de fluorescence en excitation continue sont enregistrés sur un spectrofluorimètre SPEX construit par Jobin Yvon (Fluorolog-3, Stanmore, Royaume-Uni) équipé du logiciel DATAMAX (Orlando, Floride, Etats-Unis) pour le traitement et l'acquisition du signal (S).

L'appareil SPEX est équipé d'une lampe xénon (450 W) dont l'image est focalisée sur la fente d'entrée du monochromateur d'excitation : celui-ci permet de sélectionner la longueur d'onde d'excitation λ_{ex} de la lumière qui excite l'échantillon. La correction de la lampe nécessite l'utilisation d'un système de référence : une photodiode qui mesure R, c'est-à-dire l'intensité de la lampe Xénon à chaque longueur d'onde. Le signal mesuré est donc au final S/R. Les monochromateurs d'excitation et d'analyse sont des simples réseaux de 1200 lignes /mm (bande passante (nm) = largeur de fente (mm) * dispersion (4 nm/mm), permettant de choisir respectivement les longueurs d'onde d'excitation et d'analyse. Le système de détection est un photomultiplicateur Hamamatsu (R928P, Kyoto, Japon) utilisé en compteur de photons. Placé à la sortie du monochromateur, il détecte la quantité de lumière correspondant à λ_{em} et génère un signal, qui, après amplification, peut être utilisé de diverses façons.

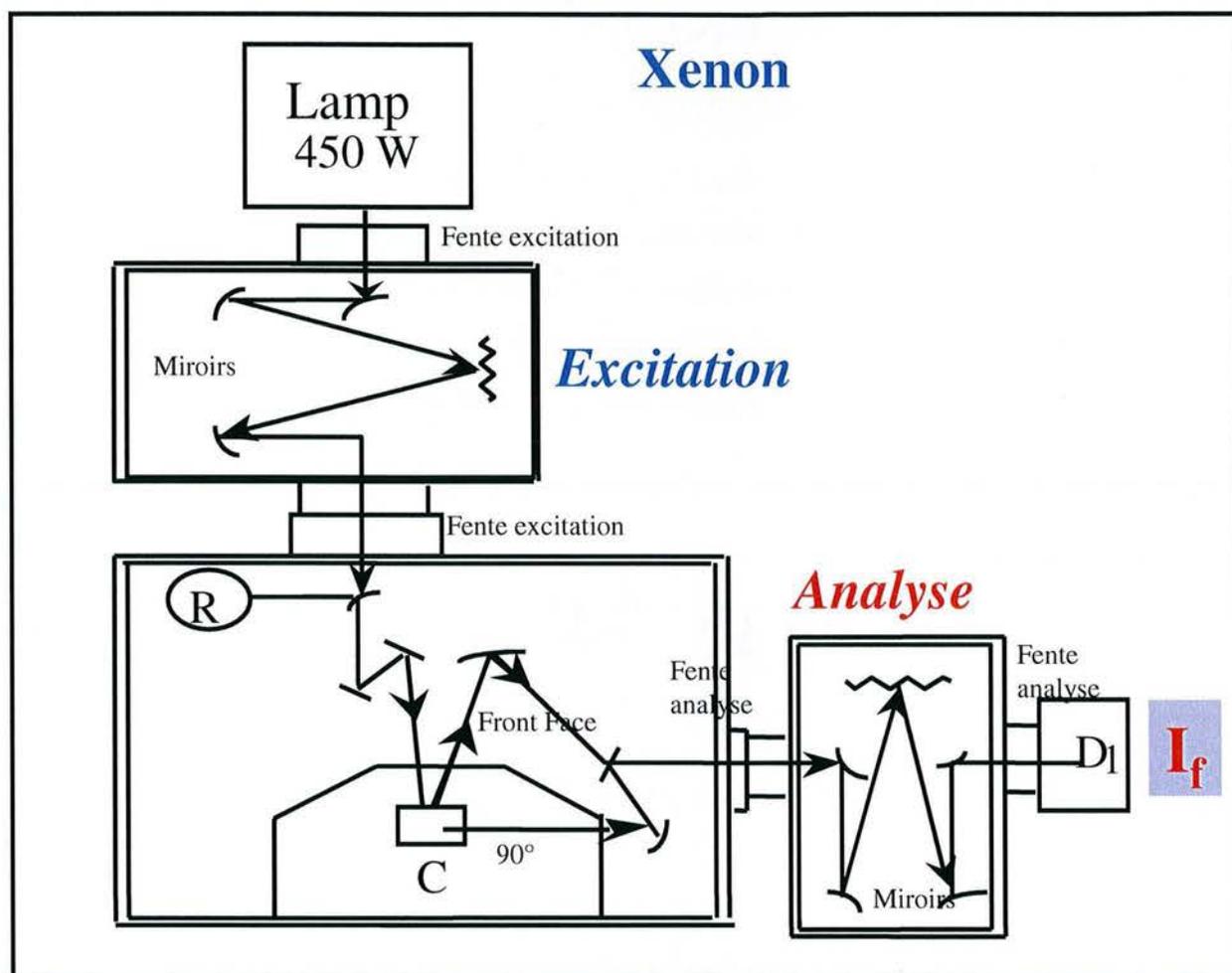


Figure II.1(3)
Dispositif de mesure de spectrofluorimétrie.

Avec la disposition classique (analyse à 90°), les mesures quantitatives pour corréler l'intensité de fluorescence à la concentration du fluorophore ne peuvent se faire que pour de faibles absorbances (moins de 0,1) pour éviter les problèmes de « peau » (réception non homogène de l'émission de fluorescence à l'entrée du monochromateur d'analyse). Dans le cas où l'étude nécessite des concentrations élevées en fluorophore, un dispositif différent de l'analyse à 90° peut être utilisé, le « front face ».

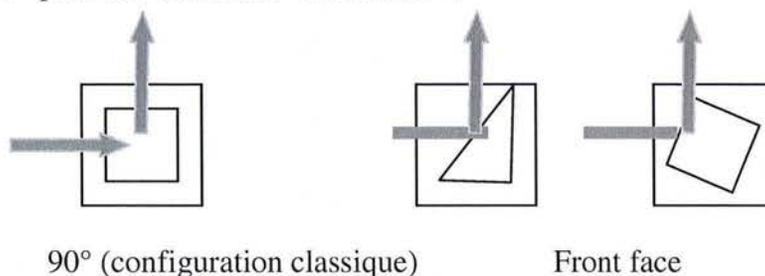


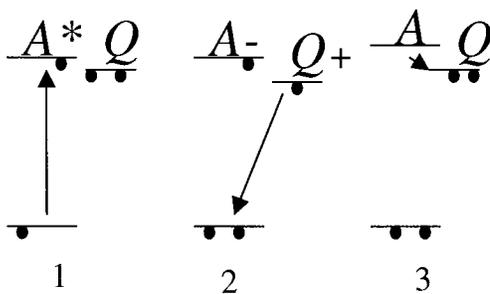
Figure II.1(4)
Les dispositifs de détection et d'analyse en fluorescence.

c) L'inhibition de fluorescence (ou quenching) (Lakowicz, 1999)

Théorie générale et description de la méthode dans le cadre de notre étude

Le quenching de fluorescence correspond à une diminution de l'intensité de fluorescence sous l'effet des collisions entre les particules fluorescentes et d'autres particules du milieu de mesure. Lorsque les collisions s'effectuent avec les molécules fluorescentes à l'état excité, on parle de quenching dynamique (Figure II.1(5)), et on nomme quenching statique le cas où les collisions se font avec les molécules fluorescentes dans leur état fondamental.

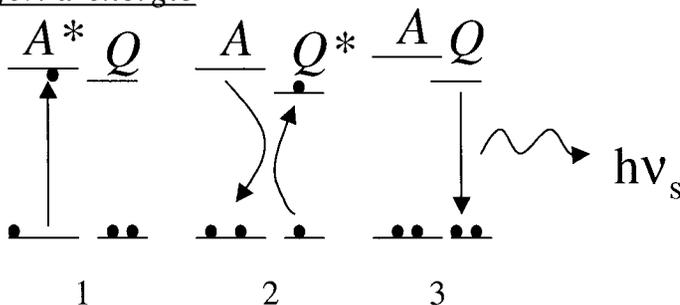
Transfert d'électron



- électron

- 1 photoexcitation du composé A : formation de A*
- 2 transfert d'un électron de Q vers A et formation des espèces A- et Q+
- 3 transfert d'un électron de A- vers Q+ : on retrouve les espèces A et Q

Transfert d'énergie

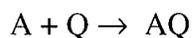


- 1 photoexcitation du composé A : formation de A*
- 2 transfert d'énergie de A vers Q : formation de Q*
- 3 désactivation de l'inhibiteur Q

Figure II.1(5)
Quenching de l'état excité.

- Le quenching statique

Il se manifeste lorsque des molécules A, susceptibles d'émettre un rayonnement de fluorescence, forment avec des molécules Q du milieu une espèce chimique non fluorescente. Le cas le plus fréquent est la formation d'un complexe AQ non fluorescent :



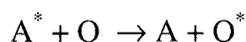
Ce phénomène abaisse la concentration de l'espèce libre A fluorescente et diminue donc l'intensité du signal de fluorescence.

- Le quenching dynamique

On distingue deux cas de quenching dynamique qui sont illustrés sur la Figure II.1(5) :

- le transfert de charge suppose la formation, pendant la durée de collision, d'une association des deux particules appelée « complexe collisionnel » qui résulte du transfert d'un électron entre les deux particules ;
- le transfert d'énergie se produit lors la particule Q du milieu concerné par la collision, possède un niveau d'énergie excité voisin de celui de la particule fluorescente A* .

Le phénomène, est décrit par la réaction :



Si les particules Q sont elles-mêmes fluorescentes, il y a apparition d'une fluorescence sensibilisée :



où hv_s est le rayonnement de fluorescence sensibilisée.

La désactivation des états excités par transfert d'énergie intermoléculaire peut être mise à profit pour étudier des réactions très rapides en compétition cinétique, et déterminer des constantes de vitesse de certaines réactions. Une analyse de Stern-Volmer postule un mécanisme de réaction mettant en jeu 2 réactions compétitives : la désactivation

monomoléculaire de l'état excité de la molécule « donneur » et l'inhibition bimoléculaire par un accepteur (A).

Le quenching dynamique s'exprime sous la forme d'une constante k_q . Elle peut se calculer en mesurant le rapport I_0 (intensité de fluorescence du milieu en l'absence de quencheur)/ I (intensité en présence de quencheur), pour différentes concentrations $[Q]$ de l'élément responsable du quenching. La relation reliant ces paramètres est connue sous le nom d'équation de Stern-Volmer :

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q[Q] \quad \text{équation [II.1(1)]}$$

Dans le cadre de notre étude, cette méthode permet principalement de calculer des constantes de complexation de la matière organique vis-à-vis de contaminants (comme le pyrène).

Il est nécessaire de distinguer les deux cas suivants :

- Pour les contaminants fluorescents (HAP, certains pesticides...), le quenching est dit direct car on mesure la diminution de l'intensité de fluorescence de ces composés par ajout de la MO (qui est alors le quencheur). Les différences de fluorescence enregistrées sont alors réellement quantitatives, car corrélables à la quantité de contaminant complexé par une loi linéaire de type Stern-Volmer.
- Pour les contaminants qui ne fluorescent pas (métaux), on mesure cette fois la diminution du signal de fluorescence de la MO en fonction de la quantité ajoutée en métal. La loi de décroissance n'est alors plus linéaire, mais la méthode de Ryan et Weber, 1982, permet la détermination des propriétés complexantes. Le quenching est dit indirect.

Préparation des solutions

Les différentes mesures de quenching de fluorescence ont été réalisées à 25°C :

- **Sur l'eau de la Moselle filtrée à 0,2 µm sur filtres en polycarbonate (Whatman).**
Deux prélèvements ont été réalisés (juillet et octobre 2003). Le pH n'a pas été ajusté.

- **Sur des suspensions d'acides humiques synthétiques de 10 mg/L préparées dans de l'eau ultra-pure et ajustées à pH 8 avec HCl (0,1 N).**

Aucun tampon ou sel de fond n'a été utilisé pour cette partie, étant donné la faible concentration de travail (choisie pour sa pertinence environnementale) et la sensibilité de la technique aux variations du milieu. Par ailleurs, nous voulions nous affranchir de problèmes d'interférences engendrés par l'ajout d'un composé supplémentaire.

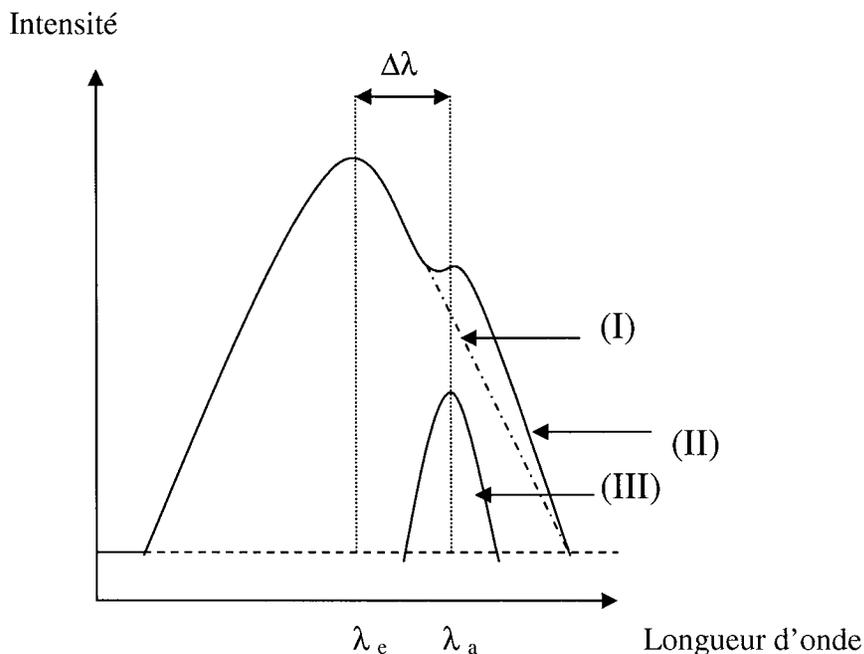
Plusieurs solutions mères en polluants ont été préalablement préparées pour réaliser les ajouts dosés (voir II.2 de ce chapitre). Des volumes variables (50 à 200 μ L) de ces différentes solutions ont été ajoutés aux solutions d'acide d'humique (20 mL). Après homogénéisation par agitation, les solutions ont été laissés à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 4 à 6 heures. Ce temps a été choisi en fonction des temps d'équilibre nécessaires pour les solutions de tensio-actifs (Adamson, 1990). Le pH des solutions d'acide humique avec les polluants est contrôlé avant chaque mesure et réajusté si besoin avec des solutions de soude et d'acide chlorhydrique de concentrations adéquates selon le mélange. Les concentrations en polluants ont été calculées pour travailler dans les gammes représentatives pour notre étude (voir partie II.2.).

- **Sur des solutions d'acide humique naturel.**

La dissolution de ces poudres lyophilisées est plus longue et nécessite une préparation sous agitation au moins 48 heures à l'avance avant la réalisation des expériences avec les polluants. D'autre part, la faible intensité de fluorescence du premier acide humique naturel extrait des MES (AHN1) ne nous permettait pas de réaliser des mesures quantitatives de quenching pour une concentration de 10 mg/L. La concentration minimale pour laquelle le signal de fluorescence des composantes humiques principales était assez significatif (notamment en comparaison du pic de vibration Raman) était de 30 mg/L. Nous avons donc réalisé, uniquement pour cet extrait, les mesures de quenching à cette concentration. Les fentes des monochromateurs d'analyse et de mesure ont été fixées à 2 nm (vitesse de balayage de 1 nm/s) pour toute l'étude de quenching de fluorescence des substances humiques et des matières organiques contenues dans l'eau de rivière.

d) L'excitation- émission synchrone (ou méthode à pas constant)

Cette méthode consiste à enregistrer le signal de fluorescence en gardant un écart (ou pas) constant entre les longueurs d'onde d'excitation et d'analyse. Dans la mesure où les tailles des fentes des monochromateurs d'excitation et d'analyse sont plus larges que l'écart qui existe entre les longueurs d'onde d'excitation et d'analyse, le spectre d'émission observé est constitué, aux faibles concentrations en corps fluorescent, d'une bande de diffusion intense avec, en épaulement, la bande d'émission de fluorescence (Figure II.1(6)).



- (I) spectre réel
- (II) spectre de diffusion
- (III) spectre de fluorescence théorique
- λ_e longueur d'onde d'excitation
- λ_a longueur d'onde d'analyse
- $\Delta\lambda$ la différence entre l'excitation et l'analyse

Figure II.1(6)
Principe de l'excitation- émission synchrone.

L'intensité I mesurée à la longueur d'onde d'analyse λ_a correspond donc à une superposition du spectre de fluorescence et du spectre de diffusion, et il est très délicat d'estimer la concentration en corps fluorescent. En revanche, si l'on décale simultanément les longueurs d'onde d'excitation et d'analyse en maintenant entre elles un « pas constant », la mesure peut être améliorée. Nous savons que :

- le spectre d'émission de la lampe est indépendant de la longueur d'onde d'excitation,
- le spectre de diffusion est aussi indépendant de la longueur d'onde d'excitation,

- les spectres d'absorption, d'émission et de diffusion (notamment de nos molécules d'acides humiques) peuvent être modélisés par des triangles (Lakowicz, 1999).

Les conditions d'acquisition ont été choisies en respectant l'étude de Fang et al., 1998 : les fentes des monochromateurs à l'excitation et à l'émission ont été respectivement de 5 et 10 nm. Le balayage des spectres est de 1 nm/s pour des longueurs d'onde d'excitation de 300 à 550 nm.

e) L'excitation- émission matricielle (EEM)

Cette technique permet d'avoir l'empreinte globale de l'émission de fluorescence sur la totalité du domaine spectral que l'on souhaite étudier. Il s'agit d'une représentation visuelle tri-dimensionnelle.

L'enregistrement des spectres d'émission de fluorescence est automatique (avec l'appareil utilisé). Le pas entre les différentes longueurs d'onde à l'excitation a été de 5 nm et la vitesse de balayage de 4 nm/s. Les plages de longueurs d'onde en excitation et émission ont été respectivement 250-500 et 250-600 nm. Les corrections de l'effet Rayleigh (1^{er} et second ordre) sont effectuées par une correction interne au logiciel DATAMAX d'acquisition. Les fentes des 2 monochromateurs ont été fixées à 2 nm.

f) Précautions analytiques

Dérive de l'appareillage dans le temps

La mesure de l'intensité de fluorescence est une mesure relative, qui est liée à l'appareil (lampe, monochromateur, fentes, photomultiplicateur,...). C'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser une référence. Dans notre cas, une solution de fluorescéine 0,16 mg/L dans l'eau (tamponnée à pH 10 avec de la soude et protégée de la lumière) a été utilisée avant chaque série de mesure pour se recalibrer en intensité de fluorescence (excitation 472 nm-maximum d'émission mesuré à 512 nm) et permettre la stabilité du signal entre 2 séries de mesures.

Autres paramètres à contrôler pour les mesures de fluorescence des molécules humiques seules en solution et en présence de pyrène

La fluorescence est une technique très sensible fortement dépendante des conditions physico-chimiques du milieu de mesure et donc des modalités de préparation des échantillons.

*** Force ionique**

Il est généralement considéré qu'une force ionique équivalente de 0 à 1 M de KCl dans le milieu affecte très peu les caractéristiques spectrales de fluorescence des matériaux humiques (Mobed et Hemmingsen, 1996). Les variations enregistrées pour les mesures de fluorescence à différentes valeurs de forces ioniques sont insignifiantes, même s'il a tout de même été constaté une faible diminution des coefficients de diffusion moléculaires en présence de sels.

*** pH**

De nombreux auteurs ont montré que le pH est un paramètre à prendre en compte pour la description des spectres de fluorescence des acides humiques (Pullin et Cabaniss, 1995). Par exemple, Buffle et al., 1982, ont montré qu'un pH compris entre 4 et 8 était optimal pour comparer des eaux de rivière, alors que Mobed et Hemmingsen, 1996, utilisent un pH 6 pour distinguer différentes espèces fluorescentes de matière organique aquatique.

*** Absorption (effets de filtres internes primaires et secondaires)**

Nous présenterons les corrections de filtres internes dans le cas de notre système d'enregistrement, c'est-à-dire lorsque la fluorescence est enregistrée perpendiculairement à l'excitation et est détectée à partir du centre de la cuve (ce qui nécessite un alignement parfait préalable pour les faisceaux d'analyse et de mesure).

Dans cette configuration, la lumière excitatrice traverse la cuve de mesure de la surface jusqu'au centre (1) et la lumière émise traverse la cuve du centre jusqu'à la surface (2). Du fait de la densité optique de la solution à la longueur d'onde d'excitation, une partie de la lumière excitatrice est absorbée par la solution à la surface de la cuve. L'intensité de la lumière incidente diminue au fur et à mesure que cette lumière traverse la cuve. Ainsi, l'intensité de la lumière qui excite réellement la solution au centre de la cuve est inférieure à celle de la lumière excitatrice provenant de la source lumineuse. Cet effet de filtre interne est qualifié de primaire ((3) Figure II.1(7)).

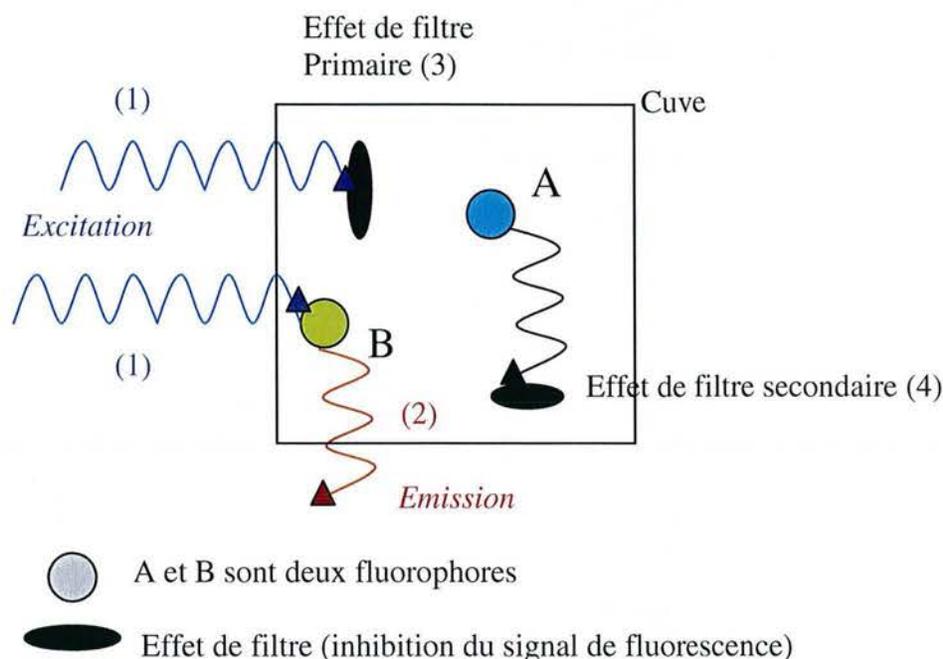


Figure II.1(7)

Mécanismes des effets de filtre pour des mesures à 90° entre la lumière excitatrice incidente et le signal de fluorescence émis (Mc Donald et al., 1997).

Par ailleurs, si la densité optique de la solution est importante à la longueur d'onde d'émission, une partie de la lumière émise par l'échantillon au centre de la cuve est absorbée par la solution. Ainsi la lumière mesurée qui atteint la surface interne de la cuve de fluorescence, aura une intensité inférieure à celle émise du centre de la cuve de fluorescence. C'est l'effet de filtre secondaire (4).

Ces effets sont aléatoires, puisqu'ils dépendent de la localisation du fluorophore dans la cuve (A ou B), à savoir des trajets optiques des photons incidents et émis de la cuve.

Si la solution est inhomogène (cas des suspensions avec agrégats), l'effet intervient de façon non systématique pour les molécules fluorescentes en solution.

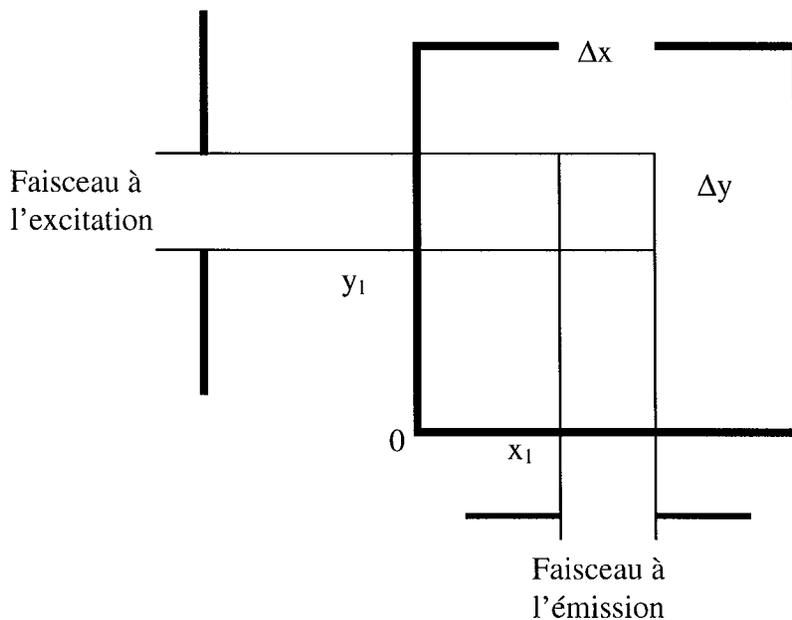
Les corrections appliquées dépendent en premier lieu du comportement (absorption/émission) des chromophores en solution. Il faut établir une formule empirique de correction des intensités de fluorescence mesurées, tenant compte des densités optiques à l'excitation et à l'émission, fonction du type de molécule organique étudiée. Par ailleurs, la correction dépend également de l'appareillage utilisé, puisqu'elle est fonction des trajets optiques, mais également de la quantité de lumière incidente et émise (déterminée par la source et les largeurs de fentes des monochromateurs d'analyse et de mesure).

Pour les substances humiques, Mc Donald et al., 1997, ont établi une formule de correction tenant compte de ces paramètres d'appareillage et des propriétés des différents chromophores. Si l'on désigne par I_{cor} l'intensité corrigée de ces effets, I_{obs} l'intensité de fluorescence « brute » mesurée et fc le facteur de correction, la formule proposée par Mac Donald, 1997, est donnée par le système suivant :

$$\left\{ \begin{array}{l} I_{cor} = fc * I_{obs} \\ fc = \frac{2,3.A_{ex}.\Delta x.10^{-A_{ex}x_1}}{1 - 10^{-A_{ex}\Delta x}} \frac{2,3.A_{em}.\Delta y.10^{-A_{em}y_1}}{1 - 10^{-A_{em}\Delta y}} \end{array} \right. \quad (\text{équations [II.1(2)])}$$

avec A_{ex} et A_{em} les absorbances des solutions de matière organique dissoute aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectives.

Les paramètres géométriques (Δx , x_1 , Δy et y_1) représentés sur la Figure II.1(8) ont été déterminés comme le propose Fang, 1997. Ainsi, Δy et y_1 ont été simplement mesurés à l'aide d'une règle quand le faisceau d'excitation était en lumière verte (500 nm) avec des fentes d'excitation de 5nm. Dans notre étude, nous avons obtenu $\Delta y = 0,4$ cm et $y_1 = 0,05$ cm. Comme le faisceau émis est très difficile à observer, nous avons repris les hypothèses de travail proposés par Fang, 1997 et Fang et al., 1998, et considéré $\Delta x = 0,4$ cm et $x_1 = 0,05$ cm.



x_1 et y_1 sont des positions du faisceau respectivement à l'émission et à l'excitation.
 Δx et Δy sont les largeurs des fentes à l'émission et à l'excitation.

Figure II.1(8)

Coupe d'une cuve montrant les différents paramètres utilisés dans les formules de correction de Mac Donald et al., 1997 et de Fang et al., 1998.

Nous avons également testée la formule établie par Auger et al., 1995, plus générale et établie pour de nombreuses solutions de molécules organiques. La formule de correction est la suivante :

$$I_{cor} = I_{obs} 10^{(A_{ex} + A_{em})/n} \quad \text{équation [II.1(3)]}$$

avec n un paramètre empirique déterminé par le rapport entre le trajet optique effectif utilisé en absorbance UV (10 mm dans notre cas) sur le trajet effectif d'émission de fluorescence. En principe, n dépend uniquement de la géométrie de l'appareillage et indépendant des espèces considérées. Pour une mesure à 90° , la valeur de n est donc de 2.

Dans le cas des mesures avec le pyrène, le problème est plus complexe, puisqu'il s'agit d'un système à deux chromophores. Dans les études de polarité, nous nous intéressons à l'émission de fluorescence du pyrène, nous avons donc choisi de soustraire tout d'abord la fluorescence intrinsèque due aux substances humiques à la fluorescence totale, puis d'utiliser la formule d'Auger en prenant en compte les valeurs d'absorbance des solutions contenant l'acide humique et/ou le pyrène (aux 2 longueurs d'onde d'émission I_1 et I_3 voir ARTICLE I ou I_2 qui nous ont intéressés dans nos études de polarité et de quenching respectivement). Le premier effet de filtre (effet de peau) dû à l'absorption du faisceau incident s'applique pour tous les fluorophores du milieu, dans notre cas pour l'acide humique et le pyrène. La correction sur l'absorption à l'excitation (A_{ex}) est donc celle du mélange d'acide humique/pyrène. L'effet de filtre secondaire est une correction de l'absorption des chromophores « quencheurs » de la fluorescence des fluorophores. Dans le cas du quenching du pyrène (où l'acide humique joue le rôle de quencheur), il est nécessaire de corriger les effets de filtre interne dus principalement à l'acide humique seul en solution. Nous pouvons noter qu'aux longueurs d'onde principales d'analyse de cette étude avec le pyrène (372, 377 et 382 nm, *i.e.* respectivement I_1 , I_2 et I_3), l'absorption due au pyrène influe peu son émission de fluorescence, étant donné le faible recouvrement entre ses spectres d'absorption et d'émission (voir chapitre III).

Nous avons retenu la correction d'Auger pour toutes nos mesures (quenching et polarité) pour deux raisons :

- elle permet de corriger les effets de filtre pour toutes nos fractions d'acides humiques naturels et synthétiques sur la totalité de la gamme de concentrations choisies en matière organique (0-100 mg/L pour les substances humiques synthétiques et

0-300 mg/L pour les essais avec les substances humiques naturelles) et aux différentes longueurs d'onde d'excitation (principalement à 270 nm et 350 nm pour les essais de quenching de fluorescence et 332 nm pour les essais de mesures de polarité avec la sonde pyrène. Nous le montrons à titre d'exemple pour l'acide humique synthétique catéchol/glycine (AHCG > 8 kDa) à la Figure II.1(9).

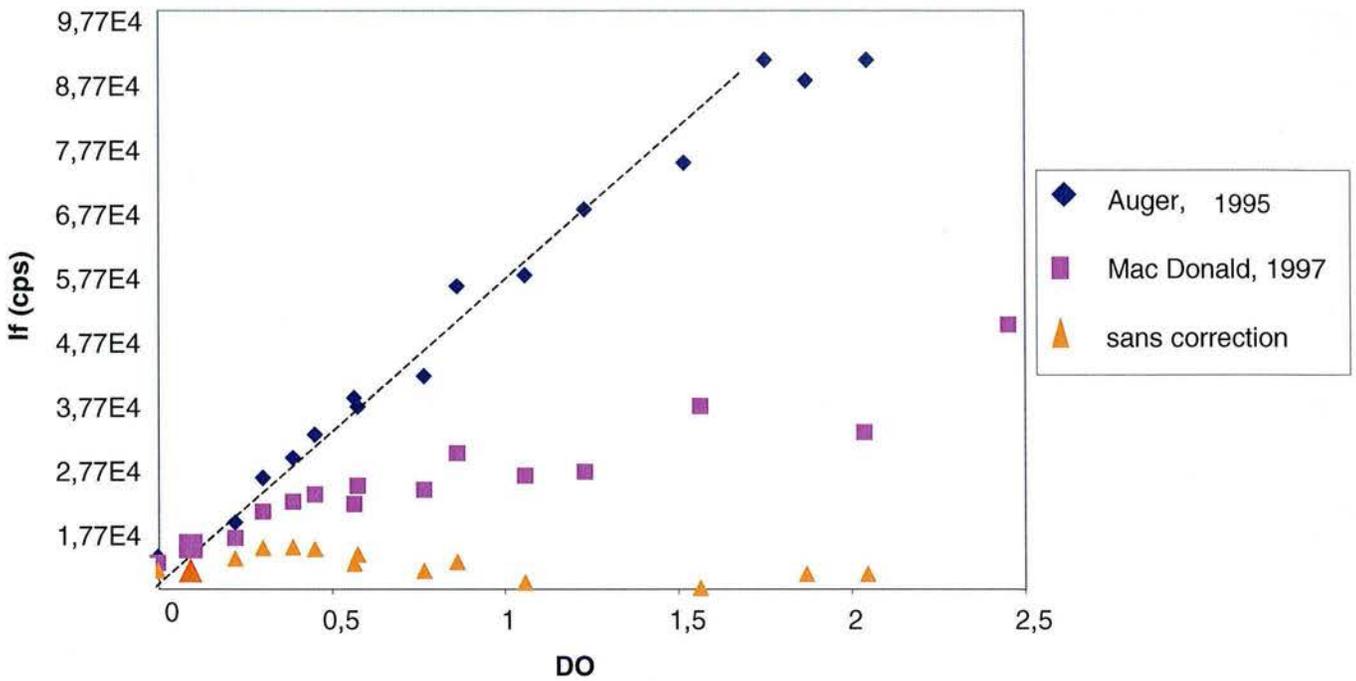


Figure II.1(9)

Influence de la correction de l'effet de filtre interne pour les solutions d'acide humique synthétique AHCG: intensité de fluorescence I_f à 377 nm, excitation 332 nm en fonction de la densité optique DO des solutions à 332 nm.

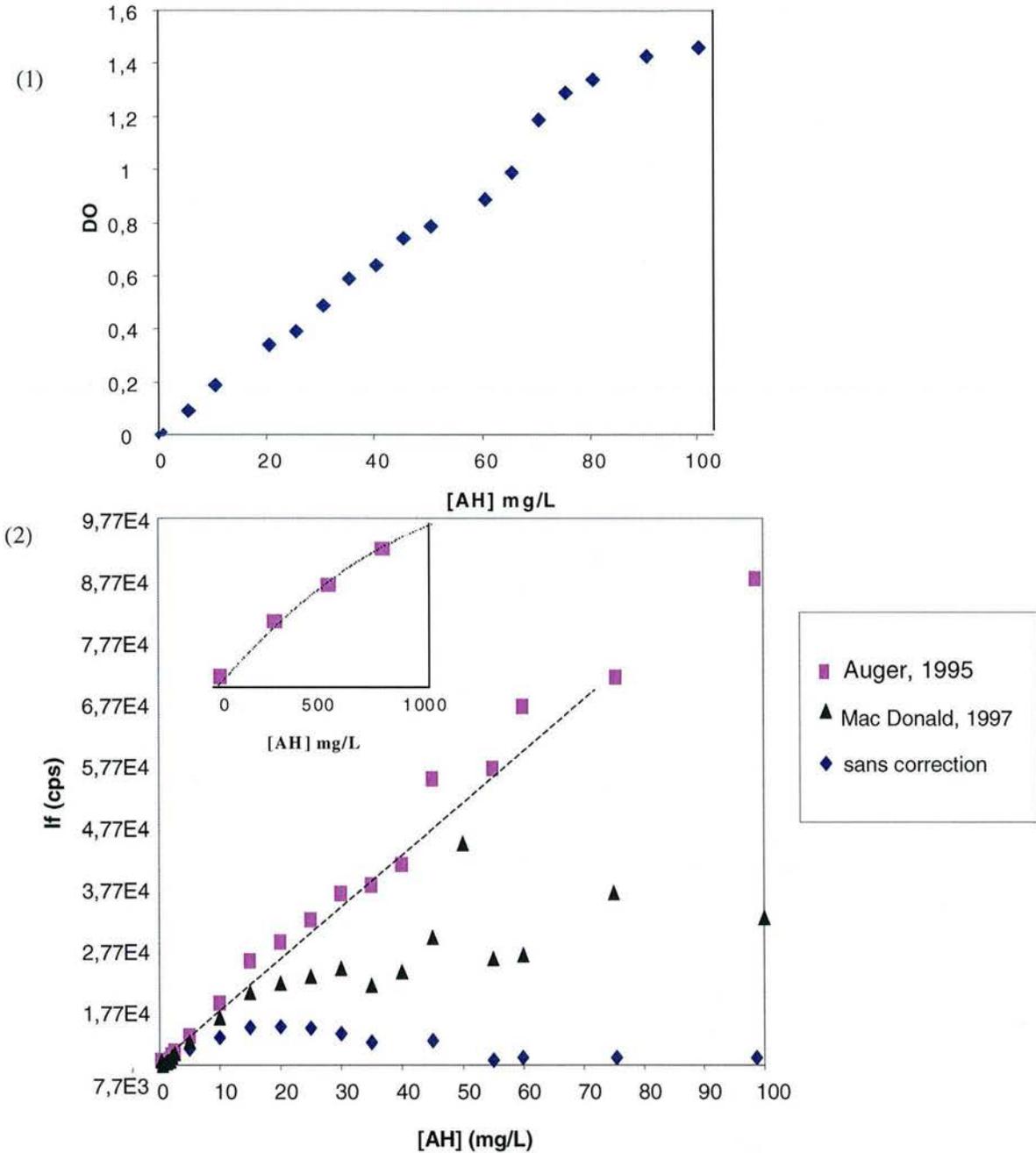


Figure II.1(10)

(1) Densité optique DO à 332 nm des solutions d'acide humique AHCG en fonction de la concentration.

(2) Intensité de fluorescence I_f à 377 nm, excitation 332 nm pour les solutions d'acide humique AHCG en fonction de la concentration selon les différents auteurs de la littérature.

Nous constatons que pour les concentrations de 0 à 20 mg/L environ de substances humiques, il n'apparaît pas de modifications notables de fluorescence des molécules humiques qui seraient dues notamment à des phénomènes parasites d'absorption. Au-delà de cette concentration, une correction de l'absorption s'avère indispensable pour pouvoir

comparer rigoureusement différentes fractions et/ou sources de matière organique (Mobed et Hemmingsen, 1996). Pour tous les essais de quenching de fluorescence, nous avons travaillé dans cette zone de linéarité (concentration de 10 mg/L), sauf dans le cas des expérimentations réalisées sur l'acide humique naturel extrait 1, pour des raisons d'une insuffisance de rapport signal/bruit en émission de fluorescence (30 mg/L).

Pour nos essais nécessitant ces corrections, nous avons toujours utilisé la formule de correction d'Auger et al., 1995.

*** Procédure d'extraction des acides humiques**

Belin et al., 1993, ont montré que les procédures d'extraction par résine XAD 8 et XAD 4 permettaient d'obtenir des molécules humiques strictement similaires en terme de comportement de fluorescence comparées à celles obtenues par ultrafiltration tangentielle. Engebretson et Von Wandruska, 1999, ont mis en évidence l'importance de la procédure d'extraction des acides humiques naturels. En comparant la procédure d'extraction standard sur résine avec une extraction utilisant une étape de déminéralisation par traitement acide (HCl/HF), les auteurs ont montré que les AH traités avec HF séquestraient davantage le pyrène, ce résultat pouvant s'interpréter par l'obtention d'AH moins conjugués lors de l'extraction par HF présentant donc une flexibilité plus grande, engendrant elle-même une capacité plus importante à former des structures aptes à piéger le pyrène.

Pour nos extractions, nous n'avons donc pas effectué de purification finale des substances humiques obtenues par HF.

*** Température**

Kumke et al., 2000, ont montré que la fluorescence mesurée pour des systèmes pyrène-acides humiques à ultra-basse température (10 K) permettait de s'affranchir de l'effet de filtre interne et de la fluorescence intrinsèque des substances humiques. En effet, en spectroscopie laser pulsée résolue dans le temps, on peut mesurer la fluorescence de la sonde seule en travaillant à une échelle de temps de quelques centaines de nanosecondes, durée correspondante au temps de vie du pyrène à l'état excité et qui est fortement supérieure à celle des AH. A ultra-basse température, en bloquant certaines transitions vibrationnelles, on pourrait ainsi s'affranchir du quenching dynamique de fluorescence et observer les différentes étapes de liaison entre l'AH et les polluants.

La spectroscopie de fluorescence à basse température permettrait également d'augmenter la résolution des spectres de fluorescence. Ce paramètre de mesure a été étudié par Matsuzawa et al., 1995, pour des composés polycycliques aromatiques nitrés et aminés.

Nous avons effectué toutes nos mesures de fluorescence à 25°C +/-0,1°C (système de thermostat Grant (LTD6G, Sarose, Royaume-Uni)).

*** *Oxygène dissous***

L'oxygène dissous peut perturber les mesures de fluorescence du pyrène. Danielsen et Chin, 1995, ont confirmé la possibilité d'une augmentation notable du quenching dynamique du pyrène par l'oxygène dissous en présence d'acides humiques ou fulviques. L'explication mécanistique de ce résultat a été très discuté par Green et Blough, 1994 et 1996, et par Chin et al., 1996.

Nous avons testé l'influence de ce paramètre également (voir ARTICLE I).

*** *Cations compensateurs et sels interférents***

Un certain nombre de sels ajoutés au milieu peuvent affecter la décroissance du signal de fluorescence du pyrène dans le temps. Grätzel et Thomas, 1973, ont montré que l'ajout de Mg^{2+} pour des micelles de SDS ou de Br^- pour des micelles de CTAB accélérât la diminution de l'efficacité du quenching de fluorescence du pyrène dans le temps. L'ajout d'ions SO_4^{2-} ou de molécules neutres (comme les dérivés d'alcool benzylique) aux micelles de SDS augmentent par contre l'efficacité du quenching : cela pourrait s'expliquer d'après ces auteurs par un bouleversement total de l'ordre en solution et l'éclatement des micelles formées. Ces résultats ont été confirmés dans cette étude par des mesures de polarisation de fluorescence. En ce qui concerne le pyrène seul, Von Wandruska, 1992, a montré que Br^- était un quencheur important de fluorescence de cette sonde, Cl^- également, mais d'une moindre façon.

Ragle et al., 1997, ont étudié l'influence de la force ionique, du pH et du type de cation associé aux acides humiques sur la fluorescence du pyrène.

II.1.1.2. Les mesures de tension de surface à l'interface eau/air

La méthode de la plaque de Wilhelmy est particulièrement adaptée pour observer la modification des propriétés de surface d'un support lorsqu'il est plongé dans l'eau ou dans une solution. Parmi les effets classiquement observés, on noté la réhydratation et le gonflement des hydrogels, le lavage d'une surface par la mise en solution de fragments hydrophiles physisorbés sur des surfaces hydrophobes, le réarrangement de chaînes à la suite de cycles d'immersion et d'émersion (passage d'un environnement hydrophile à un environnement hydrophobe et inversement), l'adsorption de polymères, de molécules tensioactives ou d'ions monoatomiques sur des sites superficiels en solution.

Les mesures de tension superficielle ont été effectuées par l'analyse des angles de contact selon la méthode de Wilhelmy à l'aide d'une microbalance DCA 322 commercialisée par Cahn (Beverly, Massachusetts, Etats-Unis) dans un réacteur thermostaté à 25°C. Le principe de la mesure est décrit à la Figure II.1(11).

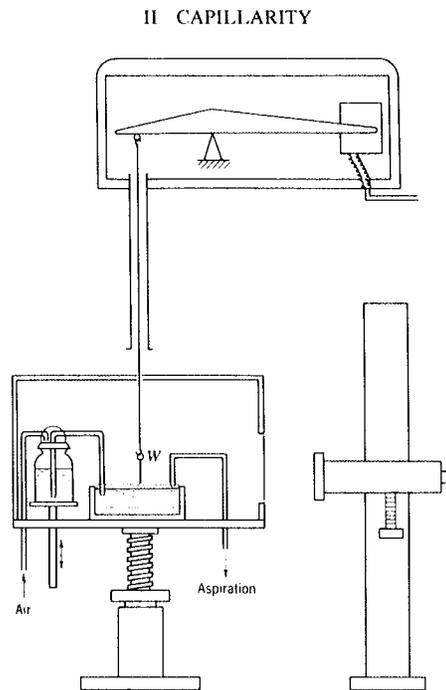


Figure II.1(11)
Tensiomètre (Adamson, 1990).

Une lame en verre parfaitement propre d'épaisseur constante e , de longueur L ($e \ll L$) est plongée dans un liquide mouillant. Le liquide exerce sur elle une force d'attraction qui dépend de la nature du liquide et de la longueur de la lame (Figure II.1(12)).

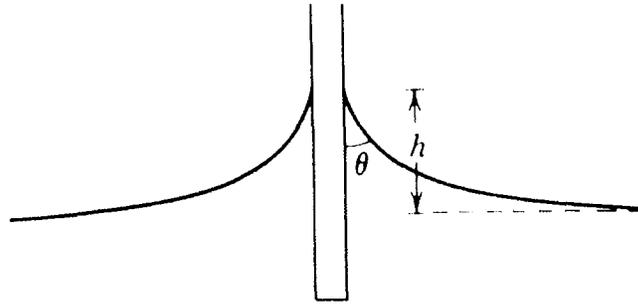


Figure II.1(12)
Comportement d'un liquide sur la paroi d'une plaque immergée verticalement.

Lorsque l'on dépose une goutte de liquide à la surface d'un solide, deux situations peuvent apparaître (Figure II.1(13)) :

- Le liquide mouille parfaitement le solide et la goutte d'eau s'étale sur toute la surface (Figure II.1(13)a),
- Le liquide ne mouille pas correctement le solide et il se forme alors une goutte qui peut être caractérisée par l'angle de contact θ au point triple solide- liquide- vapeur. Dans le cas d'un solide peu mouillant θ est compris entre 0 et 90°, alors qu'il est supérieur à 90° dans le cas d'un liquide non-mouillant (Figure II.1(13)b)).

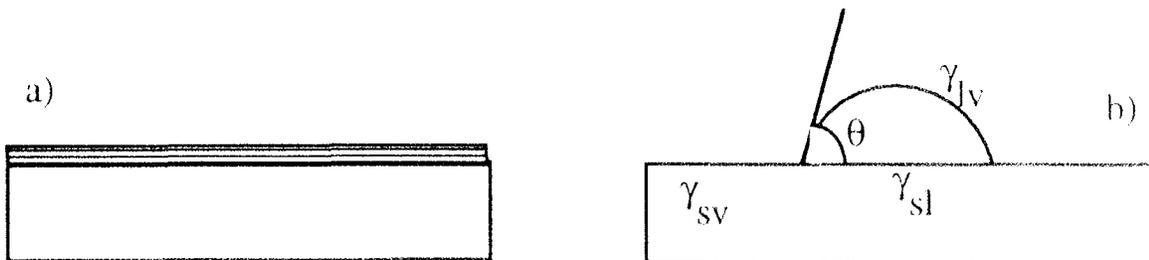


Figure II.1(13)
Comportement d'une goutte d'eau à la surface d'un solide.

Dans les cas de l'eau, le solide est dit hydrophobe s'il n'est pas mouillé par l'eau et hydrophile s'il est partiellement mouillé par l'eau.

Les forces capillaires engendrent la déformation de la surface du liquide, qui, à l'équilibre, sont contrebalancées par le poids du ménisque ΔW :

$$\Delta W = p \times \gamma_{lv} \times \cos \theta \quad (\text{équation [II.1(4)])}$$

où p est le périmètre de la plaque, γ l'énergie de surface ou la tension superficielle.

Il est alors possible de déterminer directement les forces de mouillage en mesurant la force appliquée au solide en fonction de la profondeur d'immersion. Le bilan des forces appliquées conduit à l'équation de Wilhelmy :

$$F = m.g - \Delta\rho.g.s.x + p.\gamma_{lv}.\cos\theta \quad (\text{équation [II.1(5)])}$$

où F est la force mesurée, s la section du solide et x la profondeur d'immersion comptée par rapport à la surface du liquide. Le premier terme correspond donc au poids de l'échantillon, le deuxième à la force due à la poussée d'Archimède et le troisième à la force de mouillage du solide.

En pratique, on réalise plusieurs cycles d'immersion et d'émersion, pour déterminer la force au zéro d'immersion à partir de la constante obtenue par régression linéaire, la pente correspondant au terme lié à la poussée d'Archimède.

Le périmètre étant connu (mesure des dimensions exactes de la plaque grâce à un pied à coulisse), la connaissance de la tension superficielle liquide-vapeur permet de déterminer l'angle de contact ou, à l'inverse la connaissance de l'angle de contact (si le solide est parfaitement mouillé par le liquide, $\cos\theta = 1$) permet de déterminer la tension superficielle.

Nous avons utilisé des couvre-lames de silice de dimension moyenne $18 * 18 * 0,15$ mm. Afin de corriger les résultats obtenus de la poussée d'Archimède, nous avons mesuré les dimensions exactes de chaque couvre-lame à l'aide d'un pied à coulisse.

Avant toute analyse, les lames sont nettoyées à l'acide sulfochromique puis abondamment rincées avec de l'eau ultra-pure (Millipore $18,2$ m Ω /cm), étuvées une nuit puis passées sur une flamme oxydante. Pour chaque solution, 2 cycles ont été réalisés à 100 μ m/s afin de vérifier la reproductibilité des deux cycles et de déterminer la présence éventuelle de contaminants à la surface du liquide. Les tensions superficielles ont été calculées à partir de la mesure de la force de retrait.

La tension superficielle de l'eau pure à 25°C est de 72,1 dyne/cm (Japser, 1972). Cette valeur a été remesurée avant chaque série d'expériences afin de vérifier la qualité de l'eau ultra-pure servant à la préparation des solutions ¹⁰.

Les solutions d'acides humiques seules ou en présence de tensio-actifs ont été préparées de la même façon que celles servant aux analyses de spectrométrie (UV/Visible et fluorescence, voir II.1.4). Nous avons choisi d'ajuster le pH (à 8) lors de la préparation des solutions (fractions d'AH seules ou en présence de tensio-actifs), puis de laisser reposer les suspensions 4 h à l'abri de la lumière.

La Figure II.1(14) montre que les angles de contact à l'immersion et à l'émersion sont différents.

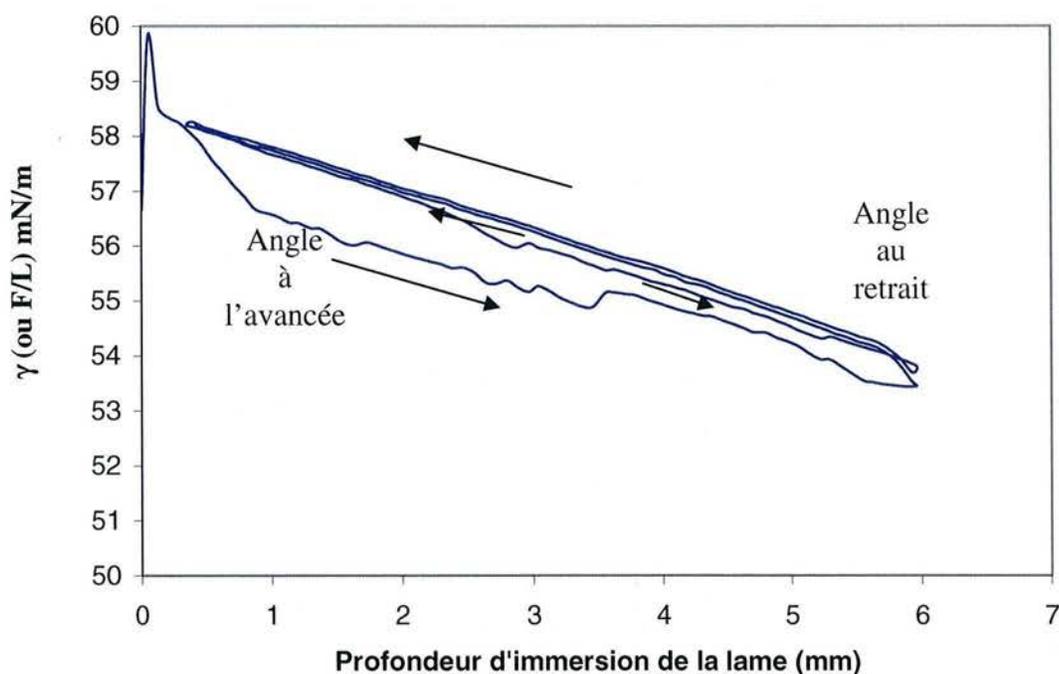


Figure II.1(14)
Visualisation du phénomène d'hystérésis pour une solution contenant des traces de tensio-actifs ou des impuretés.

Ces angles sont classiquement appelés angle à l'avancée et angle au retrait. La différence entre ces deux valeurs est appelée hystérésis. Dans le cas où les macromolécules d'acide humique ont la possibilité de changer de conformation ou voient des variations dans

¹⁰ Pour les deux tensio-actifs utilisés (CTAB et SDS), nous avons vérifiés les valeurs obtenues pour leur CMC avec les données de la littérature.

leur environnement chimique, la plaque de verre est donc susceptible de déceler ce phénomène de réorientation moléculaire à l'interface. L'angle à l'avancée exprime alors la tendance hydrophobe et l'angle au retrait la tendance hydrophile de la solution analysée.

De manière classique, (Johnson et al., 1986), l'adsorption des polymères à la surface de la lame de verre entraîne l'augmentation de l'angle de contact à l'avancée, indiquant l'écrantage de sites de forte énergie de la surface de la lame. Cependant, on a pu montrer que l'angle au retrait reste constant et égal à zéro. Ainsi, la plaque est parfaitement mouillée par le liquide analysé, et $\cos \theta = 1$ au retrait, donc on peut déterminer la tension superficielle solide-liquide à partir de la constante déterminée au zéro d'immersion (Figure II.1(15)).

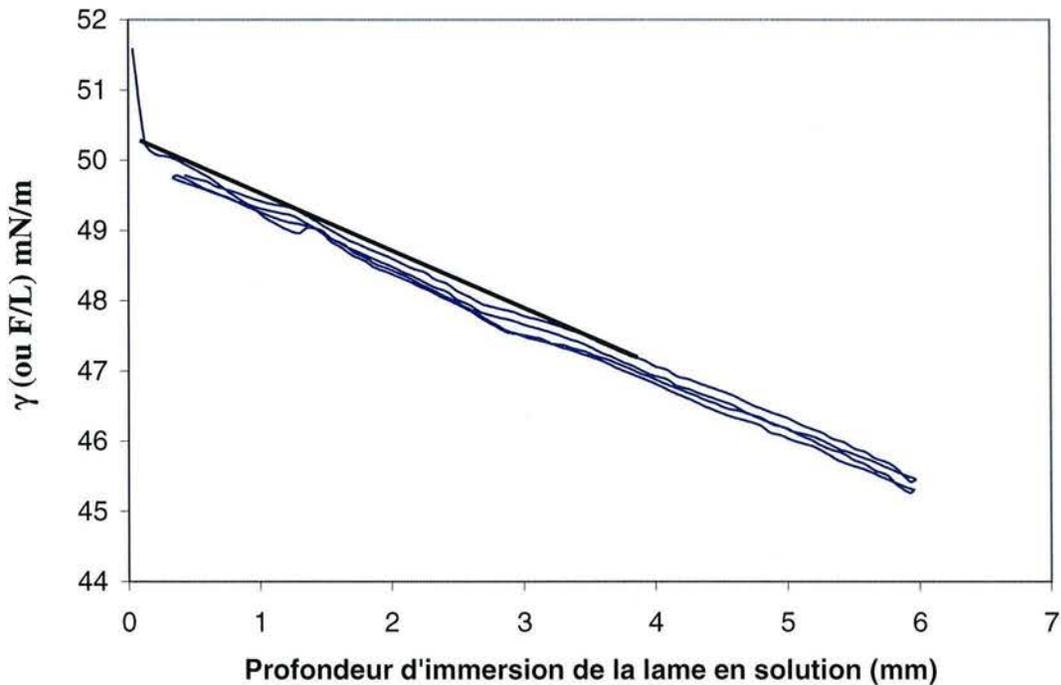


Figure II.1(15)
Détermination de la force au zéro d'immersion,
cas d'une solution de type polyélectrolyte ou gel.

II.1.2. Méthodes associées à la traitabilité de la MO

II.1.2.1. Préparation des suspensions à traiter par coagulation

Pour les essais sur l'eau de la Moselle, deux précautions ont été prises :

- les essais de coagulation ont toujours été effectués le lendemain du prélèvement, pour laisser stabiliser l'eau à température ambiante. En effet, nous avons eu des difficultés pour décanter les floccs formés entre la matière organique et le coagulant pendant la période hivernale des prélèvements. Lorsque l'eau était à une température inférieure à 10°C, les floccs formés avaient tendance à osciller de façon naturelle entre des phases de décantation et de remise en suspension des agrégats. Ce phénomène est probablement dû à la convection provoquée par la mise en équilibre thermique des coagulums. Afin de faciliter la lecture et d'optimiser la séparation des sédiments, nous avons donc choisi de travailler de la sorte, les jerricans de prélèvements étant fermés et conservés au laboratoire à l'abri de toute exposition lumineuse trop violente.
- les jerricans ont tous été réagités avant de prélever le volume d'eau nécessaire aux essais.

Toutes les solutions d'acides humiques naturels (extraits des MES) ou synthétiques ont été rigoureusement préparées de la même façon.

30 mg d'AH en poudre lyophilisée ont été pesés avec 336 ppm de NaHCO₃ et dissous dans des fioles jaugées de 1 L d'eau ultra-pure MilliQ® (Millipore, Billerica, Massachusetts, Etats-Unis)). La quantité de NaHCO₃ utilisée correspond à la teneur moyenne annuelle en hydrogéné-carbonate de sodium dans l'eau de la Moselle. La teneur en acide humique correspond à une concentration en carbone organique total de 12 mg/L qui est la valeur déterminée pour la Moselle pour au moins un de nos prélèvements (les valeurs moyennes sont légèrement inférieures pour la Moselle en amont de Nancy). Pour le premier extrait d'acide humique naturel (extrait des MES prélevées en juillet 2003 ou AHN1), la dissolution totale de l'acide humique lyophilisé a été plus longue (24 h d'agitation des solutions avec l'hydrogénocarbonate ont été nécessaires pour avoir une dissolution totale de l'acide humique).

Le pH initial de nos solutions d'acide humique synthétiques et naturels a été ajusté avec des solutions de soude et/ou d'acide chlorhydrique de concentrations appropriées afin d'ajouter un minimum de base ou d'acide.

Pour les études concernant le statut de la matière organique associée au fer (chapitre V), nous avons utilisé deux pH initiaux de travail : pH 6 et 8. D'après Narkis et Rebhun, 1977, la plus grande partie des groupements fonctionnels des acides humiques sont dissociés à pH 8. Par ailleurs, il a été établi que le pH optimal de coagulation en traitement de l'eau était compris entre 5 et 6 (Edzwald, 1993). Il était donc intéressant d'étudier l'éventuelle différence de spéciation et comportement de la matière organique en solution pour ces deux pH de coagulation.

Pour les essais de coagulation réalisés en présence du pyrène (considéré en tant que polluant), 1 mL d'une solution mère de pyrène à 10^{-3} M dans l'éthanol a été initialement ajouté au litre de mélange avant ajustement du pH à 8. Pour cette série d'expérience, nous n'avons travaillé qu'à pH 8, étant donné que le pH annuel moyen de la Moselle est de 7,5 à 8,5 (hors évènements particuliers). L'objectif n'était en effet plus de comprendre les mécanismes de coagulation, mais de répondre au problème « pratique » du relargage éventuel du polluant lors des opérations de traitement de l'eau.

II.1.2.2. Description des essais de coagulation : les jar-tests

Les solutions ainsi préparées sont agitées à 100 tours/min. A $t = 0$, on ajoute une certaine quantité d'électrolyte (solution mère à 0,1 M de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), l'agitation se poursuit pendant 20 min. Au terme de ces 20 min, l'eau est placée dans un cône de Imhof où elle décante pendant 30 min. Des mesures directes sont réalisées sur le surnageant au bout de ces 30 min (turbidité, volume sédimentaire). En raison des différences de densité et compacité des floccs formés selon la matière organique considérée (eau de rivière, acide humique naturel ou extrait), les mesures finales de pH, conductivité et turbidité (surnageants) ainsi que la lecture du volume sédimentaire et la récupération des sédiments des cônes sont effectuées au bout de 24 heures de décantation. La Figure II.1(16) illustre ces différentes étapes de jar-tests.

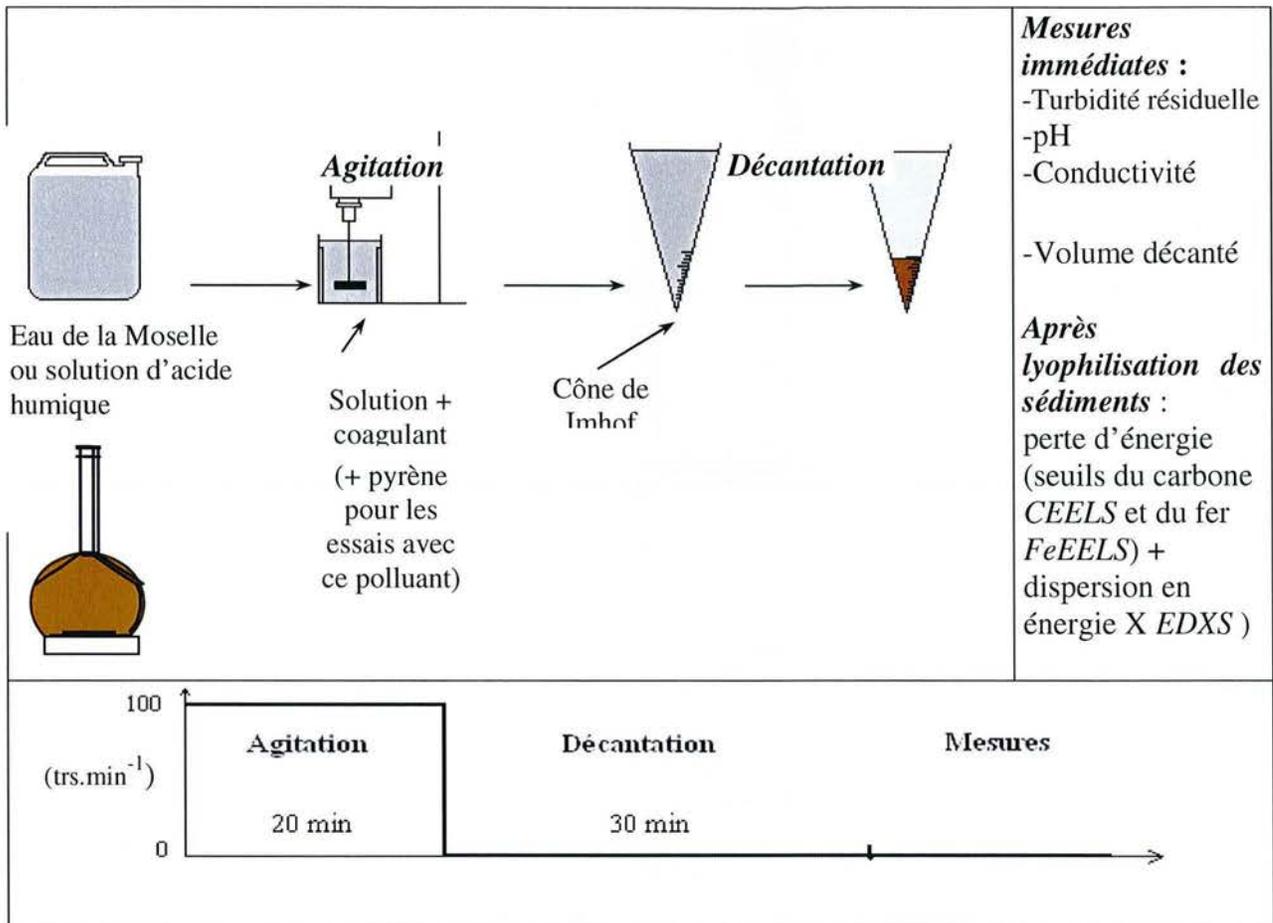


Figure II.1(16)
 Protocole du jar-test.

Pour la formation des floccs, les caractéristiques de l'agitation sont très importantes et il convient de les maîtriser au mieux. Pour ce faire, un type particulier de réacteur est utilisé. Ce réacteur est du type « pale-bécher » qui se compose des évènements suivants (Figure II.1(17)) :

- d'un bécher d'une contenance de 1 litre muni de 4 baffles en plexiglas afin d'éviter la formation d'un vortex à vitesse d'agitation élevée et d'assurer une agitation homogène dans l'ensemble du réacteur,
- d'une pale rectangulaire située au tiers inférieur du bécher,
- et d'un moteur qui permet d'obtenir des vitesses de rotation de la pale comprises entre 60 et 2 000 tours.min⁻¹.

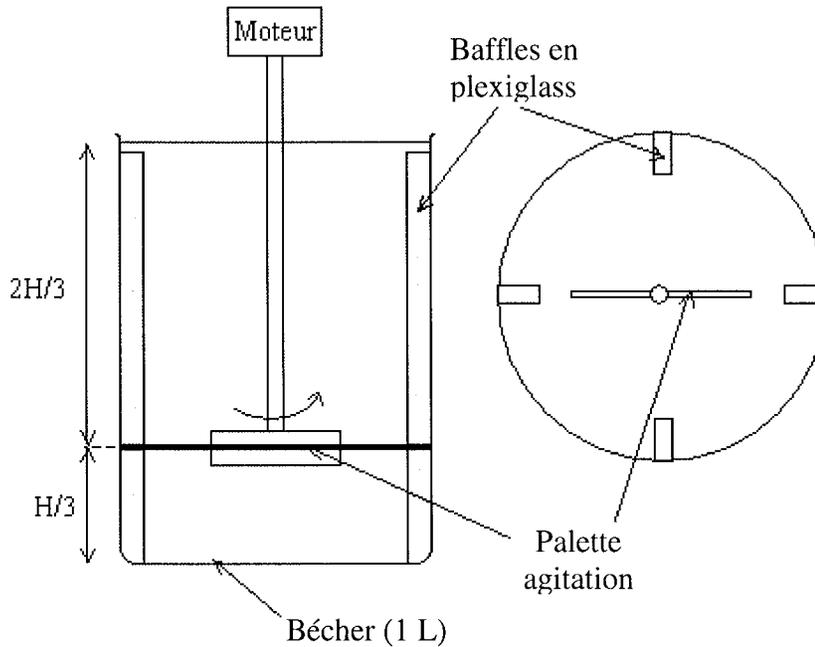


Figure II.1(17)
Schéma du réacteur de mélange (El Samrani, 2003).

L'utilisation de ce type de réacteur permet de contrôler le gradient de vitesse G au cours du mélange. Ce paramètre est très employé dans le traitement de l'eau et il permet de rendre compte de l'intensité globale de l'agitation au sein d'un réacteur.

II.1.2.3. Les mesures directes effectuées dans les surnageants

a) Potentiel d'hydrogène (pH) et conductivité

La mesure du pH est basée sur une méthode électrochimique et consiste à plonger l'électrode d'un pH-mètre Radiometer (Tacussel Electronique-PHM210, Villeurbanne, France), étalonné à température ambiante, dans un minimum de 20 mL de solution, homogénéisée sous faible agitation magnétique. La mesure de la conductivité s'effectue dans les mêmes conditions (conductimètre Radiometer- CD 810, étalonné avec une solution de KCl 10^{-2} N), les valeurs étant reportées en $\mu\text{S}/\text{cm}$ ou mS/cm suivant la gamme de lecture choisie.

b) Turbidité

La turbidité peut être définie comme étant une mesure du trouble d'une solution. Elle reflète la présence ou l'absence de particules.

D'un point de vue physique, la turbidité τ est la mesure de la diminution d'intensité d'un faisceau lumineux, provoquée par diffusion de ce faisceau par les matières en suspension (mesure par néphélogéométrie¹¹).

$$\tau = \frac{1}{l} \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad (\text{équation [II.1(6)])}$$

où l correspond au trajet optique et I_0 et I sont les intensités des faisceaux incidents et transmis respectivement.

Environ 30 mL de surnageant sont prélevés à 3 cm en dessous de la surface libre de la suspension en utilisant une seringue à bout recourbé. La turbidité est mesurée avec un turbidimètre Hach (2100A, Lovelo, Colorado, Etats-Unis) étalonné avec des solutions standards de formazine (Etalons Gelex®).

¹¹ La néphélogéométrie est une méthode optique de mesure d'un nombre de particules en suspension. Elle repose sur les principes de diffusion de lumière.

II.1.2.4. Les analyses réalisées dans les sédiments : les spectroscopies de perte d'énergie (Electron Energy Loss Spectroscopy, EELS) et de dispersion en énergie X (Electron Dispersion X-Ray Spectroscopy, EDXS)

La spectroscopie par pertes d'énergie (EELS) repose sur les informations fournies par les interactions électrons-matière : à la traversée d'un objet, les électrons du microscope électronique subissent soit une diffusion élastique (sans perte d'énergie) ou inélastique avec une perte d'énergie allant de quelques eV à quelques 1 000 eV.

Le grand avantage de cette technique réside dans le fait que son principe découle d'un processus primaire d'excitation. La perte d'énergie des électrons incidents est mesurée pour remonter à la reconnaissance et au dosage des éléments présents et responsables des pertes caractéristiques. Elle donne aisément les éléments légers (à partir de $Z = 3$), mais aussi l'état de la liaison d'un atome donné avec ses voisins par une signature typique.

La détection des photons X est le principe des mesures réalisées en dispersion d'énergie X (EDXS).

a) Rappels sur l'interaction électrons-matière

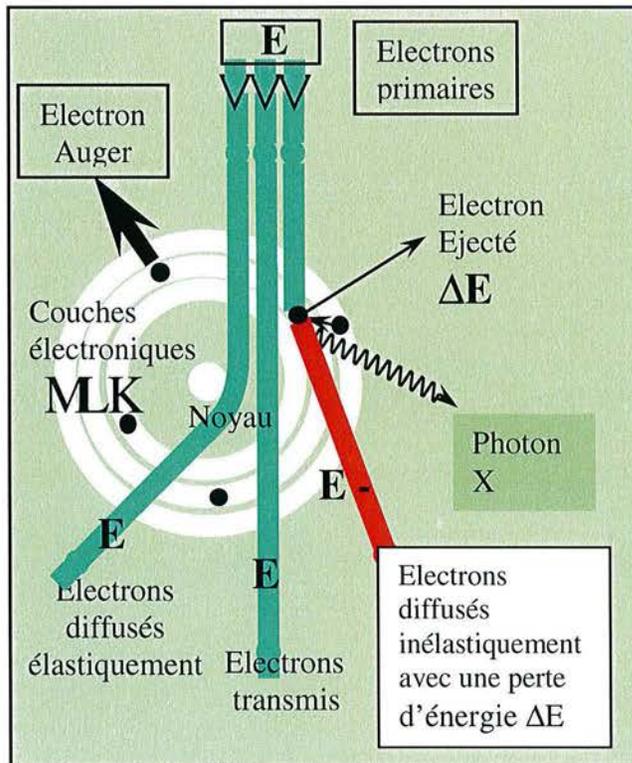


Figure II.1(18)
Les différentes interactions électrons-matière.

Lorsque des électrons incidents d'énergie E_0 et de vecteur d'onde k_0 traversent un échantillon, ils peuvent être (Figure II.1(18)) :

- Non diffusés : leur énergie et leur vecteur d'onde restent les mêmes que ceux du faisceau incident (E_0, k_0).
- Diffusés élastiquement : leur énergie est la même que celle du faisceau incident mais leur vecteur d'onde a varié (E_0, k').
- Diffusés inélastiquement : leur énergie et leur vecteur d'onde sont différents de ceux du faisceau incident (E_0-E, k'').

La spectroscopie de pertes d'énergie est basée sur l'étude des électrons diffusés élastiquement et inélastiquement.

b) Principe général de la spectroscopie EELS

(Egerton, 1986 ; Ahn et Krivanele, 1990 ; Ghanbaja, 2003)

La perte d'énergie des électrons transmis est caractéristique de l'atome percuté dans l'échantillon. L'intensité du signal inélastique transmis est proportionnelle au nombre d'atomes rencontrés. Cette technique permet donc l'identification et le dosage des éléments présents dans l'échantillon et responsables des pertes caractéristiques.

L'avantage de cette technique réside dans le fait que l'on s'intéresse à un processus primaire d'excitation. Le signal de perte d'énergie possède donc de nombreux renseignements caractéristiques.

Cette technique est exploitée dans une gamme de perte d'énergie allant de 0 à 3 000 eV et permet de détecter facilement les éléments légers (à partir de $Z = 1$). Elle permet également, couplée à la microscopie électronique, d'effectuer des analyses avec une résolution spatiale de quelques nanomètres.

Enfin, il est à noter que la spectroscopie de perte d'énergie peut s'opérer soit avec des électrons lents, en réflexion, soit avec des électrons rapides, en transmission, comme c'est le cas dans notre étude.

c) Montage expérimental EELS

Appareillage

L'appareil utilisé dans notre étude est un PEELS 666 (Parallel Electron Energy Loss Spectrometer) commercialisé par Gatan (Pleasanton, Etats Unis), qui acquiert simultanément tous les points du spectre grâce à une barrette de photodiodes. Le spectromètre utilisé est couplé à un MET commercialisé par Philips (CM 20, Amsterdam, Pays-Bas), et à un système informatique d'acquisition et de traitements des données, fonctionnant avec le logiciel Gatan (Pleasanton, Californie, Etats- Unis) EL/P version 2.1. Le spectromètre de perte d'énergie est monté au pied de la colonne du microscope, comme le montre la Figure II.1(19). Les électrons parviennent au système analyseur en soulevant simplement l'écran d'observation du microscope.

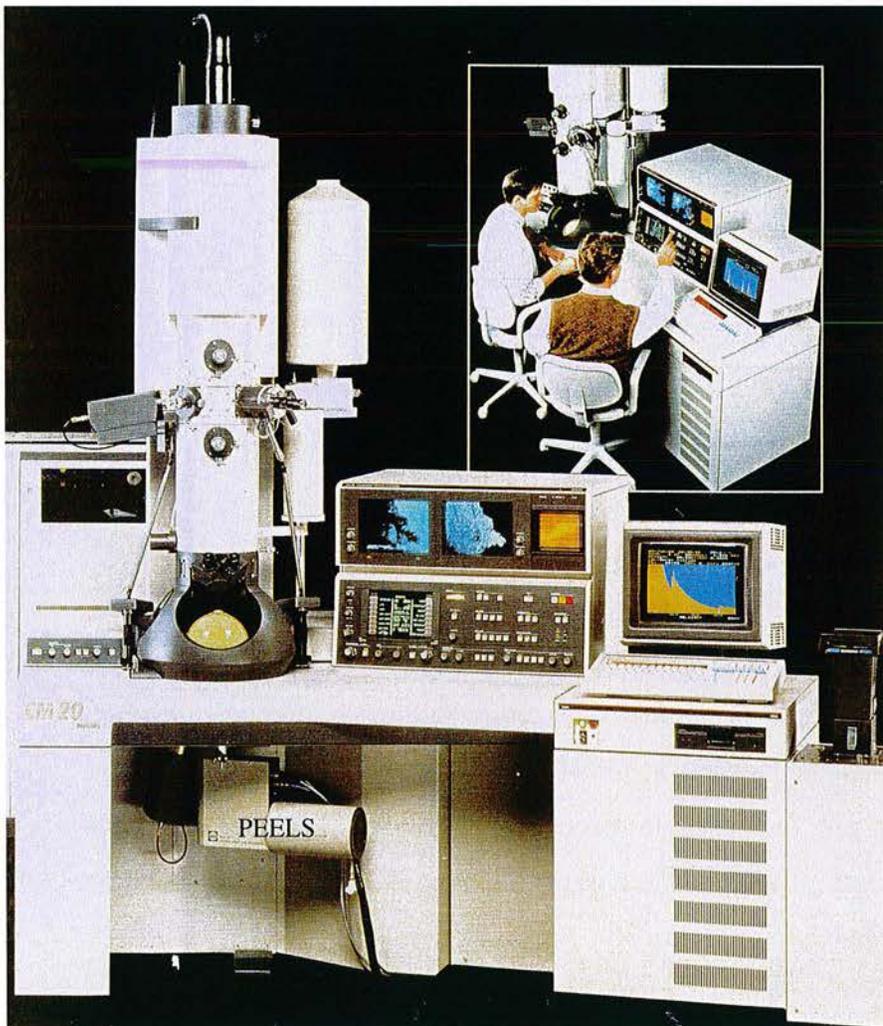


Figure II.1(19)
Photo du Microscope Electronique à Transmission
(Philips CM 20) et PEELS (Gatan).

D'une manière générale, un MET fonctionne soit en mode image, soit en mode diffraction, ces deux modes peuvent être mis en œuvre pour l'analyse EELS (Figure II.1(20)). Le spectromètre est dit couplé en diffraction si le microscope est en mode image, ou inversement couplé en image si le microscope est en mode diffraction. Si le microscope est en mode diffraction, on introduit dans le spectromètre le faisceau transmis, les informations contenues dans le spectre intègrent alors la totalité de la zone de l'échantillon ayant diffracté.

Dans le cadre de notre étude, nous avons besoin de sélectionner précisément la zone analysée et nous avons préféré travailler avec le microscope en mode image. Dans ce mode, l'angle de collection β est déterminé par la taille du diaphragme objectif et la taille de la zone analysée dépend du grandissement de l'image observée sur l'écran du microscope et de la taille d'entrée du spectromètre (1, 2, 3 ou 5 mm). Les électrons sont ensuite discriminés selon leur énergie par un prisme magnétique, dont l'excitation est modifiable. Les sextupoles SX et SY situés en amont du prisme permettent de compenser l'astigmatisme et la focalisation du système. Les lentilles quadripolaires (Q_1 , Q_2 , Q_3) amplifient la dispersion des électrons en énergie, la dispersion finale est fonction de l'excitation de ces lentilles (0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,5 ; 1,0 ; ou 2,0 eV/canal). A la sortie de cet ensemble magnétique, les électrons sont dispersés en énergie dans un plan perpendiculaire au faisceau initial, où se situe le détecteur multi-canal. Ce détecteur consiste en une barrette de 1 024 diodes, un YAG, une fibre optique, un dispositif de refroidissement, et un système de lecture de photodiodes. Le YAG converti le signal électronique en signal photonique, la fibre optique conduit ces photons à la barrette de photodiodes où se créent des paires électrons-trous. Les diodes sont interrogées périodiquement, la période correspond au temps d'intégration que l'on définit dans le programme EL/P. Il existe un courant de fuite, appelé courant noir, au niveau de chaque diode, qui est minimisé grâce au dispositif de refroidissement de la barrette par effet Peltier, permettant de maintenir l'ensemble à -20°C .

Le spectre est enregistré sur une fenêtre d'énergie, plus ou moins étendue en fonction de la dispersion. L'examen des seuils d'ionisation nécessite souvent de décaler le spectre afin d'amener la fenêtre d'énergie adéquate en face de la barrette. Ceci est réalisé en appliquant une tension électrique parfaitement déterminée sur un tube isolé situé dans le prisme et à l'intérieur duquel circulent les électrons. Tous les électrons subissent de ce fait une déviation identique, ce qui revient à translater en bloc le spectre devant le détecteur.

Le spectre de pertes d'énergie est ainsi obtenu par variation du champ magnétique, la fenêtre en énergie étant fixe.

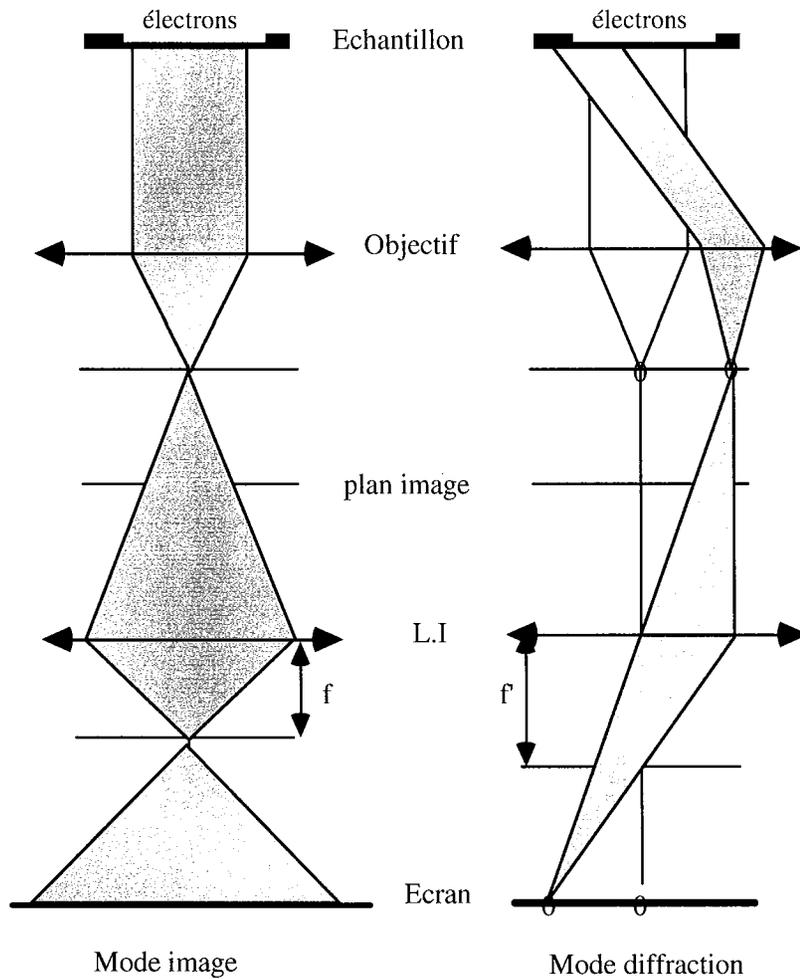


Figure II.1(20)

Représentation schématique du trajet des électrons en modes image et diffraction.

Résolution

La résolution en énergie est liée à :

- la largeur de la fente en sortie du spectromètre,
- la dispersion énergétique intrinsèque du faisceau incident, liée au type de source utilisée (dans notre étude, nous avons fixé la dispersion en énergie à 0,1 eV pour la perte d'énergie au seuil du fer et à 0,2 eV dans le cas du carbone),
- la résolution propre du prisme.

d) Principales limitations de l'EELS : détection et épaisseur des échantillons

La principale difficulté de la spectroscopie EELS réside dans la détection des spectres. En effet, pour améliorer le rapport signal/bruit, il faut augmenter le temps de comptage, ceci a pour conséquences des effets indésirables, notamment une dérive de l'échantillon et/ou une dégradation de la zone analysée. Ces effets indésirables sont cependant considérablement diminués avec le détecteur multi-canal.

Par ailleurs, l'utilisation de la spectroscopie de pertes d'énergie à faible tension d'accélération (200 kV dans notre cas), est limitée par l'épaisseur des échantillons. En effet, l'intensité du signal transmis s'exprime par :

$$I_t = I_o \exp\left[-\frac{t}{\lambda_e}\right] \quad \text{équation [II.1(7)]}$$

avec I_o l'intensité du faisceau incident

t l'épaisseur de l'échantillon

λ_e le libre parcours moyen élastique des électrons dans l'échantillon

Le libre parcours moyen augmentant avec la tension, on comprend que l'utilisation des hautes tensions (1 MeV) permet d'étudier des échantillons plus épais.

D'une manière générale, pour éviter les effets de diffusion multiple avec les basses tensions, l'épaisseur des échantillons doit être inférieure à quelques dizaines de nm. Dans notre étude, nous avons comparé des spectres de t/λ_e compris entre 0,1 et 0,8.

e) Informations spectrales EELS (Ghanbaja, 2003 ; Hallouis, 1989)

Deux zones peuvent être distinguées dans un spectre de pertes d'énergie (Figure II.1(21)) :

- La région des pertes faibles de 0 à 50 eV qui correspond à l'excitation collective des électrons dans la bande de valence (isolant et amorphe) et dans la bande de conduction dans le cas des matériaux conducteurs.
- La région des pertes intenses au-delà de 50 eV qui correspond à l'excitation des électrons de cœur.

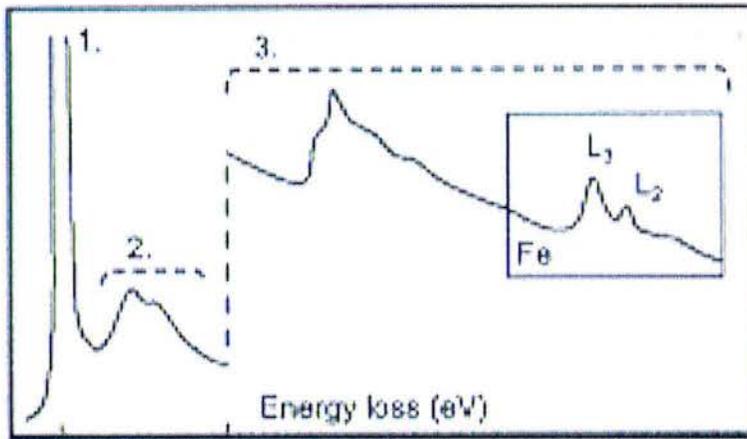


Figure II.1(21)

Les différentes zones spectrales en perte d'énergie et place du seuil du fer (1. Pic de perte nulle, 2. Pertes faibles (plasmon), 3. Pertes profondes).

Région des pertes faibles (0 à 50 eV)

La région des pertes faibles comporte deux zones :

- le pic élastique qui correspond aux électrons diffusés élastiquement et non diffusés,
- le pic de plasmon qui correspondent à une excitation collective des électrons de valence ou de conduction. Ces électrons se comportent comme un gaz et entrent en oscillation sous l'influence des électrons incidents en subissant une perte d'énergie E_p de l'ordre de 20 eV. Les plasmons permettent de recueillir des informations sur l'épaisseur des échantillons.

Ces pics ont une allure gaussienne (Figure II.1(22)).

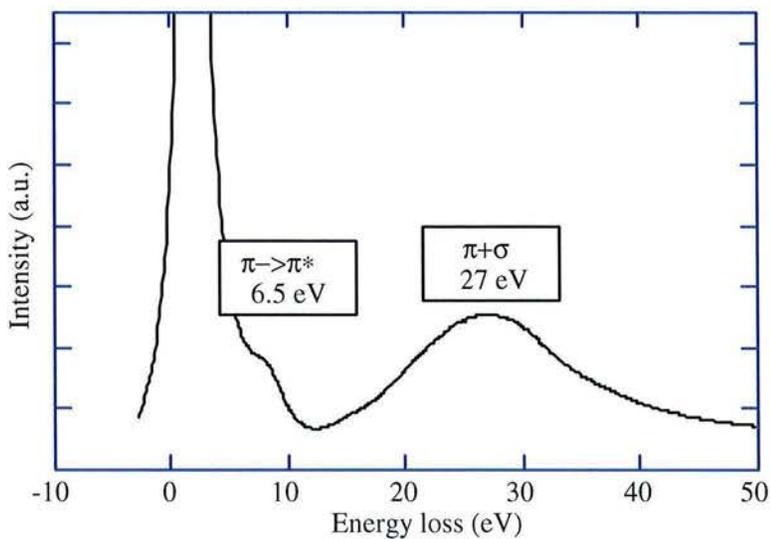


Figure II.1(22)

Pertes faibles dans le cas du graphite (Ghanbaja, 2003).

Région des pertes élevées (au-delà de 50 eV)

Dans cette région, le fond continu se superpose aux seuils caractéristiques des éléments. Il est produit par des électrons ayant subi des pertes d'énergie multiples. L'opérateur peut donc sélectionner son domaine spectral d'analyse en énergie en fonction de l'élément qu'il souhaite analyser. Dans le cas d'un élément pur, il est dû à des pertes par plasmon et à des excitations des états de valence (Figure II.1(23)).

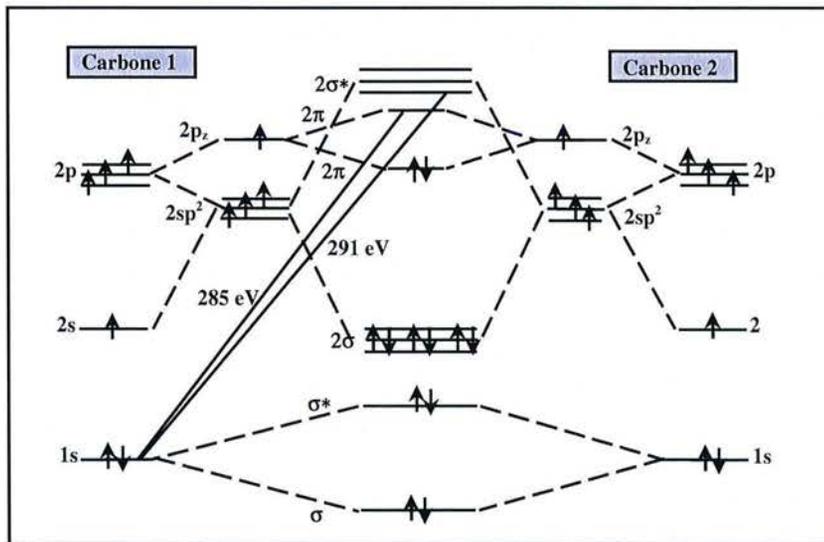
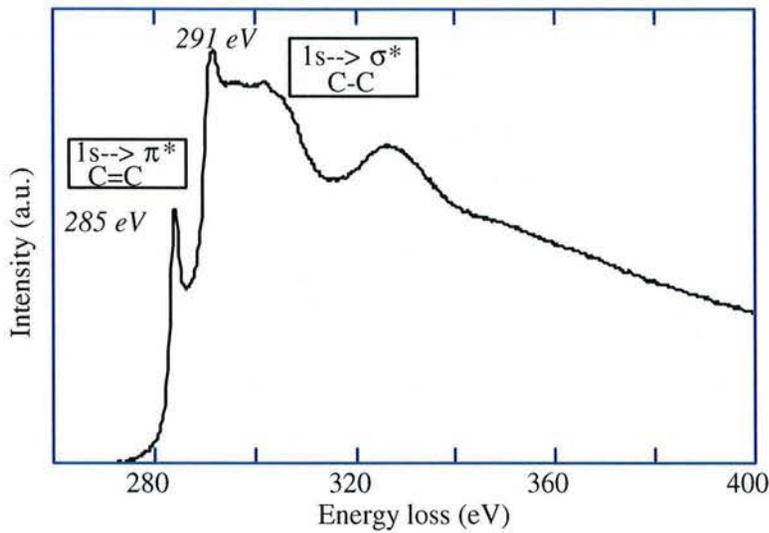


Figure II.1(23)

Spectre de pertes d'énergie au seuil du K du carbone pour le graphite et diagramme des orbitales moléculaires associé (Bozzolo, 1996 ; Ghanbaja, 2003).

Dans un système multi-éléments, chaque seuil contribue à l'intensité du fond continu des seuils suivants, il augmente avec l'épaisseur de l'échantillon et ne contient aucune information analytique. De plus, il masque les informations analytiques dans les seuils d'ionisation. Ces seuils sont caractéristiques de l'élément rencontré (éjection d'un électron de cœur dans des niveaux inoccupés). L'intensité du seuil est environ dix fois plus faible que le signal du pic élastique ou du pic plasmon. La structure fine des seuils d'ionisation donne des informations sur les liaisons chimiques de l'élément. Des modulations EXELFS se superposent à la décroissance de l'intensité une centaine d'électronvolts après le seuil. Ces modulations résultent de la diffusion électronique au cours du processus d'ionisation par les atomes voisins. Ce phénomène est tout à fait analogue à celui observé après un pic d'absorption en RX (EXAFS) qui permet de déduire la configuration locale des atomes. Le traitement de ces modulations permet d'obtenir des informations sur les plus proches voisins : distance, nombre et nature.

f) Analyse quantitative en EELS

L'intensité d'un seuil caractéristique est proportionnelle au nombre d'atomes de l'élément détecté dans le volume analysé.

Cas d'un système à un seul élément A

Le nombre d'atomes de l'élément A par unité de surface analysée de l'échantillon est donné par :

$$NA = \frac{IA(\beta, \Delta E)}{I_0\sigma_A(\beta, \Delta E)} \quad \text{équation [II.1(8)]}$$

avec I_0 : intensité du faisceau transmis (mesurée par évaluation de l'aire sous le pic élastique sur une fenêtre d'intégration ΔE).

I_A : intensité du signal caractéristique proportionnelle au nombre d'électrons collectés dans un angle β et qui ont excité un niveau atomique profond

$\sigma_A(\beta, \Delta E)$: section efficace d'ionisation associée à l'excitation du niveau profond d'un atome pour un angle de collection β et une fenêtre d'intégration ΔE .

La mesure de $I_A(\beta, \Delta E)$ revient à une intégration de l'aire sous le seuil, limitée par une fenêtre ΔE , après une soustraction du fond continu. La définition du fond continu constitue le problème essentiel de la mesure de $I_A(\beta, \Delta E)$. La méthode la plus simple utilisée dans notre

étude consiste à extrapoler ce fond continu par une loi en puissance de la forme $A \cdot \Delta E^{-r}$ à partir du fond continu situé juste avant le seuil (Figure II.1(24)).

Cas d'un système multi-élémentaire

La proximité des seuils d'ionisation oblige à réduire la fenêtre d'intégration ΔE en introduisant une imprécision sur la mesure de I_0 . On procède alors à une analyse relative d'un élément par rapport à l'autre. L'expression du rapport des concentrations N_A/N_B de deux éléments A et B est indépendante de l'intensité du faisceau incident et s'écrit :

$$\frac{N_A}{N_B} = \frac{I_A(\beta, \Delta E)}{I_B(\beta, \Delta E)} \frac{\sigma_B(\beta, \Delta E)}{\sigma_A(\beta, \Delta E)} \quad (\text{équation [II.1(8)])}$$

avec N_i : concentration de l'élément i dans la surface analysée

$I_i(\beta, \Delta E)$: intensité de seuil caractéristique de l'élément i pour un angle de collection β et une fenêtre d'intégration ΔE .

$\sigma_i(\beta, \Delta E)$: section efficace inélastique de l'élément i pour un angle de collection β et une perte d'énergie ΔE

La concentration relative des éléments pourra être déterminée avec une bonne précision à partir du spectre expérimental (Figure II.1(24)). Cependant, l'extrapolation du fond continu peut être rendue difficile par la proximité des seuils.

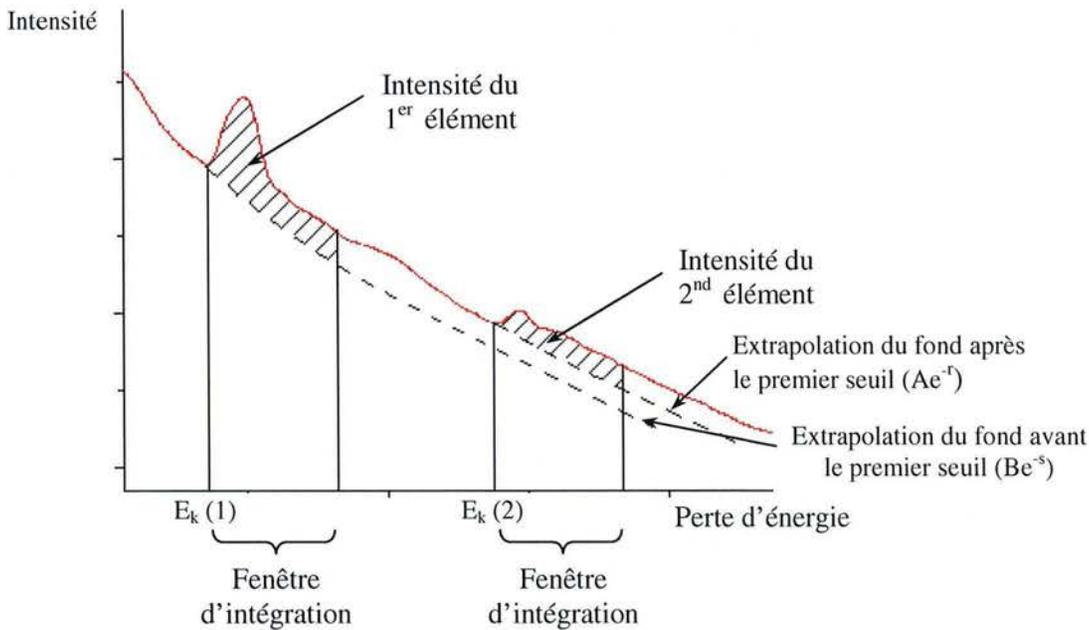


Figure II.1(24)
Spectres EELS dans le cas d'un système à plusieurs éléments et méthode d'analyse quantitative.

g) *Traitement des spectres EELS*

Les spectres bruts sont corrigés du bruit de fond et de la fonction de réponse du détecteur. Ces deux corrections, permettant de s'affranchir d'effets purement liés à l'appareillage, sont opérées de façon systématique. Les autres traitements, effectués plus spécifiquement, ont pour but d'extraire des spectres des informations liées aux caractéristiques de l'échantillon. Parmi les nombreuses possibilités du logiciel utilisé, nous avons principalement eu recours au programme de calcul de l'épaisseur de la zone analysée et à des programmes de déconvolution.

Correction du bruit de fond

Le bruit de fond du détecteur comporte deux contributions : le courant noir et le bruit de lecture des diodes. Ce bruit doit être soustrait à chaque spectre, il faut donc l'enregistrer systématiquement à chaque acquisition de données. Pour cela, il suffit d'effectuer une acquisition en masquant l'entrée du spectromètre par l'écran d'observation du microscope.

Correction de la fonction de réponse du détecteur

Chacune des photodiodes de la barrette ne fournit pas la même réponse à une sollicitation identique. Par ailleurs, le détecteur peut recevoir des électrons rétrodiffusés par son environnement proche. Les spectres enregistrés doivent être corrigés de la fonction de réponse du détecteur afin de rétablir un gain identique sur l'ensemble des canaux. Cette fonction se détermine en enregistrant la réponse du détecteur illuminé uniformément (dispersion 0 eV) et sans échantillon. De façon systématique, les spectres bruts ont d'abord été corrigés du bruit de fond, par soustraction, puis de la fonction de réponse du détecteur, en divisant le spectre par cette fonction.

Calcul de l'épaisseur de la zone analysée

L'épaisseur de la zone analysée peut être déterminée à partir du spectre de pertes faibles. Ce calcul repose sur l'hypothèse d'évènements de diffusion indépendants. Dans ce cas, ces évènements obéissent à la statistique de Poisson. La probabilité pour qu'un électron rapide subisse n collisions successives dans un échantillon d'épaisseur t vaut :

$$P_n = \frac{1}{n!} \left(\frac{t}{\lambda_e}\right)^n \exp\left(-\frac{t}{\lambda_e}\right) \quad \text{équation [II.1(10)]}$$

où λ_e est le libre parcours moyen de diffusion inélastique

L'intensité diffusée I_n vaut :

$$I_n = I_T \cdot P_n$$

$$\text{soit } I_n = I_T \frac{1}{n!} \left(\frac{t}{\lambda_e}\right)^n \exp\left(-\frac{t}{\lambda_e}\right) \quad \text{équation [II.1(11)]}$$

où I_T est l'intensité totale, intégrée sur tout le spectre.

Le terme $n = 0$ correspond à l'absence de diffusion et s'identifie par conséquent à l'intégrale du pic sans perte I_0 :

$$I_0 = I_T \cdot \exp\left(-\frac{t}{\lambda_e}\right) \quad \text{équation [II.1(12)]}$$

L'épaisseur peut alors être déterminée par la relation :

$$\frac{t}{\lambda_e} = \ln \frac{I_T}{I_0} \quad \text{équation [II.1(13)]}$$

Le logiciel EL/P détermine le rapport des intensités intégrées sur tout le spectre et sous le pic sans perte, et déduit une valeur de t/λ_e par cette dernière relation.

Elimination des effets de diffusion multiples

Nous avons utilisé la méthode de déconvolution « Fourier-Ratio » afin d'éliminer la contribution des pertes faibles au niveau des seuils d'ionisation. La mise en oeuvre de ce calcul nécessite d'enregistrer le seuil d'ionisation et les pertes faibles, dans les mêmes conditions.

Si l'on convient d'appeler $P(E)$ la distribution d'intensité, ou section efficace, correspondant aux pertes faibles et $V(E)$ celle du seuil d'ionisation, le signal effectivement enregistré au niveau du seuil $U(E)$ résulte de la convolution des deux phénomènes et s'écrit :

$$U(E) = V(E) \otimes P(E) \quad \text{équation [II.1(14)]}$$

La transformée de Fourier de cette expression donne :

$$TF[U(E)] = TF[V(E)] \cdot TF[P(E)] \quad \text{équation [II.1(15)]}$$

A partir du spectre de pertes faibles, il est aisé d'obtenir $TF[P(E)]$. En divisant l'expression par cette fonction, on obtient directement $TF[V(E)]$. Il reste ensuite à appliquer la transformée de Fourier inverse pour obtenir la contribution du processus d'ionisation à la distribution d'intensité enregistrée dans la région du seuil.

h) Détection du signal en EDXS

Les photons X sont collectés par un détecteur Si-Li (cristal de silicium de type P dopé par des atomes de lithium). La mobilité du lithium étant élevée à température ordinaire, le détecteur est placé dans une enceinte refroidie à l'azote liquide. Une fenêtre de béryllium escamotable permet d'isoler la diode de la colonne du microscope. Les photons X vont être absorbés par le silicium en créant des paires électrons-trous.

Si un champ électrique est établi aux bornes du cristal de Si, les porteurs libérés par le photoélectron se déplacent suivant la direction de ce champ et induisent une charge électrique aux bornes du détecteur proportionnelle à l'énergie du photon incident. La charge induite par le détecteur va se traduire sous forme d'une variation de tension grâce au préamplificateur. Ce signal traité par l'amplificateur sera alors transformé en données analogiques-numériques.

i) Analyse quantitative en EDXS

La méthode utilisée ici est l'analyse relative sans standard (échantillons minces) d'après Russ-Cliff-Lorimer. Cette méthode impose un étalonnage de la réponse du détecteur en fonction de différents éléments pris. Cette réponse inclut les facteurs tels que la fluorescence, la section d'ionisation, l'efficacité du détecteur qui sont fonction de la tension utilisée. Le rapport d'intensité X de deux éléments A et B dans un échantillon mince est :

$$\frac{C_A}{C_B} = K_{AB} \frac{I_A}{I_B} \quad (\text{équation [II.1(16)])}$$

avec K_{AB} la réponse de l'ensemble de la mesure

C_A la concentration massique de l'élément A

C_B la concentration massique de l'élément B

j) Préparations des échantillons pour les analyses EELS et EDXS

A la fin des jar-tests, les sédiments sont recueillis, mis au congélateur et enfin lyophilisés. Les poudres obtenues sont mises en suspension dans un solvant approprié (éthanol) puis dispersées aux ultra-sons. Une goutte des solutions est ensuite déposée puis évaporée sur une grille de MET en cuivre (200 mesh) recouverte d'un filtre très fin de carbone avec des trous. Seules les particules contenues dans les trous sont analysées afin d'éviter le signal du carbone du support.

Pour la MON coagulée, 30 spectres par concentration en nitrate de fer ont été réalisés et analysés, pour les modèles d'acide humique ainsi que pour les extraits d'acide humique naturels, compte tenu de l'homogénéité de ces systèmes, seulement 10 spectres ont été faits.

L'analyse par elle-même se fait sur un MET modèle CM 20 PHILIPS. Les calculs ont été réalisés grâce au logiciel *EL/P* qui permet d'évaluer et de soustraire le fond continu.

Deux types d'analyses en spectroscopie de perte d'énergie ont été effectués sur la matière organique coagulée par le fer :

- seuil K du carbone (fenêtre des pertes : 250 - 450 eV, dispersion : 0,2 eV)
- seuil L_{2,3} du fer (fenêtre des pertes : 680 - 780 eV, dispersion : 0,1 eV)

Les valeurs de la fenêtre d'intégration sont de 55 eV et l'origine du pic (E_k) est de 279 eV pour le carbone et 341 eV pour le calcium (l'évaluation relative de la quantité de carbone est faite par rapport à la quantité de calcium dont le pic est bien visible et situé dans les mêmes gammes de pertes d'énergie). Les spectres sont calibrés sur le pic de l'azote, qui est fixe, à une position de 398,8 eV. Lorsque ce pic n'était pas observable convenablement, le calage est fait à partir des deux pics du calcium à 349,7 et 351,2 eV. On vérifie que la distance entre les pics du calcium et de l'azote est bien toujours la même.

L'analyse en EDXS se fait sur les mêmes particules analysées en EELS avec un comptage des photons s'effectuant à environ 1 500 coups/seconde pendant 40 secondes. Cette méthode présente deux avantages : une bonne efficacité du comptage et une analyse simultanée de toutes les raies du spectre. En MET, la résolution spatiale peut atteindre 1 nm. Cependant, l'analyse quantitative d'éléments légers comme le carbone est impossible avec cette technique.

II.2. Matériaux

II.2.1. L'eau de la rivière Moselle

II.2.1.1. Le bassin amont de la Moselle : les pôles de pollution potentiels

Le bassin versant de la Moselle en amont de Richardménénil est soumis à deux pôles susceptibles d'être les principales sources de micropolluants anthropiques aquatiques. D'une part, la zone agricole est relativement abondante notamment en terme de cultures de maïs (soumises aux herbicides atrazine (interdite depuis 2002), avec deux nouvelles molécules à l'essai : la sulcotrione et la mésotrione). D'autre part, la zone d'Epinal est un pôle industriel notoire (papeteries, industries alimentaires et ateliers de surfaçage) (Figure II.2(1)).

D'une manière générale, toutes les industries « modernes » sont représentées sur cette zone en amont de l'agglomération nancéienne.

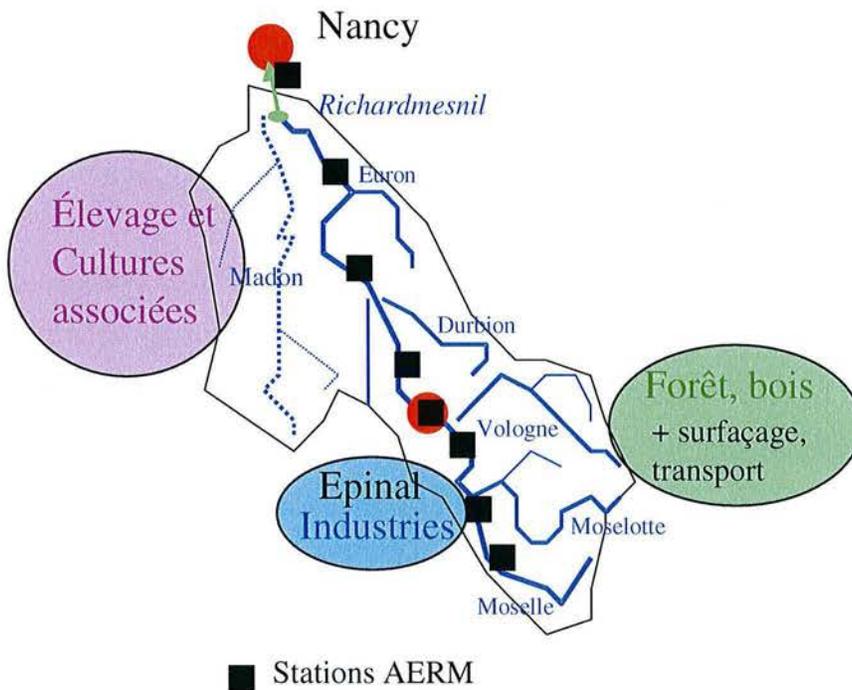


Figure II.2(1)

Carte des différentes zones occupationnelles du bassin de la Moselle en amont de la prise d'eau de Richardménénil.

II.2.1.2. Les stations de l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse (AERM)

Les principales stations AERM sont localisées sur la Figure II.2(1). La liste complète figure sur le site Internet ¹² de l'Agence.

L'agence de l'eau Rhin-Meuse effectue en routine l'analyse de nombreux paramètres tout le long de la Moselle. De nombreux paramètres globaux sont analysés mensuellement sur l'ensemble des sites répertoriés sur la banque de l'eau du site Internet. Parmi ces derniers, on peut citer la teneur en carbone organique dissous (COD), la demande chimique en oxygène (DCO) ¹³, la demande biochimique en oxygène (DBO₅) ¹⁴, le débit instantané (Q INST), la température de l'eau et de l'air.

Les teneurs moyennes en COD à Méréville calculées sur les 10 dernières années montrent des variations saisonnières significatives : des taux de COD de 1,5 à 3 mg/L sont généralement enregistrés en hiver et augmentent jusqu'à 5 à 15 mg/L pendant la période estivale.

Les valeurs de DCO montrent une variabilité temporelle très marquée : des teneurs de 6 à 20 mg/L à la station de Méréville sont enregistrées et les variations sont très fluctuantes sans forcément être corrélables aux variations saisonnières.

La demande biologique en oxygène présente une variabilité spatiale (entre les différentes stations de mesure) beaucoup plus marquée. A Méréville, elle est en moyenne de 3 mg/L annuellement. Il est également intéressant de noter que le rapport DCO/DBO₅ augmente progressivement de l'amont à l'aval de la zone Epinal/Nancy, ce qui peut là-aussi être imputé à une concentration croissante de micropolluants organiques difficilement biodégradables ¹⁵.

L'oxygène dissous (P_{O₂}) varie annuellement de 4 à 5,5 mg/L (soit 38% à 46% de saturation) et présente des oscillations plus ou moins marquées suivant les saisons.

¹² <http://www.eau-rhin-meuse.fr/Berm/htm>

¹³ *Mesure du carbone organique total, à l'exception de certains composés aromatiques (benzène, pyridine, toluène) non oxydés dans la mesure (les sulfures, sulfites et ions ferreux et autres composés réduits peuvent par contre être oxydés et comptés comme DCO).*

¹⁴ *Quantité d'oxygène nécessaire aux microorganismes vivants pour assurer l'oxydation et la stabilisation des matières organiques présentes dans l'eau. Par convention, la DBO₅ est la valeur obtenue après 5 jours d'incubation à 20°C.*

¹⁵ *Si l'on se réfère aux définitions de la DCO et de la DBO₅, une même quantité de matière organique de nature différente peut donner des concentrations en DCO et en DBO₅ différentes. En conséquence, la comparaison de ces paramètres sur différents sites d'étude ne reflète pas nécessairement la quantité de matière organique en elle-même, mais plutôt la quantité de demande chimique et biochimique en oxygène pour cette matière. La comparaison de ces paramètres demeure donc effective si elle est effectuée sur un même site.*

La Moselle est une eau faiblement minéralisée dont le pH varie entre 7 et 9,5 (valeur extrême enregistrée pour des conditions d'étiage). Généralement, le pH moyen à Richardménil est de 7,5 à 8. La différence entre la zone amont et aval peut s'expliquer par la présence de roches cristallines dans la partie vosgienne et de roches carbonatées dans la partie aval.

Faiblement concentrée en chlorures (15-20 mg/L) et en sulfate (10-40 mg/L), elle offre une teneur en nitrates également peu élevée (en moyenne 4 à 5 mg/L).

Les teneurs en calcium, magnésium et sodium enregistrées à Richardménil sont plus fluctuantes et diminuent généralement considérablement en février-mars, mais restent globalement constantes le reste de l'année (moyennes respectives de 30, 8 et 10 mg/L).

La teneur en matières en suspension (moyenne annuelle 10 mg/L à Richardménil hors crue mais jusqu'à 500 mg/L pendant des événements exceptionnels) est variable au cours du temps avec des valeurs maximales au mois de janvier généralement.

Les valeurs de débit sont variables au cours du temps, particulièrement pendant les mois d'hiver, dû certainement à une pluviométrie plus abondante pendant la saison hivernale. Le débit annuel moyen est de 100 m³/s, avec des pics en période de crue pouvant aller jusqu'à 1 000 m³/s (Richardménil).

La température de l'eau, comme celle de l'air, oscille suivant les saisons, avec des valeurs extrêmes enregistrées de 2 et 26°C.

II.2.1.3. La réserve de Richardménil

Jusqu'au cœur du XIX^{ème} siècle, Nancy était alimentée par des puits creusés dans la nappe alluviale de la Meurthe et par les eaux de source. A partir de 1920, les débits fournis par ces eaux de source devinrent insuffisants pour l'approvisionnement d'une population croissante, et l'évolution de l'urbanisation en amont de la prise d'eau principale entraîna une nette dégradation de la qualité de l'eau de la Moselle. Il fut alors décidé d'abandonner l'eau de source au profit exclusif de l'eau de Moselle.

De nos jours, l'agglomération nancéienne est alimentée en eau par une prise directe dans le lit de la Moselle, à 8 km au Sud de la ville de Nancy. Un barrage, situé à 500 mètres en aval du point de prélèvement, provoque une retenue d'eau à niveau constant. Nous avons effectué l'ensemble des jar-tests sur l'eau brute décrits dans ce travail à partir de prélèvements effectués au milieu de la rivière, à partir du Pont Saint-Vincent situé au niveau du barrage.

En période de fortes crues, la charge en matière en suspension et la turbidité de l'eau rendent le traitement plus difficile à gérer. De même, en étiage prolongé, les quantités d'eau disponibles pourraient être insuffisantes pour desservir les besoins de l'agglomération.

En conséquence, la Communauté Urbaine du Grand Nancy a intégré dans la chaîne de traitement depuis 1993, une réserve d'eau brute d'une capacité de 3 000 000 m³ constituée de 3 bassins (Figure II.2(2)). Dès lors, en cas d'indisponibilité de la ressource Moselle, ce stockage pourrait répondre aux besoins de l'agglomération nancéienne pendant une période de 20 à 30 jours.

Pour nos prélèvements de matière en suspension, nous avons installé la centrifugeuse de terrain prêté par l'agence de l'eau au niveau de la station de pompage au niveau du 3^{ème} bassin (Figure II.2(2) + Annexe 1).

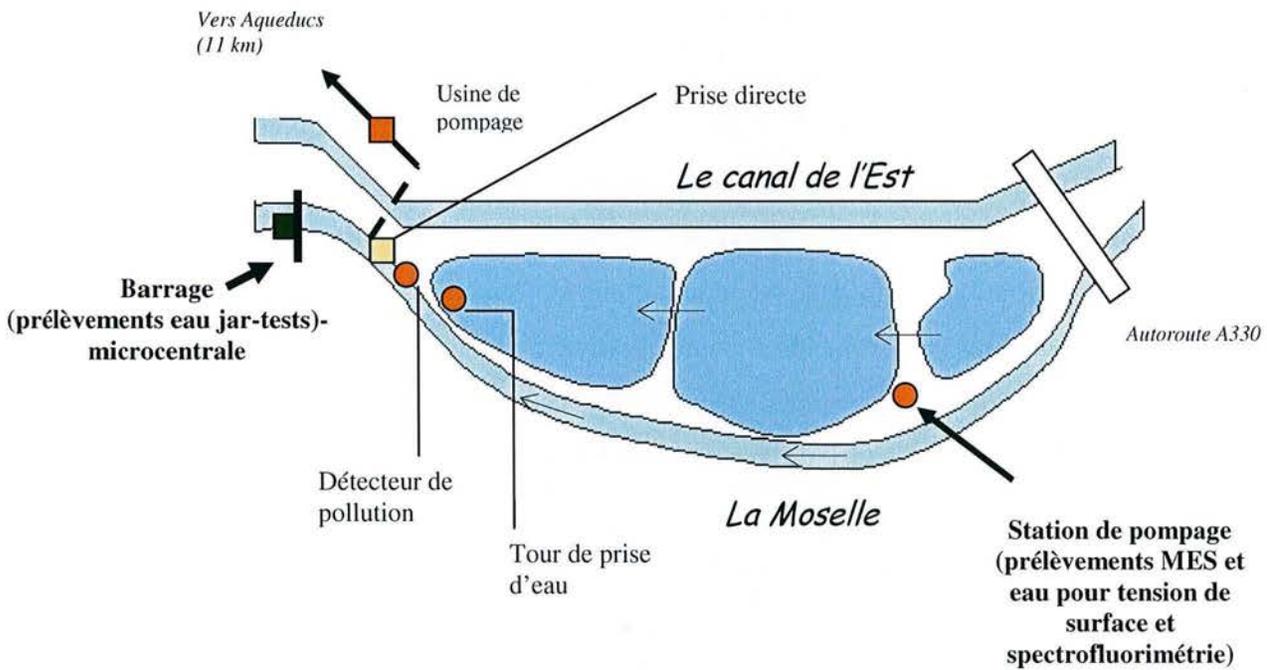


Figure II.2(2)
Carte de la Réserve de Richardménil et localisation du site des points de prélèvement d'eau et de MES.

II.2.1.4. Représentativité de l'échantillonnage

Le temps de réponse à l'impact des phénomènes environnementaux (crues, fonte des neiges, cycle circadien de production primaire par rapport à la respiration bactérienne, variations du couvert végétal) sur les cours d'eau va totalement influencer la représentativité de notre échantillonnage.

Edeline, 2001, dans son ouvrage sur le pouvoir autoépurateur des rivières décrit les principales difficultés et méthodes d'échantillonnage en rivière. Il faut souligner que les hétérogénéités transversales et longitudinales sont sources d'erreur. Comme les apports sont le plus souvent latéraux (affluents, égouts...), il s'ensuit qu'ils se mélangent lentement, surtout sur la largeur puisqu'un cours d'eau comme la Moselle est plus large que profond. Nous avons tenu compte de ce phénomène en choisissant de prélever toujours au maximum près du centre de la rivière (à partir d'un pont pour l'échantillonnage nécessaire aux jar-tests ou à partir de la canne télescopique prévue à cet effet pour le recueillement des MES). Ainsi, les débits sont également considérés comme plus homogènes des phénomènes de mélange en présence et la matière organique recueillie est plus représentative en nature que des prélèvements effectués au bord de la rivière par exemple. Le facteur temporel est également primordial, notamment en raison du cycle naturel de respiration et de photosynthèse microbienne et végétale selon le moment de prélèvement. Nagorski et al., 2003, ont étudié l'influence des variations temporelles de cours d'eau sur les analyses géochimiques réalisées. Ils ont montré que des prélèvements à courte échéance (journaliers ou toutes les 2 heures) couvraient largement les variations décelées à des échelles de temps plus grandes (mensuelles). Pour ces auteurs, il est donc primordial de combiner les résultats à court terme avec ceux donnés à plus longue échéance pour permettre une bonne séparation entre les variations provenant d'un changement environnemental de celles issues du milieu naturel originel.

L'optimisation de sites d'échantillonnage en rivière a été étudiée par Dixon et al., 1999.

Concernant nos prélèvements et extraction d'acides humiques à partir des matières en suspension, nous avons choisi de travailler sur 2 événements distincts (étiage prolongé et début de crue), à 2 saisons d'intervalle (été et automne), dans des conditions météorologiques très distinctes, afin d'avoir une première caractérisation de la variabilité de matériaux organiques supposés très différents.

La variabilité des résultats observée pour différentes zones d'échantillonnage est en réalité essentiellement fonction de la superficie du bassin versant (Meybeck, 1993). Les petits bassins versants (dont fait partie le bassin Mosellan, de taille moyenne par rapport aux autres bassins nationaux) sont soumis à de brusques fluctuations dans les transports de matière organique, liées à une réponse rapide en terme de quantité de matière. Sur les grands bassins au contraire, les réponses sont plus étalées dans le temps.

L'influence des conditions hydrologiques sur les prélèvements effectués est donc à détailler.

Nous présentons ici les conditions des deux prélèvements effectués pour les 2 extractions d'acides humiques réalisées sur les matières en suspension (Tableau II.2(1)). Les conditions des autres expérimentations réalisées sur l'eau brute (jar-tests, interférences avec les polluants) seront données au début des parties correspondantes.

Tableau II.2(1)

Données de terrain des deux campagnes d'extractions d'acide humique naturel (respectivement AHN1 et AHN2 pour les prélèvements 1 et 2) et les mesures de spectrofluorimétrie et tensions de surface.

Données d'échantillonnage	Prélèvement 1 (17 et 18/07/03)	Prélèvement 2 (22 et 23/10/03)
Temps de pompage	15 h	14 h
Débit de pompage	1 m ³ /h	1 m ³ /h
Masse totale de MES humide échantillonnées	480 g	520 g
Teneur en eau ¹⁶	75,3%	74,8%
Paramètres mesurés sur le terrain (eau-air) moyennes sur 2 jours (valeurs stables)		
Température air	28°C	7,3°C
Température eau	24,6°C	9,3°C
pH	8,4	7,5
Conductivité	510 µS/cm	322 µS/cm
PO ₂	3,1 mg/L	4,2 mg/L
Turbidité	15,4 NTU	12,1 NTU
Paramètres mesurés au laboratoire (< 48 h après la fin de l'échantillonnage)		
COT	10,2 mg/L	7,2 mg/L
COD	6,1 mg/L	4,2 mg/L
Eléments majeurs dosés par Emission-ICP¹⁷ sur l'eau filtrée à 0,2 µm en mg/L		
Si	1,665	2,23
Al	< l.d. (1 mg/L)	< l.d. (1 mg/L)
Fe	< l.d. (0,02 mg/L)	0,059
Mn	< l.d. (0,02 mg/L)	0,025
Mg	17,557	6,74
Ca	60,224	28,25
Na	22,531	17,23
K	5,096	2,64
P	< l.d. (0,09 mg/L)	82,96
Teneurs en pyrène dans les MES	1,62 mg/kg sec	0,83 mg/kg sec
(dosages IRH)¹⁸	au 08.08.03	au 04.11.03
Débit instantané à Richardménil (Méréville)	5 m ³ /s	30 m ³ /s
(données DIREN)¹⁹		

¹⁶ Teneur déterminée par séchage à 105°C en étuve jusqu'à poids constant et gravimétrie (Rodier, 1984).

¹⁷ Dosage par ICP Emission (Jobin Yvon, JY 70).

¹⁸ Méthode XP X 33-012 CLHP (extraction hexane/acétone à chaud sous pression) - les autres polluants de notre étude ne font pas partie des suivis analytiques de routine.

¹⁹ http://www.environnement.gouv.fr/lorraine/donnees_moselle.htm

L'évolution des débits instantanés au cours de l'année 2003 est donnée à la Figure II.2(3).

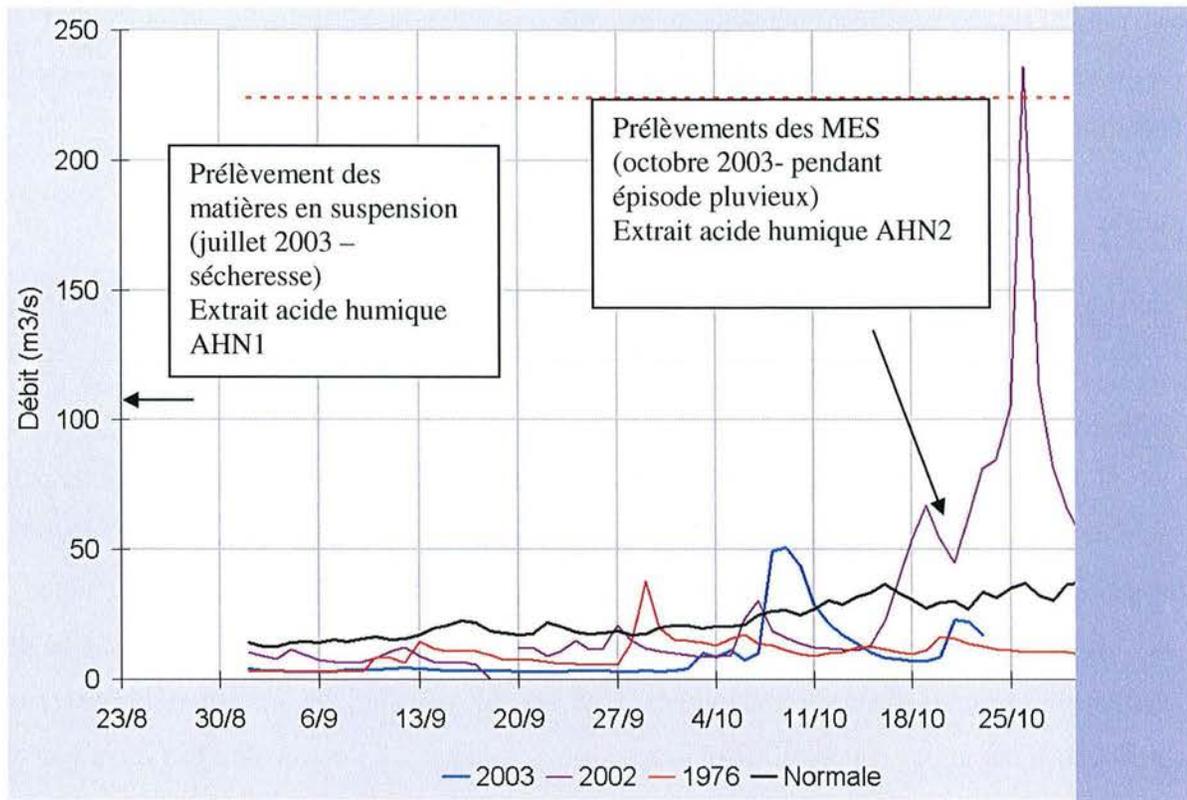


Figure II.2(3)
Débits instantanés (DIREN, Lorraine) pour 2003 ;
placement temporel des 2 prélèvements de MES.

L'événement était exceptionnel, puisqu'il faut remonter jusqu'en 1976 pour retrouver des débits aussi bas que ceux effectués pendant notre campagne estivale de prélèvement. Pour faire face à la situation, les préfets de 74 départements (dont la Meurthe et Moselle) ont d'ailleurs dû mettre en place des mesures de restriction des prélèvements d'eau.

La sécheresse de 2003 (Annexe 2) a permis l'enregistrement de records de température pour les cours d'eau. Les températures extrêmes enregistrées en Moselle (jusqu'à 29,8°C) ont fortement altéré la qualité des cours d'eau (bulletin de l'Agence de l'Eau), en entraînant des développements excessifs de végétation. Ce phénomène explique la particularité du signal de fluorescence du 2^{ème} extrait d'acide humique (ARTICLE I) et notamment la présence supposée de tryptophane et/ou de tyrosine ainsi que d'autres pigments végétaux comme l'attestent également les résultats de Pyrolyse/GC-MS (abondance inhabituelle de *p*-crésol par rapport à la quantité de phénol déterminée).

Toutefois, il semblerait que les phénomènes d'eutrophisation, parfois intenses à certains endroits de la Moselle, observés par ailleurs, semblent avoir eu des conséquences relativement limitées compte tenu des circonstances. Comme le confirme nos mesures de PO₂ effectuées dans les 2 jours consécutifs de nos prélèvements, l'activité photosynthétique de la végétation aquatique a permis de maintenir une bonne oxygénation de l'eau.

II.2.2. Les substances humiques naturelles

II.2.2.1. Dispositif de prélèvement des matières en suspension (MES) et des échantillons d'eau

a) *Matières En Suspension (MES)*

Les prélèvements de matière en suspension ont été effectués sur le terrain grâce au prêt d'une centrifugeuse par l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse (Annexe 3). La centrifugeuse, construite en 1993 pour l'Agence est commercialisée par la société allemande CEPA Padber.

L'eau est prélevée à l'aide d'une crépine flottant grâce à une bouée à une distance de 8 mètres de la berge (canne télescopique). Une pompe péristaltique permet d'alimenter la centrifugeuse par le bas. Un débitmètre magnétique est installé à l'entrée de l'arrivée d'eau et une vanne permet le réglage du débit. L'optimum de fonctionnement étant de 1 à 1,2 m³/h. L'eau arrive dans un cylindre en acier inox de 15 cm de diamètre. Un système séparateur constitué par trois lames inox tournant à 17 000 tours.min⁻¹, permet l'accumulation des matières en suspension sur les parois internes du cylindre préalablement recouverte de plaques de téflon (Figure II.2(4)).

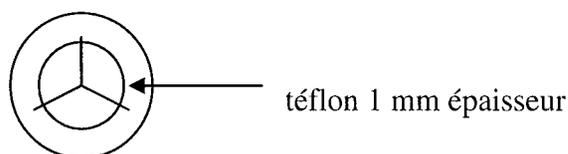


Figure II.2(4)
Coupe de la séparatrice permettant le recueil de MES.

L'ensemble fonctionne grâce à un groupe électrogène possédant 2 alimentations de 220 et 380 V et de puissance 10 kW.

Les temps de pompage pour recueillir environ 100 à 125 g de MES sont les suivants :

- 3-4 heures, si turbidité > 15 NTU
- 4-6 heures, si turbidité < 15 NTU (jusqu'à 8 heures si turbidité très faible).

Depuis le prélèvement jusqu'à l'analyse ou l'extraction des matières organiques de l'eau, nous avons apporté un soin particulier à la conservation et au recueillement des MES. Nous avons notamment évité le risque de pollution par des éléments métalliques provenant des pièces de la centrifugeuse et de graphite (graissage) par l'utilisation de matériel soigneusement nettoyé au préalable.

Les MES récoltées dans des bocaux en verre ont été immédiatement stockées à 5°C à l'abri de la lumière, puis congelées à -18°C dès le retour au laboratoire jusqu'à l'extraction des acides humiques.

b) Echantillons d'eau de rivière

Les échantillons d'eau ont été filtrés sur le terrain grâce à un système de filtration adéquat (büchner en céramique) à l'aide de membranes (0,2 µm sur membrane en polycarbonate PC, Whatman®). Ils sont ensuite conservés à 5°C à l'abri de la lumière dans des flacons de verre remplis à ras bord (afin de limiter la carbonatation) et hermétiquement fermés (afin d'éviter trop de fluctuation en oxygène dissous notamment). Le choix de ce diamètre de pores a été réalisé suite aux récents travaux de Horowitz et al., 1996, sur la définition opérationnelle de la limite des diamètres de pores de filtration de séparation des éléments dissous en solution.

Sliwka-Kaszynska et al., 2003, ont étudié les conditions nécessaires à la préservation et au stockage des échantillons d'eau et ont proposé différents traitements préalables (acidification, alcalinisation, addition de réactifs : chloroforme, aldéhyde, chloraldéhyde pour les extractions de polluants ou chlorure mercureux ou azide de sodium) selon la nature des analyses réalisées sur l'eau et les méthodes d'extraction appliquées au laboratoire.

Le choix de ce type de membrane de filtration a été réalisé par des mesures comparatives de COT et UV (Figure II.2(5)) sur différents types de membranes filtrantes et d'embouts de seringues. Nos conclusions ont rejoint celles de Buffle et al., 1988, pour les études sur la matière organique naturelle et ceux de Karlsson et al., 1999, concernant la rétention d'acides organiques sur différents types de membranes de filtration.

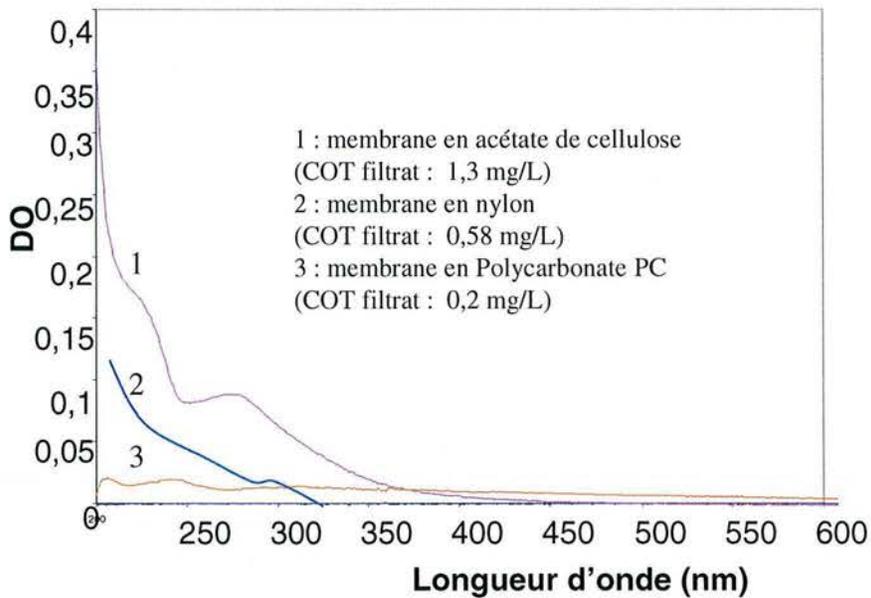


Figure II.2(5)

Choix de la nature de la membrane filtrante des échantillons d'eau.

Les expérimentations réalisées en spectrofluorimétrie et tension de surface ont été réalisées dans les 48 heures suivant la fin des campagnes d'échantillonnage.

II.2.2. Extraction des acides humiques naturels à partir des matières en suspension

Le protocole de Thurman et Malcolm, 1981, adopté par l'IHSS (International Humic Substance Society) pour l'extraction des acides humiques à partir de sédiments de rivière a été utilisé avec quelques modifications.

Les matières en suspension recueillies sont mises en solution avec de l'acide chlorhydrique 1 M pour atteindre un pH compris entre 1 et 2. Le volume final de solution est ajusté avec de l'HCl 0,1 M pour obtenir un ratio de 10 mL par gramme de matière (calculé sur le poids sec estimé). La suspension est agitée pendant 1 h et le surnageant est ensuite séparé du résidu solide par centrifugation (10 min à 1 000 trs/min). Le résidu solide est neutralisé par de la soude 1 M jusqu'à pH 7. Pour avoir un rapport final liquide/résidu solide de 10, de la soude 0,1 M est ajoutée au milieu réactionnel. La suspension alcaline est laissée au repos une nuit et le surnageant est ensuite récupéré par centrifugation (10 min à 2 000 trs/min). Le surnageant est acidifié avec de l'acide chlorhydrique 6 M sous agitation constante jusqu'à pH 1 et laissé au repos 12 à 16 heures. Pour séparer l'acide humique (précipité) de l'acide fulvique (surnageant), on centrifuge à 3 000 trs/min pendant 5 minutes.

La fraction humique est ensuite purifiée des constituants minéraux présents. Pour ce faire, on dissout le solide récupéré dans un volume minimum de soude 0,1 M puis on ajoute une quantité de chlorure de sodium, calculée en fonction du volume total de solution précédemment obtenu, pour atteindre une concentration de 3 M en sodium. Ce sel a été préféré à KCl proposé par le protocole IHSS afin de recueillir les acides humiques sous forme sodique au final, qui est la forme des acides humiques de synthèse. La quantité équivalente a été calculée d'après les données comparatives du pouvoir floculant de différents sels sur les particules minérales (argiles) dans Duchaufour, 1994.

Pour se débarrasser des solides, une ultra centrifugation (15 000 trs/min pendant 30 min) est réalisée.

L'acide humique est reprecipité par ajout d'acide chlorhydrique 6 M sous agitation constante jusqu'à pH 1. La suspension est ensuite laissée au repos pendant 12 à 16 heures. Une centrifugation finale pendant 10 minutes à 5 000 trs/min est effectuée.

Le précipité est transféré dans un tube de dialyse et dialysé contre de l'eau ultra-pure (1 000, 3 500 puis 8 000 MWCO Spectra/Por® 7, Roth). Aucune fraction organique de taille moléculaire inférieure à 8 kDa n'a été obtenue lors de la dialyse (mesure par UV/Visible). La dialyse à 1 000 MWCO a été effectuée jusqu'à l'obtention d'un test négatif au nitrate d'argent (permettant la détection des ions chlorure). L'acide humique est ensuite congelé et lyophilisé.

Nous avons finalement obtenu les résultats quantitatifs suivants (Tableau II.2(2)).

*Tableau II.2(2)
Récapitulatif quantitatif des extractions d'acides humiques naturels à partir des MES.*

Prélèvement	Masse totale de MES humides	Masse d'acide humique extrait	Dénomination de l'AH
17/18 juillet 2003	480 g	0,45 g	AHN1
21/22 octobre 2003	520 g	4,80 g	AHN2

Concernant la partie qualitative de l'extraction, les caractérisations des 2 extraits d'acide humique naturels (AHN1 et AHN2) sont présentées en détail dans l'ARTICLE I inclus dans ce chapitre.

Nous présentons ici (Figure II.2(6)) une comparaison des spectres obtenus par Infra-rouge en transmission à transformée de Fourier (FTIR) des matières en suspension brutes (après séchage pendant 48 h à l'air libre) et des extraits naturels d'acide humique afin d'appréhender les effets de l'extraction en elle-même quant au statut de la matière organique.

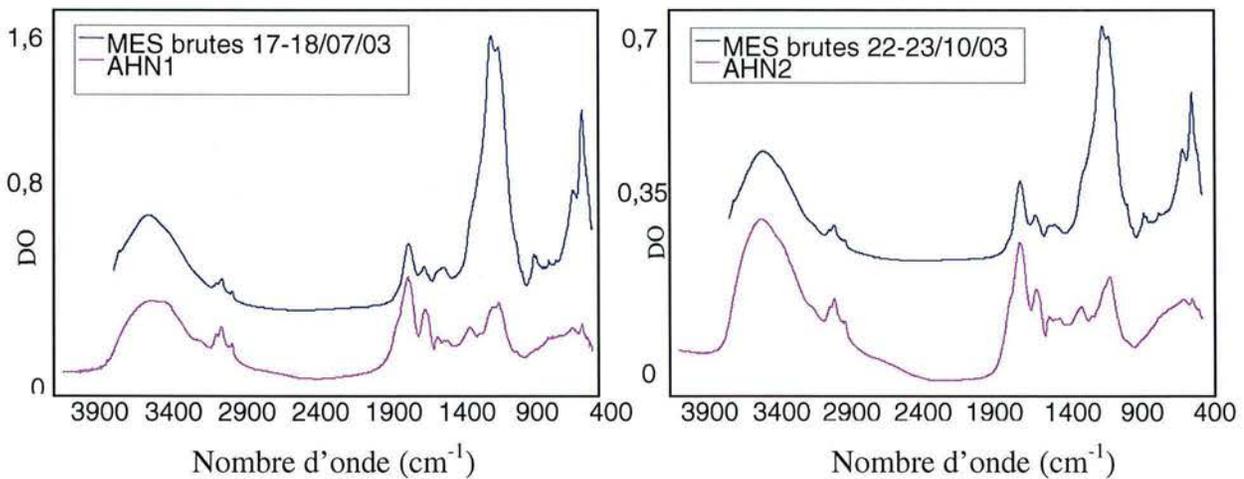


Figure II.2(6)
Effets de l'extraction des acides humiques naturels des 2 prélèvements (17-18/07/03 et 22-23/10/03) sur le statut de la matière organique des MES.

Nous pouvons constater la similitude des spectres IR en transmission obtenus pour les MES des 2 prélèvements effectués en 2003 sur le site de Richardménil. Les attributions des principales bandes d'élongation et de déformation sont présentées dans le Tableau II.2(3).²⁰

²⁰ La présence de kaolinite et de quartz a été confirmée par diffraction des rayons X (DRX). La présence d'illites et feldspath a également été décelée par DRX.

Tableau II.2(3)
Attribution des bandes principales d'élongation et de déformation IR des MES.

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Attribution	Références
3695	Elongation OH des feuillets de kaolinite	Legrand et al., 1990 Wojtkowiak et Chabanel, 1977
3620	Elongation OH des feuillets de kaolinite	Legrand et al., 1990 Wojtkowiak et Chabanel, 1977
3400	Elongation OH des groupements phénoliques et de l'eau + élongation N-H dans les amides primaires et secondaires	Andreux, 1978
3260	Elongation des OH des groupements COOH	Niemeyer et al., 1992 Andreux, 1978
3040	Elongation des C-H aromatiques	Niemeyer et al., 1992 Andreux, 1978
2955	Elongation asymétrique de C-H dans CH ₃	Niemeyer et al., 1992 Andreux, 1978
2920	Elongation asymétrique de C-H dans CH ₂	Niemeyer et al., 1992 Andreux, 1978
2850	Elongation symétrique de C-H dans CH ₂	Niemeyer et al., 1992 Andreux, 1978
1720	Elongation C=O dans COOH	Niemeyer et al., 1992 Andreux, 1978
1650	Elongation asymétrique forte de COOH et vibration de C=O dans les amides secondaires	Niemeyer et al., 1992 Andreux, 1978
1600	Elongation de C=C des groupes aromatiques	Niemeyer et al., 1992
1575	Déformation N-H dans les amides secondaires	Niemeyer et al., 1992
1545	Elongation asymétrique de C=O dans les groupements carboxylates	Niemeyer et al., 1992 Andreux, 1978
1460	Déformation OH dans les groupements phénoliques	Niemeyer et al., 1992
1415	Elongation symétrique de C=O dans les groupements carboxylates	Niemeyer et al., 1992 Andreux, 1978
1200	Elongation C-O-C et C-O dominées par les vibrations des structures de polysaccharides	Bourdon et al., 2000 Nanny et Ratasuk, 2002 Zaccheo et al., 2002
1074	Elongation Si-O dans la kaolinite + élongation C-O-C et C-O	Legrand et al., 1990 + Zaccheo et al., 2002
1024	Elongation Si-O dans la kaolinite + élongation C-O-C et C-O	Legrand et al., 1990 + Zaccheo et al., 2002
914	Déformation OH dans la kaolinite	Legrand et al., 1990
874	Déformation hors du plan des C-H des aromatiques	Niemeyer et al., 1992
777	Déformation Si-O du quartz	Farmer, 1974
696	Déformation Si-O du quartz	Farmer, 1974
650	Bande caractéristique dans la kaolinite	Legrand et al., 1990
520	Déformation Si-O	Legrand et al., 1990
465	Déformation Si-O	Legrand et al., 1990

L'extraction augmente la résolution des elongations symétriques et asymétriques des groupements -C-H dans CH₃ et CH₂ (respectivement à 2955 et 2920 cm⁻¹), ainsi que le renforcement de l'épaule à 1720 cm⁻¹ attribué à la vibration d'elongation -C=O dans les groupements carboxyliques -COOH. Les variations les plus significatives concernent l'élimination des bandes d'elongation OH (3695 et 3620 cm⁻¹) et Si-O (1074 et 1024 cm⁻¹) des feuillets de la kaolinite, ainsi que les bandes de déformation OH (910 cm⁻¹) et Si-O (520 et 465 cm⁻¹) associées. De même, les doublets à 696 et 777 cm⁻¹ attribués aux bandes de déformation Si-O du quartz disparaissent après extraction.

Nous pouvons noter que les bandes à 1070-1080 et 1020-1030 cm⁻¹ ne sont pas totalement absentes des extraits d'acide humique finaux obtenus et qu'une bande à 1200 cm⁻¹ est révélée dans le prélèvement 2. En réalité, ce phénomène s'explique par la superposition avec les bandes d'elongation C-O-C et C-O-H de structures de type polysaccharidiques dans ce même domaine de nombre d'onde (Ameil, 2000).

L'extraction permet donc bien d'éliminer la contribution minérale du milieu naturel.

II.2.3. Substances humiques synthétiques

ARTICLE 1

Soumis à Organic Geochemistry

Synthesis of amino-phenolic humic-like substances and comparison with natural river-extracted humic acids : a multi-analytical techniques approach

JUNG A.-V.*¹, FROCHOT C.², PARANT S.³, LARTIGES B.S.¹, SELVE C.³,
VIRIOT M.-L.², BERSILLON J.-L.¹

¹Laboratoire Environnement et Minéralurgie (LEM),
UMR 7569 CNRS-INPL-ENSG, 15 avenue du Charmois, BP 40, 54501 Vandœuvre, France

²Département de Chimie Physique des Réactions (DCPR-GRAPP),
UMR 7630 CNRS-INPL-ENSIC, 1 rue Grandville, BP 451, 54500 Nancy, France

³Laboratoire de Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes (LCPOC),
UMR 7565 CNRS-UHP, Université Henry Poincaré (Nancy I), 54500 Vandœuvre, France

*corresponding author: e-mail address: av1jung@hotmail.com
fax number: (0033)389647787

Abstract

Monitoring of low and high molecular weight humic-like molecules synthesis by oxidative reaction between catechol and two different main compounds, an amino-acid (glycine) and a dipeptide (triglycine), was conducted by Fourier Transform InfraRed spectroscopy (FTIR) and fluorescence measurements. The results suggest that there is an energy threshold normally reached which is necessary for the polymerisation leading to the formation of humic substances. This is substantiated by the occurrence of the humic-like fluorescence peak (around 350/450 nm for excitation/emission wavelengths), usually referred to as “alpha” component (Parlanti, E., Wörz, K., Geoffroy, L., Lamotte, M., 2000). Besides, nitrogen incorporation was found to be one of the fundamental processes governing the behaviour of fluorescence substances. The study of the synthesis of these model molecules is also a promising route to obtain a variety of materials approaching the properties and the variability of natural substances but in a somewhat more reproducible way. In this report, an approach relying on several complementary techniques is proposed. It involves elemental analysis, potentiometric titration, Fourier Transform InfraRed spectroscopy, High-Performance Liquid Chromatography, Pyrolysis Gas Chromatography-Mass Spectrometry and UV/Visible absorption spectrophotometry. Model polymers were characterised and compared to natural humic substances extracted from river water suspended matter (Moselle at Richardménil, France). All combined analytical results led to the conclusion that protein-like structures could be used to describe humic-like structures. Synthetic molecules display the main chemical features of naturally occurring humic acids derived from phenolic compounds and their physical-chemical characteristics cover a large range of different humic substances properties. They could therefore be suitable for investigating the reactivity of humic substances, with the usual limitations that arise from studying “models”.

***Key words* : Humic substances • Models • Synthesis • Multi-analytical approach • Fluorescence.**

Introduction

Humic aquatic organic matter

Humic substances account for 30 to 50% of aquatic natural organic matter (NOM). They are well known for their ability to interact with pollutants and also affect the environmental fate of organic pollutants in natural waters (Chiou *et al.*, 1986, 1987). Despite their prominent environmental role, their molecular properties and conformational structures are far from being elucidated and are still a matter of debate.

The hydrophilic/hydrophobic balance could particularly account for the complexation and transport of non-polar pollutants in natural media, such as polycyclic aromatic hydrocarbon components (PAH). Many attempts have been made to quantitatively describe NOM's hydrophobic properties in order to relate them to biological activity or to their environmental fate. The octanol/water partition coefficient (K_{ow}) is of special importance to predict pollutant solubility and has been correlated with bioconcentration factors (Davies and Dobbs, 1984) or to adsorptive capacities on activated carbon (Blum *et al.*, 1993).

Although a general qualitative description of the complexing functional groups exists, their quantification is very difficult. This is due to the nature and number of complexing not completely determined functional groups and to the unknown concentration of the free binding sites. For a long time, elemental analysis such as the nitrogen to carbon atomic ratio (N/C) was used to discriminate the aquagenic from the pedogenic origin of the humic substances (Aiken *et al.*, 1985). *According to these authors*, this difference of origin may be related to differences in environmental behaviour and reactivity. Moreover, very few analytical techniques that respect the nature and structural organisation of such complex molecules (non-destructive methods) can be used to characterise the natural "dissolved organic matter" of a river.

Due to the complexity of humic molecules, one approach consists of synthesising well-defined polymers under controlled conditions, integrating the main characteristics and properties of natural humic molecules or their precursors. The better known theories on the formation of humic substances are based on the oxidative polymerisation of the numerous phenolic molecules released by plant residues and soil microorganisms (Stevenson, 1982). Several attempts were made in the past to synthesise humic-like polymers from representative phenolic precursors by chemical or enzymatic oxidation and in the presence of a nitrogen source, generally ammonia, amino acids, or proteins (Flaig *et al.*, 1975; Mathur and Schnitzer, 1978). Stevenson (1994) extensively described the pathways of the formation of humic substances such as the lignin and polyphenol theories and the Maillard's route. Until now, few models of humic substances have been synthesised. Most of them were obtained *via* Maillard's reaction (Jokic *et al.*, 2004) which consists of a reduction of

amino-acids (melanoidin, glycine and melanoïn) by sugars (xylose). In the present work, the condensation route of the polyphenol theory (Stevenson, 1994) was chosen. Previous works by Andreux *et al.* (1980), Andreux (1981), Andreux and Munier-Lamy (1994) were used as guidelines for the synthesis of the humic material. It consists of an oxidative polymerisation using catechol and two different amino-acids (glycine or triglycine) to produce “model” molecules with various N/C elemental atomic ratios.

Analytical and characterisation methods

The development of powerful analytical techniques allows the obtention of valuable qualitative and quantitative informations in the characterisation of humic molecules. They include:

- High Performance Size-Exclusion Chromatography (HPSEC; Bailly and Margulis, 1968),
- Elemental analysis (Thurman and Malcolm, 1981),
- Pyrolysis Gas Chromatography-Mass Spectrometry (Py/GC-MS; Gadel and Bruchet, 1987),
- Potentiometric titration (Brunelot *et al.*, 1989),
- Fourier Transform InfraRed (FTIR; Niemeyer *et al.*, 1992),
- Nuclear Magnetic Resonance (NMR; Clair *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2002),
- Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS; Lead *et al.*, 1999; Egeberg *et al.*, 2002)
- ElectroSpray Ionisation-Mass Spectrometry (ESI-MS; Kujawinski *et al.*, 2002).

Reverse-phase chromatography is traditionally used for the determination of hydrophobic properties. Braumann (1986) compared the static liquid-liquid distribution and dynamic chromatographic retention of *several organic compounds* and showed the correlation between their octanol-water partition coefficient K_{ow} and their binding capacity on different chromatographic columns. High Performance Liquid Chromatography has been used to characterise different molecular weight acid or fulvic fractions isolated from the field by different separative or concentration techniques (Münster, 1999; Wu *et al.*, 2002). Several elution and column conditions were tested (Hayase *et al.*, 1984; Norden *et al.*, 1996). The development of fluorescence spectroscopy methods has allowed highly sensitive and non-destructive descriptions of the studied molecules in aqueous solutions. This technique has been widely used to characterise the protein- and humic-like natural organic matter NOM (Chen and Bada, 1992; Mopper and Schultz, 1993; Coble, 1996; Parlanti *et al.*, 2000). Several correlations between organic matter characteristics like hydrophobicity (Fang *et al.*, 1998), condensation indices (Zolsnay *et al.*, 1999), dissolved and total organic content (Buffle *et al.*, 1982; Mounier *et al.*, 1999), biological oxygen demand (Reynolds and Ahmad, 1997) have been developed in recent years, but only on natural organic matter. No

fundamental measurements related to the molecular structure have been clearly defined to explain the properties of these compounds either. Synchronous scan Fluorescence Spectroscopy (SFS) has been used for characterisation and identification of natural organic matter from different origins (Miano *et al.*, 1988; Senesi *et al.*, 1991; Coble, 1996; De Souza *et al.*, 1997). It has also been used in tracing sources of dissolved organic matter in natural water from different watersheds and in differentiating organic substances in extracts obtained from various decayed plant materials (Cabaniss and Schuman, 1987).

Humic substances are also viewed as complex and polydisperse mixtures, whose properties mostly depend on their natural formation conditions. In order to investigate important questions such as the binding potential of aquatic humic materials with respect to other pollutants, it appears that the use of a stock of these materials with constant characteristics is necessary. Among these characteristics, the variability of some of the properties is also a feature of concern. The extraction of large amounts of such materials from water does not offer full satisfaction as the stock is bound to be used up. Another extraction would probably yield materials with completely different properties. Model molecules avoids this inconvenience, provided that a reliable synthesis method is followed.

The objectives of the present work are:

- (1) to synthesise models of some humic substances
- (2) to characterise the final synthetic polymers and to compare their properties with those of humic acid extracts from aquatic suspended matter
- (3) to correlate the data from spectrofluorimetric techniques with contents and properties derived from usual analytical tools (elemental analysis, potentiometric titration, FTIR spectroscopy, HPLC, Py/GC-MS and UV/Visible absorption spectrophotometry).

Materials and Methods

Synthetic and natural humic substances

Catechol (99% purity analytical grade), glycine (> 97% pure) and triglycine (> 97% pure), NaH₂PO₄ (99% purity analytical grade) and Na₂HPO₄ (99% purity analytical grade) were purchased from Sigma-Aldrich Chimie (Lyon, France) and were stored at 5°C in the dark. For all sample preparation and dilutions, Milli-Q® ultra-pure water from Millipore (Billerica, MA, USA) was used.

The general procedure described by Andreux *et al.* (1980), was applied in the case of the polymers prepared with catechol and either glycine or triglycine. Catechol (6.6 g) was dissolved in 500 mL of a solution of sodium phosphate buffer NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ at pH = 8 to obtain a 0.03 M

catechol solution. It was then mixed with an equal volume of buffered glycine or triglycine 0.03 M solution. The resulting mixture was then allowed to react in a 2 L flask in the dark at 25°C and under a pure oxygen constant pressure (0.9 bar) for 5 days. One mL aliquots were withdrawn at 0, 1, 6, 24, 48, 72 and 120 hours reaction time in order to assess polymerisation kinetics and completion. Five hundred microliters of the mixture were freeze-dried to perform FTIR spectroscopy measurements. Five hundred microliters were diluted 200 fold to perform the UV/Visible absorbance and the Excitation-Emission Matrices (EEM) fluorescence measurements. This dilution was necessary to avoid UV/Visible spectrophotometer saturation and to limit the inner filter effects for fluorescence measurement. At the end of the reaction, the solutions were transferred to dialysis bags Spectra/Por® 7 (Roth Sochiel, Lauterbourg, France). The fraction over 8 kDa molecular cut-off was collected for the polymer prepared with glycine (CGHA). Successive dialysis steps with 3 different molecular weight cut-offs were used to isolate 2 different triglycine molecular weight fractions (1-3.5 kDa, CTHA1; above 8 kDa, CTHA2). The fraction below 1 kDa, constituted of non-reactive or remaining free monomeric and oligomeric compounds, was not kept. The CTHA1 and the CTHA2 fractions were collected to obtain respectively a fulvic-like and a humic-like range of molecular weight organic compounds (Schnitzer and Khan, 1972). The final forms of all the polymeric humic acids were sodium saturated. The different fractions of polymer solutions were freeze-dried and weighed. The powders were carefully stored in glass bottles at 4°C in the dark.

Natural suspended matter samples were collected with a 17 000 rpm flow-through (1 m³/h) centrifuge at the water intake of the Urban Community of Nancy, France. This sampling point is located between the pumping station in the Moselle River and the retention basins used as an alternative water resource. The water was pumped from 20 cm below surface level. The suspended solids were collected on Teflon plates covering the inner surface of the centrifuge. Each sample was placed in a glass bottle and stored at 4°C during transportation and storage prior to treatment. The extraction of humic substances began within 24 hours after arrival at the laboratory. Two samples were collected, NHA1 under dry and “hot” summer conditions, and NHA2 under rainy and cold fall weather conditions. Extraction was carried out according to the International Humic Substances Society (IHSS) standard procedure for the isolation of humic fraction of the bulk solid earth materials with slight modification (Thurman and Malcolm, 1981). During the dissolution step of the humic acid fraction, NaOH 0.1 M was used instead of KOH. This base was chosen in order to obtain the sodium form of the final humic acid, so as to better compare these extracts with the synthetic products. For the same reason, crystallised NaCl was added to flocculate the mineral fraction (instead of KCl). Because of the difference in the flocculation potential of these two salts,

the NaCl dose was recalculated according to results from Bonneau and Souchier (1994). Moreover, Engebretson and von Wandruska (1999) mentioned that the HF treatment could totally change the hydrophobic characteristics of humic substances. This is the reason why no purification (HCl/HF treatment) was performed in order to preserve the final structure of the macromolecules. Dialysis was performed against distilled water with a 8000 molecular weight cut-off (Spectra/Por® 7, Roth). It should be mentioned that no organics under this molecular weight cut-off were obtained.

Overall characterisation methods

Elemental analysis of humic acids fractions were performed on a 1108 Carlo Erba (Orono, ME, USA) auto-analyser.

Dissolved Organic Carbon (DOC) was measured with a 5000 A Carbon Analyser from Shimadzu (Kyoto, Japan) using high temperature (680°C) and catalytic oxidation. For 0.45 µm filtered solutions (PC Whatman®), DOC was obtained by difference between the Total Carbon and the Inorganic Carbon contents (measured after acidification at pH 2 with HNO₃).

Fourier Transform Infra-red (FTIR) spectroscopy of 1 mg of HA compound in 100 mg KBr pellets were determined on a IFS 55 Bruker spectrometer (Billerica, MA, USA) with a deuterated triglycerine sulfate detector. The samples were first carefully dried in a dessicator containing silica gel and measured at the rate of one point every 4 cm⁻¹.

For the Py/GC-MS measurements, 0.4 mg aliquots of humic acid powder were used. Each sample quartz holder was then inserted into a filament pyrolyser Pyroprobe 2000 from CDS (Oxford, PA, USA) and then heated to 720°C at a rate of 20 °C/ms. The final temperature inside the quartz tube was controlled with a K-type thermocouple minithermometer and maintained at 625 +/- 5°C. After pyrolysis, the fragments were separated on a 30 m DB WAX from Agilent (Palo Alto, CA, USA) fused silica capillary column programmed from 30 to 220°C at a rate of 3°C/min. The identification was performed on a mass spectrometer operated at 70 eV and scanned from 30 to 350 amu at 1 scan/s. The quantitative method of characterisation described by Bruchet *et al.* (1990) was used to assist sample comparison. Each pyrolysis fragment was assigned to one of the following four types of organic compound families: carbohydrates, proteinic materials, amino-sugars or polyhydroxy-aromatic polymers. Fragments that could not be assigned to one of the four previous categories were lumped into a “miscellaneous” category.

Acidic titration was performed using a potentiometer (precision of 0.1 mV or 0.001 units of pH) and a Tacussel combination glass electrode both from Radiometer (Villeurbanne, France). The outer chamber of the electrode was filled with saturated KCl solution. The electrode was calibrated from a potentiometric titration of a known volume of a standard 0.1 M NaOH solution. Both

solutions were made in 0.1 M NaCl. The temperature was controlled at 25.0 +/- 0.1°C. The titrations of 400 mg/L HA solution were performed with an automatic burette (precision 15 µL) under pure N₂ atmosphere. All titrant solutions were prepared free of CO₂. The initial volume of HCl (1M), added to bring the pH to 2.6, was integrated in the determination of acidities. The total titration curves were performed within the 3 to 13 pH range. The equivalent point determinations and quantitative acidity dosages were obtained using the “Derivative Isotherm Summation” (DIS) method (Villieras *et al.*, 1997; Prélot, 2001).

Hydrophilic/hydrophobic characterisation of the humic acid fractions was performed with a Shimadzu HPLC (DGU-14A, Kyoto, Japan), equipped with a C₁₈ reversed-phase column (5 µm, 150 * 4 mm) from Lichrosorb (Agilent, Palo Alto, CA, USA), a fluorescent RF-10AXL detector, an LC-10AT UP pump and an FCV-10ALVP autosampler, all from Agilent. The reversed-phase HPLC conditions were chosen according to Wu *et al.* (2002), who studied different elution conditions and HPLC columns to define hydrophobic/hydrophilic indices for molecular weight fractionated aqueous natural and commercial fulvic acids. The injection volume was 50 µL and the detector was set at Excitation/Emission (Ex/Em) 300/380 nm wavelengths for the fluorescence measurements. Aqueous solutions of 30 mg/L HA were all adjusted to pH 8.0 with HCl 0.1 M before measurements. For the elution, Milli-Q® ultra-pure water was used as solvent B, acetonitrile as solvent A. A gradient was set from 0% A to 10%, 30%, 70% and 100%, respectively, in 5, 9, 13 and 17 min time periods, and continued to 23 min with isocratic conditions (total : 40 min). The components were eluted at constant 0.8 mL/min.

UV/Visible absorption data were collected on a 2501 PC computer-driven model spectrophotometer from Shimadzu (Kyoto, Japan). Absorption of HA solutions was measured from 200 to 700 nm for the inner filter effects corrections. Whatman® quartz liquid sample holders with a light path length of 10 mm were used for both absorption and fluorescence measurements.

Fluorescence characterisation methods

Fluorescence was measured either in 2D emission acquisitions at one specific wavelength or in 3D Excitation-Emission Matrices (EEM) acquisitions or with Synchronous Fluorescence Scans (SFS).

All EEM spectra were collected using the spectrofluorometer Fluorolog Spex 3 from Jobin Yvon (Stanmore, UK). A 450 W xenon arc lamp was used as the excitation source and monochromators to select excitation and emission wavelength. Series of emission spectra were collected over a range of excitation wavelengths to generate EEM spectra. The wavelength step size was 5 nm and the speed of acquisition scanning was 4 nm/s. The excitation wavelength range

was 250-450 nm. The emission wavelength range was set from 270 to 700 nm. The entrance and exit slits of the monochromators were set to 2 nm. The sample compartment temperature was maintained at 25.0 +/- 0.1°C by an LTD6G temperature control unit from Grant (Sarose, UK). For the EEM spectra, Raman and Rayleigh scatterings were corrected by an internal correction of the DATAMAX software (Orlando, F, USA).

Synchronous Fluorescence Scans (SFS) were run at the constant 18 nm offset value ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$). The excitation and emission slits and the excitation wavelengths were respectively set at 5, 10 and 254 nm. The fluorescence spectra were obtained with the Fluorolog Spex 3 using a 1 cm pathlength quartz sample holder. In the hope of distinguishing the chemical behaviour of the various fluorophores in humic fractions, the emission spectra were recorded over a 2 to 10 pH range. The pH was adjusted using only HCl or NaOH to avoid possible interference from buffers during fluorescence experiments.

In order to compare the fluorescence intensities of all fluorescence spectra (Emission, Synchronous and EEM spectra) and to avoid equipment baseline time drift, the fluorescence was normalised with a 0.16 mg/L fluorescein solution buffered at pH 10. The maximum emission of this reference solution (512 nm for an excitation wavelength at 472 nm) was determined between measurements.

Results and discussion

Polymerisation monitoring: ways of incorporation of glycine and triglycine derivatives in quinonic moieties derived from catechol

In the reaction flask, an intense pink colour attributed to the formation of N-substituted quinones was observed after a few minutes and persisted for several hours, until a brown colour developed and reached a maximum after about 100 hours at pH 8. Kinetic studies of the absorption spectra in UV/Visible light (Fig. 1) show a progressive decrease of the absorption band of catechol at 280 nm, followed by a sharp decrease after 24 hours. The final spectrum was found as featureless as in humic substances (Hayes and Swift, 1978). The 320-330 nm shoulder was attributed to glycine combination and could be followed during the reaction process.

The amino-acid incorporation in the synthetic substances was monitored through FTIR measurements. Fig. 2 illustrates the striking difference in glycine and triglycine incorporation. According to diol and 1,2 polyol vibration band attribution (Wojtkowiak and Chabanel, 1977), the fine 3450 cm⁻¹ band was assigned to intramolecular -OH valence vibration (νOH) and the larger

3326 cm^{-1} band to the conjugated chelation of νOH . In the CTHA synthesis, according to the same authors, the triglycine incorporation can be followed through the monitoring of the free νNH for amines and amides at 3382 cm^{-1} and the associated νNH at 3050 cm^{-1} . The high resolution of these normally broad OH stretching peaks suggest very well-structured N-quinone derivatives during the first step of CTHA polymerisation. In the catechol/glycine polymerisation, the glycine is directly incorporated into the aromatic structure, as if it was better solvated by the quinone derivatives.

It is interesting to compare these results with the synthesis kinetic monitoring by EEM. CTHA and CGHA syntheses are presented in Fig. 3. An immediate disappearance of the double fluorescence band for the two main benzene-diol peaks (centred at 270/310 and 270/650 nm) was observed for CGHA as well as for CTHA during the first step of the monitoring (Fig. 3 and Fig. 7 for catechol EEM spectrum). In the case of the CGHA polymerisation, an intermediate fluorescence state was measured after 30 hours reaction time. The corresponding fluorescence peak is centred in the 250/450 nm (respectively, excitation/emission wavelengths). No more fluorescence signals were recorded in the 270/310 and 270/650 nm regions at this stage of the process. The humic-like peak (350/450 nm) only appeared after 72 hours. For CTHA polymerisation, the main humic acid fluorescence broad band appeared after 24 hours of reaction, then enlarged and grew with time. Subsidiary signals at 270/310 and 270/650 nm persisted right to the end of the reaction.

The observed phenomena are attributed to several resonance steps occurring for quinonic derivative formation in the early steps of the process. Tyson and Martell (1972) proposed an ortho-benzoquinone formation from catechol oxidation by the transfer of two electrons, accompanied by H_2O_2 release. The system resonance stability is also evolutive during the early steps of amino-acid incorporation. In the case of the CGHA polymerisation, the total disappearance of “free” remaining quinonic fluorescent moieties after 30 hours suggests that catechol has been fully incorporated in the structure. Then, the CGHA fluorescent aromatic “nucleus” is suspected to be more homogeneous and compact than in the CTHA. In other words, to reach the same stabilisation resonance energy level (*i.e.*, comparable excitation, emission wavelengths and fluorescence intensity), CTHA moieties need 1/3 of the time taken by CGHA formation (72 hours) to organise themselves into humic-like molecular assemblies. For CGHA, the system apparently needs to go through a high energetic barrier (intermediate state at 48 hours) before organising itself into structured humic-like assemblies. These results are consistent with Andreux *et al.* (1980) gaseous exchanges kinetic measurements during the oxidation of catechol - glycine, - triglycine and other amino-acids like L and β -alanine and proline mixtures. These authors concluded that, contrary to

most amino-acids which poorly stimulate the oxidation of catechol, glycine significantly modifies the reaction kinetics due to an easier oxidative decarboxylation. The present work confirms that this process can less easily occur when oligomeric reactants (like triglycine) are used. The triglycine is also a poorer “candidate” for the nucleophilic attack by the amine part of this molecule on the quinonic intermediates mentioned above. Thanks to fluorescence monitoring, the CGHA polymer formation is also viewed as a “directed assembly” as mentioned by Zhang *et al.* (2002), more energy-demanding than CTHA polymerisation. This last polymerisation (CTHA) consists of a “self-assembly” of subunits, like those observed in some protein-like structures formation (Zhang *et al.*, 2002). These results also suggest that humic-like fluorescent compounds do not appear in the oxidation step but require oligomeric quinonic moieties to be formed. A critical energy threshold of polymerisation, required to stabilise the overall electronic energy and to allow fluorescence, was also observed: the stability of humic substances conformation could be attributed to the entropy-driven exclusion of water from the self-associated hydrophobic domains, thus decreasing the total molecular free energy. Later in the reaction process, after 120 hours of reaction, the main fluorescence peak increases in intensity and widens to the usual widths reported in the literature for excitation and emission range of humic materials (Matthews *et al.*, 1996). As proposed by Piccolo (2001), this last step can be explained by the HA supramolecular structure. The present work shows that humic substances in solution are loosely bound self-associations of different fluorescent and non-fluorescent chromophores and that intermolecular hydrophobic interactions can be assumed as the predominant binding forces. Two parallel mechanisms are proposed:

- (a) fluorophores “moving” into solvating regions that favour fluorescence and
- (b) molecular structure stiffening and stabilisation of the electronic energy due to the condensation process.

It was shown that fluorescence is a sensitive tool for the study of HA internal microdomains. Also, nitrogen incorporation in humic-like structures drastically changes the fluorescence properties of these macromolecules.

Comparative overall characterisation of synthetic and natural humic acids compounds related to their intrinsic properties.

Elemental contents expressed as percent by dry weight of freeze-dried material are listed in Table 1. Elemental atomic H/C and N/C ratios are reported in Table 2. These ratios range from 0.56 for CGHA to 1.87 for NHA1 and from 0.05 for CGHA to 0.30 for CTHA1.

H/C atomic ratio is a useful qualitative parameter when comparing the aromaticity and the hydrophobicity of humic substances (Chen *et al.*, 1977). H/C values are found to be around 1 for aqueous counterparts. Higher ratios (1 to 2) are generally found in terrestrial humic acids (Ishiwatari, 1975). As a consequence, according to elemental analysis, CTHA1 polymers represent the final term of the evolution of humic substances in natural media, where microbial derived material constitutes the major component. This evolution is due to the transportation and leaching of the humic vegetal precursors from the soil to the river. Synthetic CGHA polymer shows an elemental composition related to a soil humic material prior to any microbial proteic contribution. These ratios also indicate that NHAs are more aliphatic than the synthetic materials (Table 2). Moreover, the synthetic material aromaticity increases from CTHA1, CTHA2 and finally CGHA. The variability in the nitrogen content is noticeable between the two natural humic extracts: the high nitrogen content of the summer extract may be due to the incorporation of protein decomposition products. All data lies within ranges usually reported in the literature for humic acid (Thurman and Malcolm, 1981) except for CTHA1 which has a lower carbon content.

Fig. 4 shows the FTIR spectra of freeze-dried humic acids. OH stretching occurs in the 3380 cm^{-1} region. The 3080 cm^{-1} aromatic CH stretch is more marked in CTHA than in CGHA, suggesting that the aromatic parts of these two models are more reactive than in the other polymers since they have been less overwhelmed by the other functional constituent bands. These aromatic moieties may be more accessible for hydrophobic interaction processes. The 2920 cm^{-1} and 2860 cm^{-1} absorption bands attributed to the asymmetric and symmetric stretching vibrations, respectively of aliphatic C-H bonds in methyl or methylene units, show an increase in absorbance from CTHA1 to CTHA2 and to CGHA, concomitant with the presence of longer aliphatic chains in CTHA than in CGHA. The C=O stretching vibration band at 1730 cm^{-1} mainly due to carboxyl groups is only easily visible for CGHA and CTHA1. The most significant differences among all our FTIR spectra occur in the $1650\text{-}1540\text{ cm}^{-1}$ region. The 1650 cm^{-1} band is assigned to the aromatic C=C double bonds conjugated with C=O or COO- (Schnitzer and Skinner, 1968) and the 1540 cm^{-1} one to the amide II band. These two bands are present in both CTHA spectra. A decrease of the amide band at 1540 cm^{-1} in CTHA1 compared to CTHA2 can be noticed. This is consistent with the presence of more peptidic links present in the higher molecular weight fractions. In the CTHA2 spectra, the 1603 cm^{-1} band could be attributed to the aromatic C=C pure skeletal stretching of the aromatic ring of phenolic compounds. However, in the CGHA spectrum, this region is very different: the amide I band (C=O stretching + contribution from C-N stretching) is swamped in a peak which exhibits a maximum at 1591 cm^{-1} . In the CGHA polymer, the amide II band due to NH deformation and contribution of C-N stretching seems to be shifted to 1480 cm^{-1} .

Séné *et al.* (1994) observed such features in peptidic extracts from cell walls of five angiosperm plants. The corresponding wavenumber in the FTIR spectra of their extracted biopolymers were attributed to a “secondary structure effect”, occurring in proteins. Such an effect can be expected in the humic substances studied in this work. The 1380-1410 cm^{-1} band was attributed to C-H bond and the 1250 cm^{-1} region to C-O-H deformation and C-O stretching of phenolic compounds added to the asymmetric C-C-O stretching of ester groups. The exact wavenumber of this band varies from one humic acid to another and depends either on the attached phenolic substituted groups or on the secondary effect of the structure. The 1230 cm^{-1} peak corresponds to the amide III band, due to the interaction between C-N stretching and in-plane C-N-H bending of proteins. The 1120-1160 cm^{-1} broad band is attributed to the -C-OH stretch of aliphatic OH, the 956, 875 and 806 cm^{-1} to the aromatic out-of-plane CH bending (Niemeyer *et al.*, 1992). The natural extract FTIR absorption spectra are similar to those obtained with the synthetic products, although the aliphatic CH_3/CH_2 groups are more prominent. Moreover, the relative absorption intensity at about 1620 cm^{-1} (attributed to aromatic C=C and conjugated C=O) is comparable in both types of substances. The main differences between the two NHA extracts is that for the first one, the NH elongation is much more pronounced than in the NHA second extract (enlargement of the near 3400 cm^{-1} peak) due to the high contribution of protein part in this extract. Furthermore, the aromatic structure (3080 cm^{-1} aromatic CH stretches and near 800 cm^{-1} to the aromatic out-of-plane CH bending) is more pronounced, perhaps due to a higher content in structured aromatic moieties. All spectra exhibit the same main features encountered in humic component IR absorption spectra (Andreux *et al.*, 1977; Aiken *et al.*, 1985; Niemeyer *et al.*, 1992).

Pyrolysis GC-MS results are reported in the Table 3. The polyhydroxy aromatic, amino-sugars and protein contents of CTHA1 and CGHA fractions were found to be similar. The important quantity of pyrrole in the CGHA fraction indicates that the cyclisation reactions necessary to produce such heterocycles is favoured. This is due to a closer spatial proximity between the amino and phenolic reactant groups or to a larger resonant electronic delocalisation effect (abundance of phenolic reactive sites). Only the “polysaccharide” part, essentially composed of carboxylic acids (acetic acid) and in lesser amounts by furan derivatives and ceto-cyclic pyrolysis fragmentation products, differentiates the two fractions. The CO_2 released by CGHA pyrolysis is six times more abundant than for the CTHA fractions. In CGHA fractions, the aliphatic carboxylic parts are supposed to be more numerous and labile than in CTHA. A similar molecular model could be proposed for the synthetic polymers, composed of a rather compact polyhydroxy-aromatic nucleus and labile aliphatic chains of variable lengths. Benzene-diol is detected only for the CTHA fractions. In the CGHA polymer, phenolic functions could be involved in intermolecular

bonds or could be totally oxidised into quinone derivatives during the first step of the process, so that no residual “free” catechol moieties are isolated from the structure by Py/GC-MS. In CTHA polymers, the benzene-diol functions are more abundant in the final polymerisation product than in CGHA. When considering the protein and amino-sugar contents in synthetic polymers, acetamide and methyl-acetamide are found to be three times more abundant in CTHA2 fraction than CTHA1. Bruchet *et al.* (1990) studied pentaglycine pyrolysis and concluded that unusual acetamide derivative proportions as compared with general peptide composition were due to glycine properties. In CTHA2, the triglycine is also fully incorporated, mainly in non-branched or substituted peptidic chains. On the other hand, in CTHA1 fraction, the triglycine part is involved with other peptidic substituents and is not fully incorporated in the final polymer. In natural humic extracts, the phenolic peak may originate from tyrosin. However, the unusually high amount of *p*-cresol in the first extraction (NHA1) is not fully explained. Other bacterial or vegetal phenolic derivatives (especially lignin or tannin pigments) may occur, due to the exceptionally dry and warm weather conditions during the sampling. These compounds also contribute to *p*-cresol formation. Other protein derivatives like tryptophan, revealed by the indoles, are also present. An explanation of this high tryptophan contribution is found in the very diversified proteic nature of the natural extract. One criterium determined by Bruchet *et al.* (1990) to distinguish between proteic and polyhydroxy aromatic origins for the pyrolysed phenolic fragment is the *p*-cresol to phenol ratio. The lower this ratio is, the more likely a polyhydroxy aromatic origin for the phenolic part is. Since NHA2 shows a larger amount of aromatic moieties and a lower protein content than NHA1, a change in protein nature from “hot weather” to “cold weather” conditions can be suspected. Natural and synthetic humic substances are discriminated by the aromatic to protein ratio: the natural substances contain a higher amount of aromatic structures and a lower amount of proteins than synthetic materials.

Table 1 also gives the acidity dissociation constants and amounts obtained for the humic substance fractions. Three pK_A were determined by the DIS method (Villieras *et al.*, 1997; Prélot, 2001). The lower value (pK_{A1}) is attributed to carboxylic acidity, the second (pK_{A2}) to amino-phenolic acidity and the third one (pK_{A3}) to phenolic acidity (Andreux *et al.*, 1977). The two CTHA molecular weight fractions have similar pK_A values, which is not surprising since they are issued from the same polymerisation process. Therefore, the same functional acidic groups are present for the final products. The most surprising result is that their acidic content is similar. Such differences remain to be investigated, especially by studying the relaxation during the titration process. CGHA has a very different acidity titration feature as compared to CTHA. The explanation could be found in the different mode of glycine incorporation during the polymerisation step. The

two first acidities are close to those obtained for benzoic derivative acids; the third one could correspond to charge delocalisation in phenolic groups (Aiken *et al.*, 1985). Carboxylic groups due to glycine incorporation are more abundant in the synthetic polymers whereas phenolic groups are ten times more numerous in natural substances than in synthetic products. These results clearly show that CTHA exhibits the carboxylic and phenolic acidities that are also found in natural humic compounds from the Moselle River. The pK_{A1} and pK_{A3} values (Table 1) are consistent with literature data (Barnejee, 1979; Aiken *et al.*, 1985). The pK_{A2} determined to fit the DIS method is consistent with Andreux *et al.* (1977) findings, attributing this second acidity to combinations of glycine with carboxylic-like structures. This pK_{A2} only accounts for less than 5% of total acidity amounts.

To quantify the hydrophilic/hydrophobic balance ratio, two main elution domains are found in HPLC chromatograms (Fig. 5). Components with a retention time below 11 min were considered as “hydrophilic” moieties since they are essentially eluted with the polar eluant (Milli-Q® ultra-pure water). Small peaks obtained below 5 min retention time are attributed to salts (NaCl) or other traces of small constituents. Peaks with elution time over 20 min (which corresponds to isocratic acetonitrile conditions) were integrated for the hydrophobic contribution quantification. Hydrophobic Indices obtained by Reverse liquid Phase chromatography (HIRP) are reported in Table 2. The synthetic fractions exhibit significantly higher HIRP than the two natural extracts. Using this separative technique, the classification of HA fractions from more to less hydrophobic is the following: CGHA, CTHA2, CTHA1, NHA2 and NHA1. As mentioned before, this is a global parameter, since the nature of the hydrophilic/hydrophobic moieties cannot be taken into account, as the different peaks found in the two domains correspond to several constituents. The relative retention times are longer than those reported by Wu *et al.* (2002). The very hydrophilic constituents (fulvic part) were not present in the compounds studied in the present work.

HA UV/Visible spectra are presented in Fig. 6. For all HAs, a 270 nm chromophoric band occurs. For synthetic substances, it can be attributed to phenolic moieties and, in natural extracts, to both phenolic and partly complexed protein bonds (Pretsch *et al.*, 2000). For synthetic polymers, glycine or triglycine/catechol combinations are revealed by the 320 nm absorption band. This chromophore cannot be found in NHA1 and NHA2 natural extracts. For these fractions, a 400-410 nm absorption band is attributed to conjugated multiple double bonds, like in diene structures (Pretsch *et al.*, 2000). All HA UV/Visible spectra have similar shapes, rather monotonous, like those generally described for humic substances (Aiken *et al.*, 1985). E_2/E_3 (250/365 nm) and E_4/E_6 (465/665 nm) absorbance ratios were calculated for each HA fraction and the values are reported in Table 2. E_2/E_3 and E_4/E_6 ratio values are comparable to those

obtained by Konosova (1966), Banerjee (1979) and Schnitzer (1977) for different molecular weight HAs. Opposite variations for these two ratios are found for all HAs. Among synthetic HAs, CGHA has the lowest E_4/E_6 ratio. Therefore, the “condensation degree” of the CGHA aromatic carbon network is higher than for the other synthetic polymers. Conversely, the high E_4/E_6 ratio found in HACT reflects the presence of relatively large proportions of aliphatic structures in these synthetic polymers. As suggested by all previous analytical methods, the low value of the E_4/E_6 ratio obtained for NHA1 and NHA2 cannot be strictly indicative of relatively high degrees of condensation. The E_2/E_3 ratio leads to the same conclusions and it is correlated appropriately to the H/C ratio, as shown by Peuravuori and Pihlaja (1997).

Fluorescence

Excitation-Emission Matrices (EEM) and the corresponding peak wavelength values are presented in Fig. 7. The comparison of catechol EEM with final synthetic EEM spectra shows that dialysis purification efficiently removed excessive residual catechol and unreacted quinone moieties. Moreover, lyophilisation did not alter the fluorescence properties of the humic substances since fluorophores apparently remain preserved from the end of the synthesis reaction (Fig. 3) to the resuspension of the freeze-dried polymers in aqueous solutions (Fig. 7). Different fluorophores can be identified according to previous works on organic matter fluorescence characterisation (Matthews *et al.*, 1996; Parlanti *et al.*, 2000). The alpha' (250-260/420-480 nm) component is present in CTHA1, NHA1 and NHA2. Alpha (330-350/450-490 nm) peak is present in all HA synthetic and natural fractions. For NHA1, at least two other fluorophores are detected, confirming the complex mixture of fluorophoric compounds formed under sun bleaching conditions or extracted with the humic acids of the “hot weather” conditions sample. According to Mathews (1996) and to Py/GC-MS results, tryptophan contributes to the (280/350 nm) peak.

The alpha fluorescence intensity to dissolved organic content ratio (I_f/DOC) is shown in Table 2. This ratio is very useful here to discriminate synthetic HA from natural HA. Indeed, the I_f/DOC ratio is more than ten times lower in CGHA, CTHA1 and CTHA2 than in NHA1 and NHA2. The values (height, intensity) for natural extracts are higher than those determined by Buffle *et al.* (1982) for surface river waters. The large amount of phenolic groups (acidity determination and Py/GC-MS) in natural extracts can partially explain this finding. For CTHA1, the I_f/DOC ratio is very close to the phenol value determined by Buffle *et al.* (1982). In this fraction, hardly substituted phenol moieties are abundant. For CTHA2 and CGHA, the fluorophoric signals may be inhibited by the high compactness of the aromatic nucleus. In the case of CGHA, the low I_f/DOC ratio is attributable to more substituted groups on aromatic cycles than in other

HAs. This is consistent with the mechanistic synthesis model described before: the lower steric cluttering of glycine leads to a higher compactness of the aromatic nucleus, thereby explaining the observed fluorescence “self-quenching”. Moreover, when separately comparing this I_f/DOC ratio with H/C and N/C ratios (Table 2) for synthetic substances on the one hand and natural substances on the other, a strong correlation between these ratios can be observed.

More generally, it can be concluded that atomic elemental humic substance composition is not a determining factor as far as fluorescence behaviour is concerned. On the other hand, the structural organisation of humic substances, especially the peptidic bonds placed around the fluorophores (cf. kinetic results), influence the overall fluorescence pattern in such a way that fluorescent moieties are masked or, on the contrary, revealed. Furthermore, direct correlation between fluorescence intensity and DOC should also be carefully established as already noticed by Parlanti *et al.* (2000). Then, if the majority of DOC is attributed to fluorescent structures, the HA reformation capacity should be taken into account.

Fig. 8 presents alpha, alpha' and tryptophan maximum fluorescence intensities as a function of pH. For CGHA, fluorescence signals drastically increase from pH 2 to 6, then remains stable for higher pH values. The two CTHA fractions have a totally different fluorescent behaviour: in the fluorescence increase, two steps can be distinguished. The first one occurs for $pH < 4$ and the second for $pH > 6$. NHA2 results are very similar to CTHA, whereas NHA1 evolution is quite different from all other HAs. For this last case, alpha prime (alpha') compound evolution follows the tryptophan pattern. The non-linear increase of intensity of the characteristic HA peaks that occurs with increasing pH is similar to that found in previous works on DOM (Laane, 1982; Matthews *et al.*, 1996). The acidity titration shows the ionisable fluorophore contribution to the global fluorescence signal. It can also be assumed that the CGHA alpha component signal is mostly governed by carboxyl proton removal occurring upon glycine molecule incorporation into the polymers. Moreover, this result suggests that carboxylic moieties are sufficiently close to aromatic rings to allow an electron charge delocalisation. This is sufficient to account for the fluorescence increase since aliphatic carboxylic groups cannot fluoresce. CTHA fluorescence is governed by carboxylic proton exchange in the lower pH range. The second fluorescence increase ($pH > 6$) can be attributed to the removal of protons from phenolic moieties. The same mechanism can be suggested for NHA2 fluorescence evolution, in a quantitatively different way. NHA1 behaviour can be explained by other amino-aromatic group contributions. As suggested by Matthews *et al.* (1996), protein fluorescence is directly attributable to bacterial activity in surface waters, where fluorescent humic substances may be bleached by sunlight. It is also not surprising to have this kind of contribution for NHA1 extract collected under “hot weather” conditions. In summary, as pH

increases, carboxylic and phenolic acidities are dissociated. Fluorescence related to π electrons of the nucleus constitutes a baseline. Since acid site dissociation locally increases electron delocalisation, fluorescence will increase with increasing pH.

As shown in Fig. 9, the synchronous spectrum of each humic fraction exhibits a different spectral line shape at various pH (2-10). This technique allows a better discrimination between the different fluorophores. CTHA1 shows a simple spectrum with a single peak at 350 nm for pH < 10 and exhibits a second peak at 410 nm for pH 10. CTHA2 presents the two same peaks and a similar behaviour with respect to pH. An additional peak at 320 nm can be observed, which disappears with increasing pH. CGHA SFS spectrum is composed of more resolved peaks. A 520 nm peak only appears above pH 4 and increases with increasing pH. The pH influence is very different for CGHA and CTHA, since the overall signal intensity increases for CGHA whereas it decreases for both CTHAs. Moreover, relative fluorescence intensity values are stronger for CTHA than for CGHA over the whole wavelength range. The two NHAs present more decreasing fluorescence spectra with increasing excitation wavelength and the overall intensity decreases with increasing pH. The NHA1 peak (450-470 nm) is especially pH-dependant and decreases in intensity with increasing pH. All SFS spectra are consistent with previous works on humic substances extracted from soils or water (Cabaniss and Shuman, 1987; Fang *et al.*, 1998). This technique makes it possible to confirm that CGHA polymer has spectral characteristics closer to the soil humic extract derivatives found in natural river waters and that CTHA is closer to aquatic humic substances (Galapate *et al.*, 1998; Fukushima *et al.*, 2001) and from natural humic acids studied in this work. It is suggested that the observed fluorescence intensity enhancement results from conformational changes in humic materials. As mentioned before, a high condensation degree, like in the case of CGHA, or an aggregation state like in the case of CGHA at pH 2, may lead to fluorescence intensity inhibitions due to self-quenching of the fluorophores within the macromolecular structure. With increasing pH, fluorophores become “free” to exhibit their signals. Acid titration works on CGHA allow the assignement of the 520 nm peak to phenolic moieties combined with glycine. In CTHA structures, the 410 nm peak can be assigned to phenol moieties. By comparison, the 450-470 nm NHA1 peak evolution can be assigned to phenolic structures associated with tryptophan. The poor NHA peak resolution confirms that, even if natural extracts contain large amounts of aromatic moieties, they are loosely structured.

Conclusions

Elemental analysis shows that glycine and triglycine based model molecules are very similar in elemental composition to natural organic materials isolated from river suspended solids, regardless of the season of sample collection. All values are found within the range reported in the literature, with the exception of triglycine based lower molecular weight (1-3.5 kDa), which has a somewhat lower carbon content than expected.

FTIR investigations show features that are in good agreement with previous works. This suggests that all molecular features that can be deduced from this method are present in natural organic materials as well as in the synthetic polymers. Moreover, their relative position in the molecules must be similar since this technique is sensitive to the molecular environment.

Py/GC-MS shows that synthetic and natural organic materials characterised in this work have molecular structures close enough to previously studied NOMs to give a similar partition of molecular fragments. This reinforces the previous statements about the similarity in the molecular structures of these products.

Potentiometric titration shows that synthetic polymers feature the two main carboxylic and phenolic acidities even though phenolic moieties contribute to a higher proportion in the total acidity for natural materials. This suggests that the aromatic parts of the model molecules have a higher polymerisation degree than the natural compounds isolated in this work. The model molecules look like close to final products of the oxidation evolution of natural substances. The oxygen pressure could also be optimised for future model molecule synthesis.

The hydrophilic to hydrophobic balance ratio is found to be lower (more hydrophobic) for the synthetic molecules than for the natural ones. This is consistent with the previous conclusion about the higher aromatic contribution in model molecules. The global hydrophobic character of synthetic humic-like substances is also confirmed.

Chromophoric moieties absorbing UV/Visible light are similar in both synthetic and natural humic substances, despite differences in their optical density ratios. The carbon network of CGHA is found to have a higher aromaticity than the other organic species.

Fluorescence investigations show that the I_f/DOC ratio is a discriminating parameter to distinguish model molecules from natural ones. Direct correlation of this parameter with elemental composition analysis should be made with care. This is justified by the polymerisation monitoring that proved that the three-dimensional structure layout is the determining parameter for humic-like substance fluorescence properties. The fluorescence emission – pH studies established the qualitative ionisable fluorophore contribution. Future refining experiments should lead to fluorescence titration plots (I_f/DOC versus pH). SFS – pH studies should give information

integrating fluorescence characteristics, organic molecular organisation and acid properties. According to the evolution of the overall fluorescence pattern with pH, triglycine based model molecules are closer to natural aquagenic materials than glycine based polymers. The comparison between CGHA and CTHA shows that smaller peptidic chains such as those in glycine based molecules lead to fluorescence inhibition in the alkaline to precipitation pH range. On the other hand, precipitation of materials having a more pronounced protein-like organic structure (like in triglycine based molecules) leads to progressive fluorophore revelation in solution.

Integrating all data, humic-like polymers can be viewed as an association of individual subunits constituting the final molecular architecture. Subunits are phenolic, quinoid and benzene carboxylic acids. This interpretation is closely related to protein-like self-assembly conceptual organisation already suggested by Wershaw *et al.* (1977). Investigating the self-assembly of naturally occurring organic materials is also likely to provide new opportunities to unravel complex naturally occurring phenomena such as NOM formation or organic and mineral pollutant entrapment by these organic materials.

Acknowledgments

This work was made within the framework of the programme “Zone Atelier du bassin de la Moselle”, with grants from Region Lorraine and CNRS (Contrat de Plan Etat – Région and Programme “Environnement Vie et Société”). Field-centrifuge and material sample collections provided by Agence de l’Eau Rhin-Meuse are gratefully acknowledged. The authors would like to thank T. Jacquin (Agence de l’Eau Rhin Meuse, Rozerieules, France) for providing technical assistance during field measurements, A. Bruchet and G. Filippi for Py/CG-MS analysis (CIRSEE – Ondeo Service, Le Pecq, France), O. Barrès and P. Dedonato for FTIR spectroscopy measurements, J.-M. Portal and B. Gérard (CRPG, Nancy) for humic acids synthesis elaboration and elemental analysis.

Appendix

CGHA : Catechol Glycine Humic Acid (Molecular Weight > 8 kDa)

CTHA1 : Catechol Triglycine Humic Acid (Molecular Weight 1-3.5 kDa)

CTHA2 : Catechol Triglycine Humic Acid (Molecular Weight > 8 kDa)

EEM : Excitation-Emission Matrices

HA : Humic Acid

HIRP : Hydrophobicity Indice determined by Reverse-Phase liquid chromatography

NHA1 : Natural Humic Acid ("hot weather" extract)

NHA2 : Natural Humic Acid ("cold weather" extract)

NOM : Natural Organic Matter

SFS : Synchronous scan Fluorescence Spectroscopy

References

Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L., 1985. Humic substances in Soil, Sediment, and Water. In Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L., MacCarthy, P. (Eds.) *Geochemistry, Isolation and Characterisation*. Wiley-Interscience, New-York, pp. 1-692.

Andreux, F., 1981. Utilisation de molécules modèles de synthèse dans l'étude des processus d'insolubilisation et de biodégradation des polycondensats humiques. *Bulletin de l'Association Française de l'Environnement et du Sol (A.F.E.S.), Science du Sol* 4, 271-292.

Andreux, F., Golebiowska, D., Chone, T., Jacquin, F., Metche, M., 1977. Characterisation and transformation in mud middle of a humic model issued from autoxidation of catechol/glycine system and selectively marked with ¹⁴C. In : Anderson, M.A. (Ed.), *Soil Organic Matter Studies*, IAEA, Vienna, 2nd volume, 43-57.

Andreux, F., Golebiowska, D., Metche, M., 1980. Oxydative polymerization of O-diphenols in presence or absence of amino-acids. Topics on (catechol-glycocolle) and (catechol-diglycylglycine). *General Assembly of Polyphenols Group Report, Logrono (Spain), Bulletin* 9, 178-188.

Andreux, F., Munier-Lamy C., 1994. Genèse et propriétés des molécules humiques. In Souchier B, Duchaufour Ph. (Eds.) *Constituants et propriétés du sol, Pédologie* 2. Masson, Paris. pp. 105-142.

Bailly, J., Margulis, H., 1968. Etude de quelques acides humiques sur gel de dextrane. *Plant and Soil* 29, 343-361.

Banerjee, S.K., 1979. Acidity, quotient values, and metal retention power of humic acids of varying molecular weight. *Journal of Indian Society of Soil Science* 27, 197-205.

Blum, D.J.W., Duguet, J.P., Suffet, I.H., 1993. Estimating the activated carbon adsorption of organic chemicals in water. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 23, 193-215.

Bonneau, M., Souchier B., 1977. *Constituants et propriétés du sol*, 2nd Edition. Masson, Paris, pp. 1-230

Buffle, J., Deladoey, P., Zumstein, J., Haerdi, W., 1982. Analysis and characterisation of natural organic matters in freshwaters I. Study of analytical techniques. *Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie* 44, 325-362.

Braumann T., 1986. Determination of hydrophobic parameters by reversed-phase liquid chromatography: theory, experimental techniques and application in studies on quantitative structure-activity relationships. *Journal of Chromatography A* 372, 191-225.

Bruchet, A., Rousseau, C., Mallevalle, J., 1990. Pyrolysis-GC-MS for investigating high-molecular-weight THM precursors and other refractory organics. *Journal American Water Works Association* 71, 66-74.

Brunelot, G., Adrian, P., Rouiller, J., Guillet, B., Andreux, F., 1989. Determination of dissociable acid groups or organic compounds extracted from soils, using automated potentiometric titration. *Chemosphere* 19, 1413-1419.

Cabaniss, S.E., Shuman, M.S., 1987. Synchronous fluorescence spectra of natural waters : tracing sources of dissolved organic matter. *Marine Chemistry* 21, 37-50.

Chen, R.F., Bada, J.L., 1992. The fluorescence of dissolved organic matter in the seawater. *Marine Chemistry* 37, 191-221.

Chen, J., Gu, B., Leboeuf, E.J., Pan, H., Dai, S., 2002. Spectroscopic characterisation of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere* 48, 59-68.

Chen, Y., Senesi, N., Schnitzer, M., 1977. Information provided on humic substances by E4/E6 ratios. *Soil Science Society American Journal* 41, 352-358.

Chiou, C.T., Kile, D.E., Brinton, T.I., Malcolm, R.L., Leenheer, J.A., Mac Carthy, P., 1987. A comparison of water solubility enhancements of organic solutes by aquatic humic materials and commercial humic acids. *Environmental Science and Technology* 21, 1231-1234.

Chiou, C.T., Malcolm, R.L., Brinton, T.I., Kile, D.E., 1986. Water solubility enhancement of some organic pollutants and pesticides by dissolved humic and fulvic acids. *Environmental Science and Technology* 20, 502-508.

Clair, T.A., Sayer, B.G., Kramer, J.R., Eaton, D.R., 1996. Seasonal variation in the composition of aquatic organic matter in some Nova Scotian brownwaters: a nuclear magnetic resonance approach. *Hydrobiologia* 317, 141-150.

Coble, P.G., 1996. Characterisation of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry* 51, 325-346.

Davies, E., Dobbs, M., 1984. The prediction of bioconcentration in fish. *Water Research* 18, 1253-1263.

De Souza-Sierra, M.M., Donard, F.X., Lamotte, M., 1997. Spectral identification and behaviour of dissolved organic fluorescent material during estuarine mixing processes. *Marine Chemistry* 58, 51-58.

- Egeberg, P.K., Christy, A.A., Eikenes, M., 2002. The molecular size of natural organic matter (NOM) determined by diffusivity and seven other methods. *Water Research* 36, 925-932.
- Engelbrecht, R.R., von Wandruska, R., 1999. Effects of humic acid purification on interactions with hydrophobic organic matter: evidence from fluorescence behaviour. *Environmental Science and Technology* 33, 4299-4303.
- Fang, F., Kanan, S., Patterson, H.H., Cronan, C.S., 1998. A spectrofluorimetric study of the binding of carbofuran, carbaryl and aldicarb with dissolved organic matter. *Analytica Chimica Acta* 373, 139-151.
- Flaig, W., Beutelspacher H., Rietz E., 1975. Chemical composition and physical properties of humic substances. In Gieseking, J.E. (Ed.) *Soil Components, Organic Components*. Springer, Berlin, 1-211.
- Fukushima, T., Ishibashi, T., Imai, A., 2001. Chemical characterisation of dissolved organic matter in Hiroshima Bay, Japan estuary. *Coastal and Shelf Science* 53, 51-62.
- Gadel, F., Bruchet, A., 1987. Application of pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry to the characterisation of humic substances resulting from decay of aquatic plants in sediments and waters. *Water Research* 21, 1195-1206.
- Galapate, R.P., Baes, A.U., Ito, K., Mukai, T., Shoto, E., Okada, M., 1998. Detection of domestic wastes in Kurose River using synchronous fluorescence spectroscopy. *Water Research* 32, 2232-2239.
- Hayase, K., Tsubota, H., 1984. Reversed-phase liquid chromatography of molecular weight-fractionated sedimentary fulvic acid. *Journal of Chromatography A* 295, 530-532.
- Hayes, M.H.B., Swift, R.S., 1978. The chemistry of soil organic colloids. In Greenland, D.J., Hayes, M.H.B. (Eds.) *The Chemistry of Soil constituents*. Wiley-Interscience, New York. pp. 179-230.
- Ishiwatari, R., 1975. Chemical nature of sedimentary humic acid. In Povoledo, D., Golterman, H.L. (Eds.) *Humic Substances, their Structure and Function in the Biosphere*. Center for Agricultural Publications and Documentation, Wageningen, 109-121.
- Jokic, A., Wang, M.C., Liu, C., Frenkel, A.I., Huang, P.M., 2004. Integration of the polyphenol and Maillard reactions into a unified abiotic pathway for humification in nature: the role of δ -MnO₂. *Organic Geochemistry* 35, 747-762.
- Konosova, M.M., 1966. *Soil Organic Matter 2nd Edition*. Pergamon Press, Oxford., 101-104.
- Kujawinski, E.B., Freitas, M.A., Zang, X., Hatcher, P.G., Green-Churuch, K.B., Jones, R.B., 2002. The application of electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS) to the structural characterisation of natural organic matter. *Organic Geochemistry* 33, 171-180.
- Laane, R.W.P.M., 1982. Influence of pH on the fluorescence of dissolved organic matter. *Marine Chemistry* 11, 295-401.

Lead, J.R., Balnois, E., Hosse, M., Menghetti A., Wilkinson K.J., 1999. Characterisation of Norwegian natural organic matter: size, diffusion coefficients and electrophoretic mobilities. *Environment International* 25, 245-258.

Mathur, S.P., Schnitzer, M., 1978. A chemical and spectroscopic characterisation of some synthetic analogues of humic acids. *Soil Science Society American Journal* 42, 591-596.

Matthews, B.J.H., Jones, A.C., Theodorou, N.K., Tudhope, A.W., 1996. Excitation-emission-matrix fluorescence spectroscopy applied to humic acid bands in coral reefs. *Marine Chemistry* 55, 317-332.

Miano, T.M., Sposito, G., Martin, J.P., 1988. Fluorescence spectroscopy of model humic acid-type polymers. *Soil Science Society American Journal* 52, 1016-1027.

Mopper, K., Schultz, C.A., 1993. Fluorescence as a possible tool for studying the nature and water column distribution of DOC components. *Marine Chemistry* 41, 229-238.

Mounier, S., Patel, N., Quilich, L., Benaim, J.Y., Benamou, C., 1999. Three-Dimensional fluorescence of the dissolved organic carbon in the Amazon River. *Water Research* 33, 1523-1533.

Münster, U., 1999. Amino-acid profiling in natural organic matter isolated by reverse osmosis from eight different boreal freshwaters. *Environment International* 25, 209-224.

Niemeyer, J., Chen, Y., Bollag, J.-M., 1992. Characterisation of Humic Acids, Composts, and Peat by diffuse Reflectance Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Soil Science Society American Journal* 56, 135-140.

Norden, M., Dabek-Zlotorzynska, B., 1996. Study of metal-fulvic acid interactions by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 739, 421-429.

Parlanti, E., Wörz, K., Geoffroy, L., Lamotte, M., 2000. Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Organic Geochemistry* 31, 1765-1781.

Peuravuori, J., Pihlaja, K., 1997. Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Analytica Chimica Acta* 337, 133-149.

Piccolo, A., 2001. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science* 166, 810-832.

Prélot, B., 2001. Mesure et modélisation de l'hétérogénéité énergétique à l'interface oxyde/ électrolyte/métaux. PHD thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine, pp. 1-246.

Pretsch, E., Bühlmann, P., Affolter, C., 2000. Structure Determination of Organic Compounds. Springer, Berlin, pp. 1-240.

Reynolds, D.M., Ahmad, S.R., 1997. Rapid and direct determination of wastewater BOD using fluorescence technique. *Water Research* 31, 2012-2018.

Schnitzer, M., 1977. Recent findings on the characterisation of substances from soils from different climatic zones. International Atomic Energy Agency, Vienna, 117.

Schnitzer, M., Khan, U.S., 1972. Humic substances in the environment. Dekker M. (Ed.), pp.1-327.

Schnitzer, M., Skinner, S.I.M., 1968. Alkali versus acid extraction of soil organic matter. Soil Science 105, 392-396.

Séné, C.F.B., Mac Cann, M.C., Wilson, R.H., Grinter, R., 1994. Fourier-Transform Raman and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. An investigation of five higher plant cell walls and their components. Plant Physiology 106, 1623-1631.

Senesi, N., Miano, T.M., Provenzo, M.R., Brunetti, G., 1991. Characterisation, differentiation and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. Soil Science 152, 259-271.

Stevenson, F.J., 1982. Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reactions. In Wiley, J. (Ed.) Wiley Interscience, New York, 195-213.

Stevenson, F.J., 1994. Humus chemistry : Genesis, Composition, Reactions, 2nd Edition. In Wiley and Sons (Ed.), New York, pp. 1-496.

Thurman, E.M., Malcolm, R.L., 1981. Preparative isolation of aquatic humic substances. Environmental Science and Technology 15, 463-466.

Tyson, C.A., Martell, A.E., 1972. Kinetic studies on the autoxidation of 3,5-dibutylpyrocatechol. Journal of Physical Chemistry 74, 2601-2609.

Villieras, F., Michot, L.J., Bardot, F., Cases, J.M., François, M., Rudzinski, W., 1997. An improved derivative method to study sulfate heterogeneity of clays minerals. Langmuir 13, 1104-1117.

Wershaw, R.L., Pinckney, D.J., Booker, S.E., 1977. Chemical structure of Humic Acids. Part 1, A Generalized structural model. Journal of Research of US Geological Survey 5, 565-569.

Wojtkowiak, B., Chabanel, M., 1977. Spectrochimie moléculaire. Technique et Documentation. Lavoisier, Paris, pp. 1-310.

Wu, F.C., Evans, R.D., Dillon, P.J., 2002. High-performance liquid chromatographic fractionation and characterisation of fulvic acid. Analytica Chimica Acta 464, 47-55.

Zhang, S., Marini, D.M., Hwang, W., Santoso, S., 2002. Design of nanostructured biological materials through self-assembly of peptides and proteins. Current Opinion in Chemical Biology 6, 865-871.

Zolsnay, A., Baigar, E., Jimenez, M., Steinweg, B., Saccomandi, F., 1999. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. Chemosphere 38, 45-50.

Figure captions

Figure (1) UV/Visible for CGHA and CTHA polymerisation monitoring.

Figure (2) FTIR for CGHA and CTHA polymerisation monitoring.

Figure (3) EEM for CGHA and CTHA polymerisation monitoring.

Figure (4) FTIR spectra of humic substances.

Figure (5) RP-HPLC chromatograms of natural and synthetic humic substances.

(a) divided by 2.

(b) divided by 2/5.

Figure (6) UV/Visible spectra of natural and synthetic humic substances (100 mg/L, pH 8).

Figure (7) EEM (30 mg/L, pH 8).
± 10 nm.

Figure (8) pH-dependance of alpha, alpha' and tryptophan humic substances components.

Figure (9) SFS of humic substances (30 mg/L, pH 8).

Tables

Table 1. Humic substances^a.

Table 2. Environmental significance of synthetic polymers compared with natural extract :
aromaticity and condensation degree.

Table 3. Humic substances Py/CG-MS results.

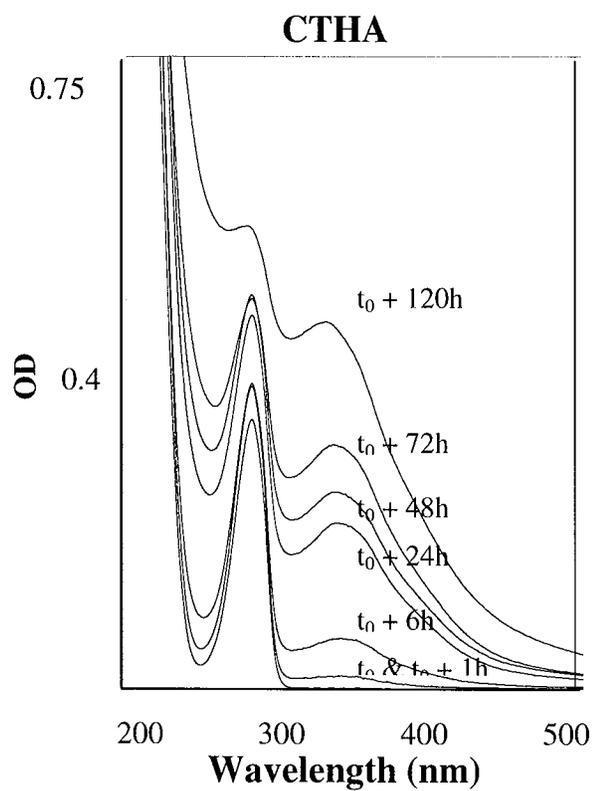
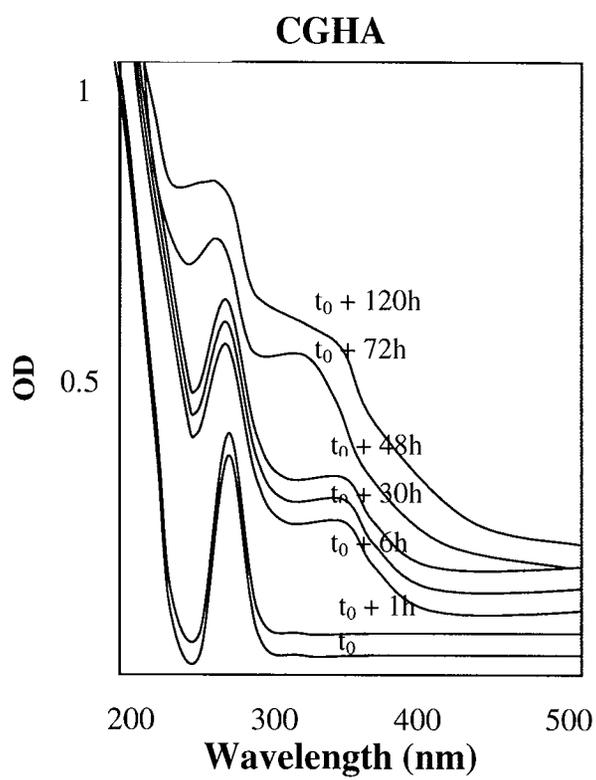


Figure (1)

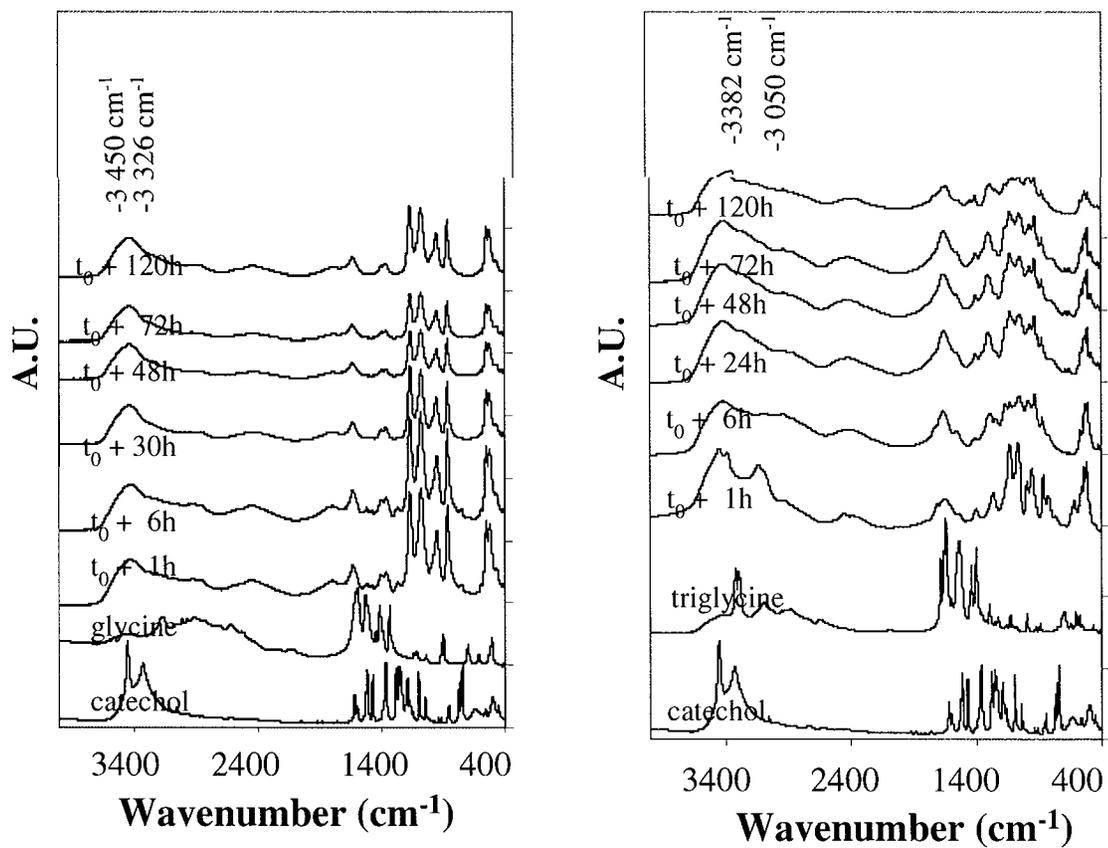
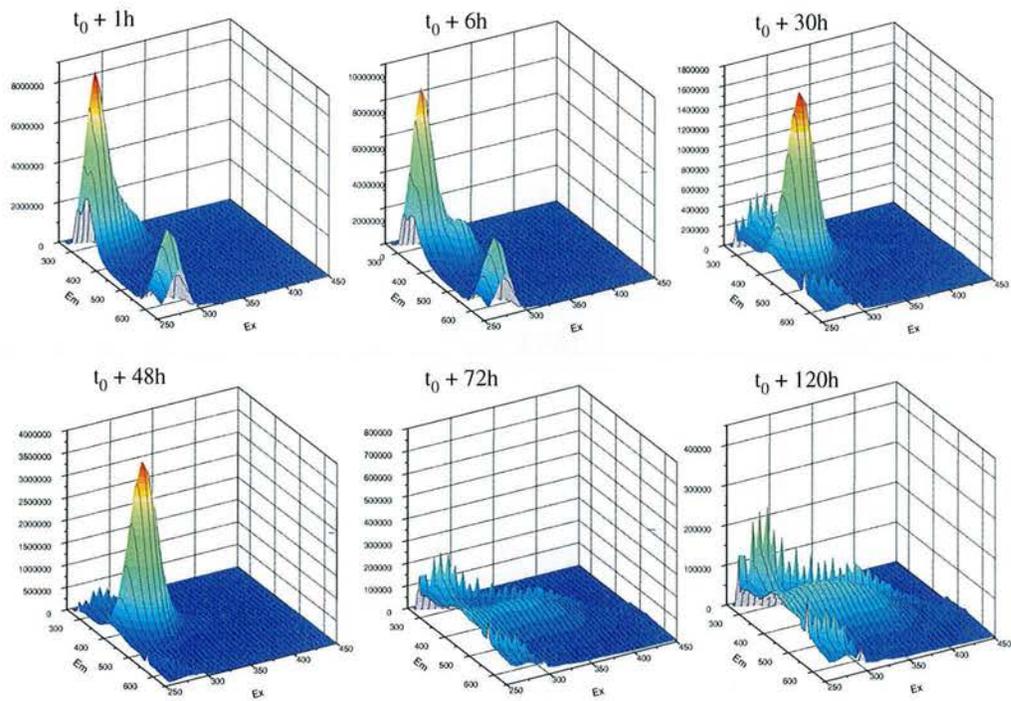


Figure (2)

CGHA



CTHA

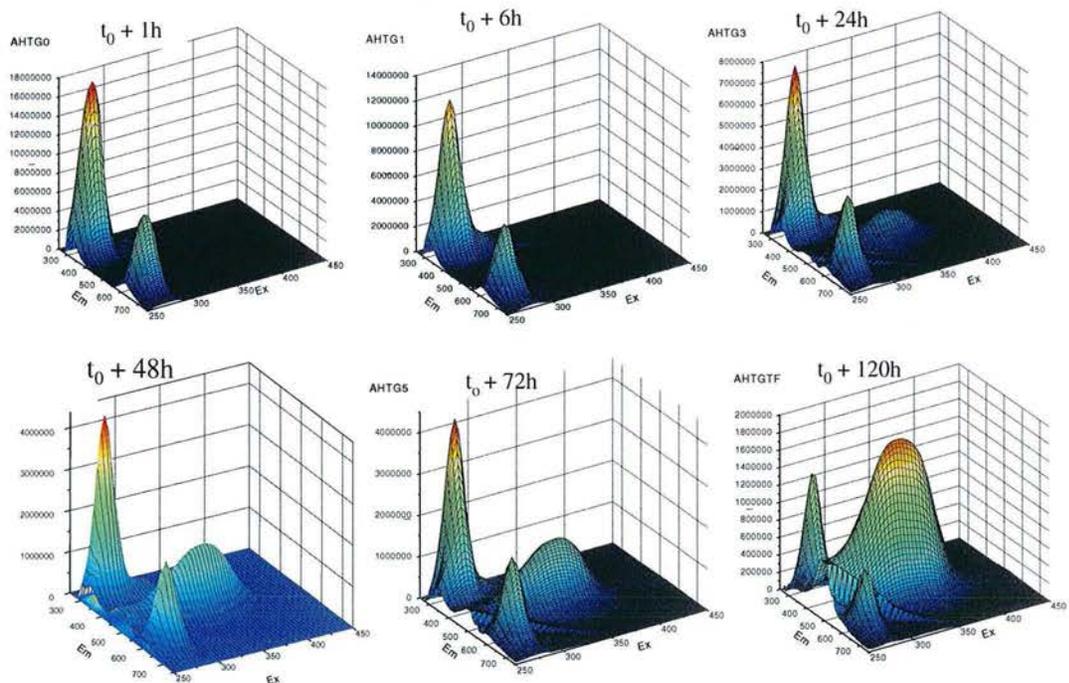


Figure (3)

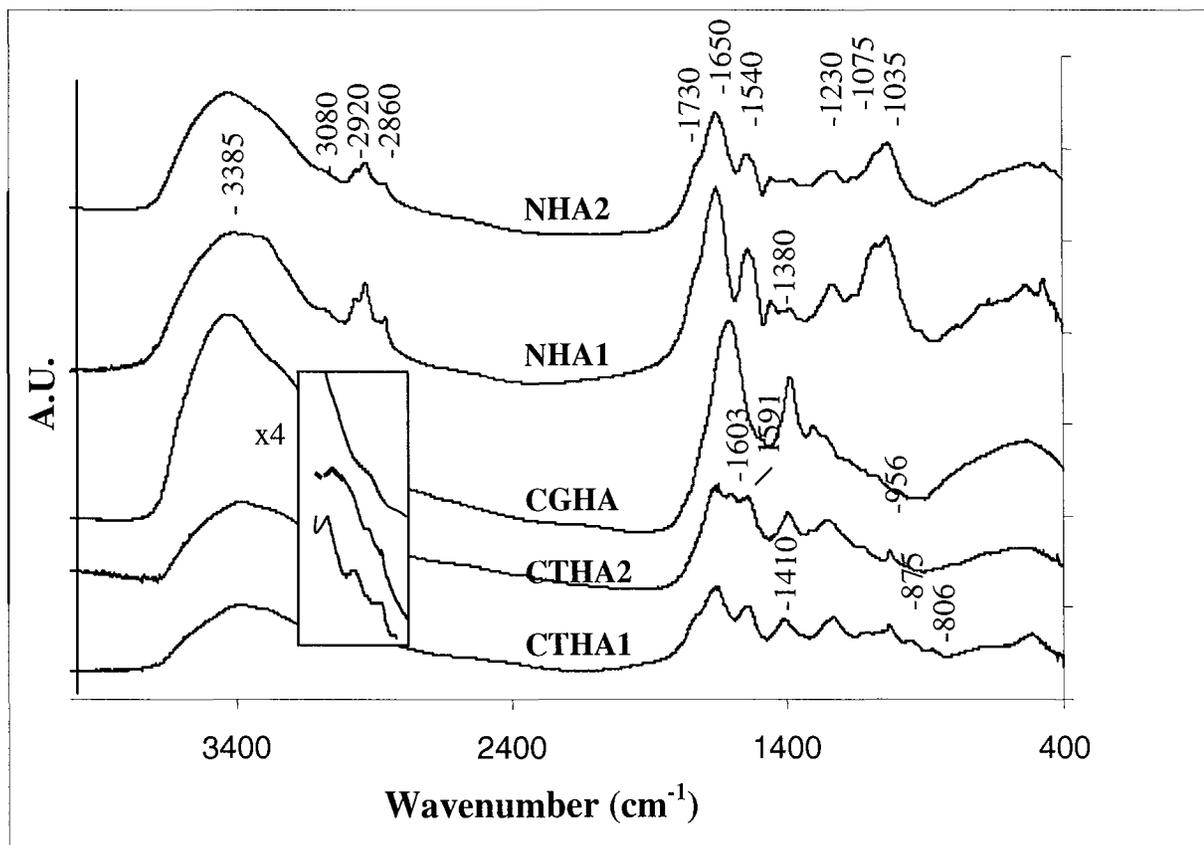


Figure (4)

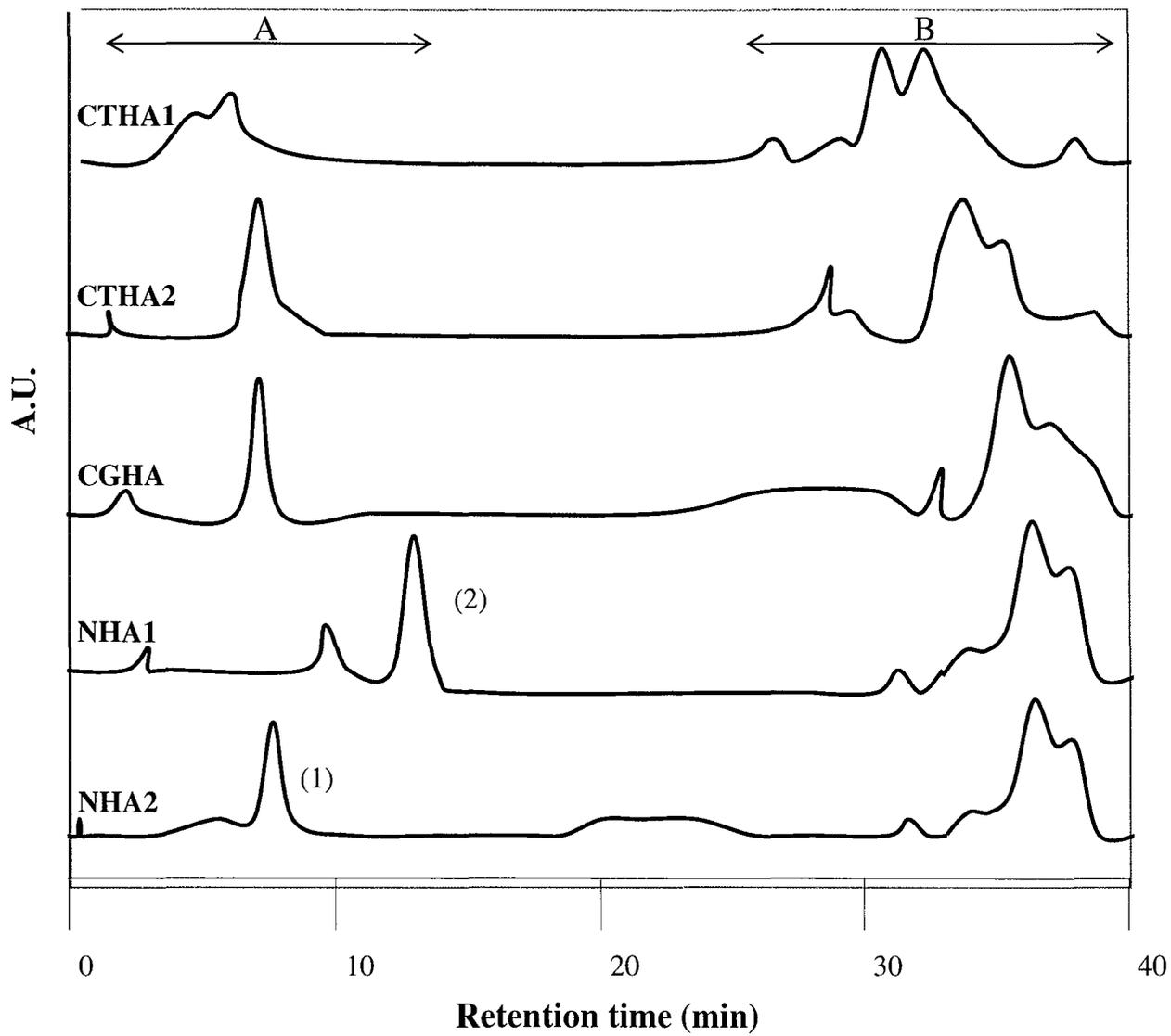


Figure (5)

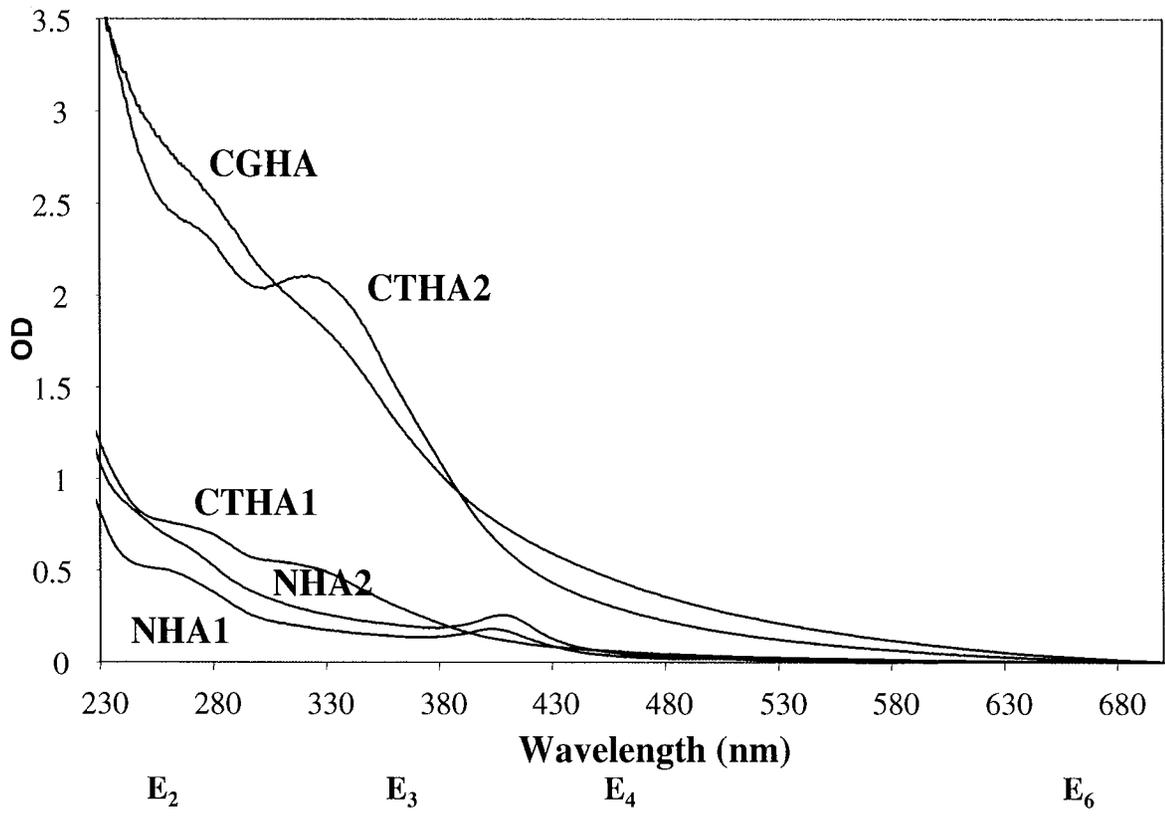
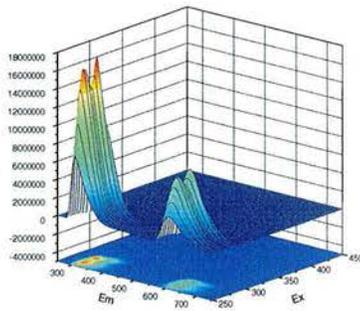


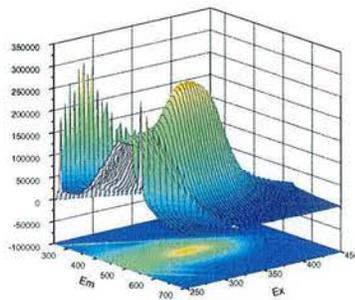
Figure (6)



Catechol

Max 1 : 260/350-650 nm

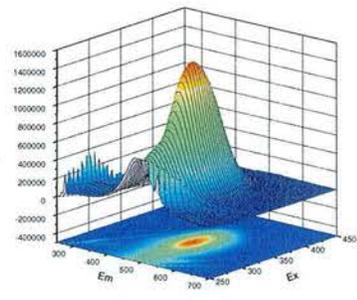
Max 2 : 280/350-650 nm



CTHA1

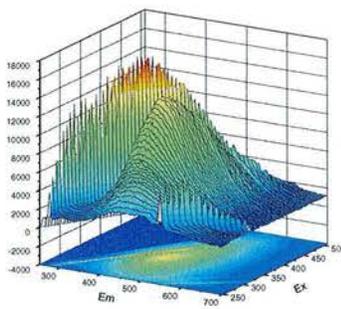
Max 1: 280/475 nm (*alpha*)

Max 2 : 336/475 nm (*alpha'*)



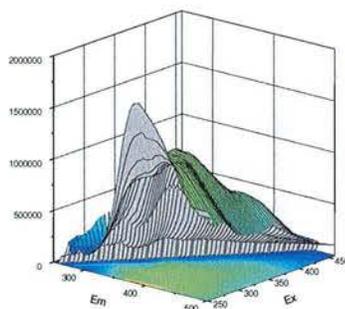
CTHA2

Max : 332/484 nm (*alpha*)



CGHA

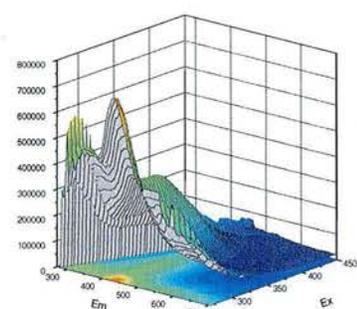
Max : 352/454 nm (*alpha*)



NHA1¹

Max 1: 270/350 nm (*tryptophan*)

Max 2: 350/430 nm (*alpha*)



NHA2

Max 1: 270/450 nm (*alpha'*)

Max 2: 340/450 nm (*alpha*)

Figure (7)

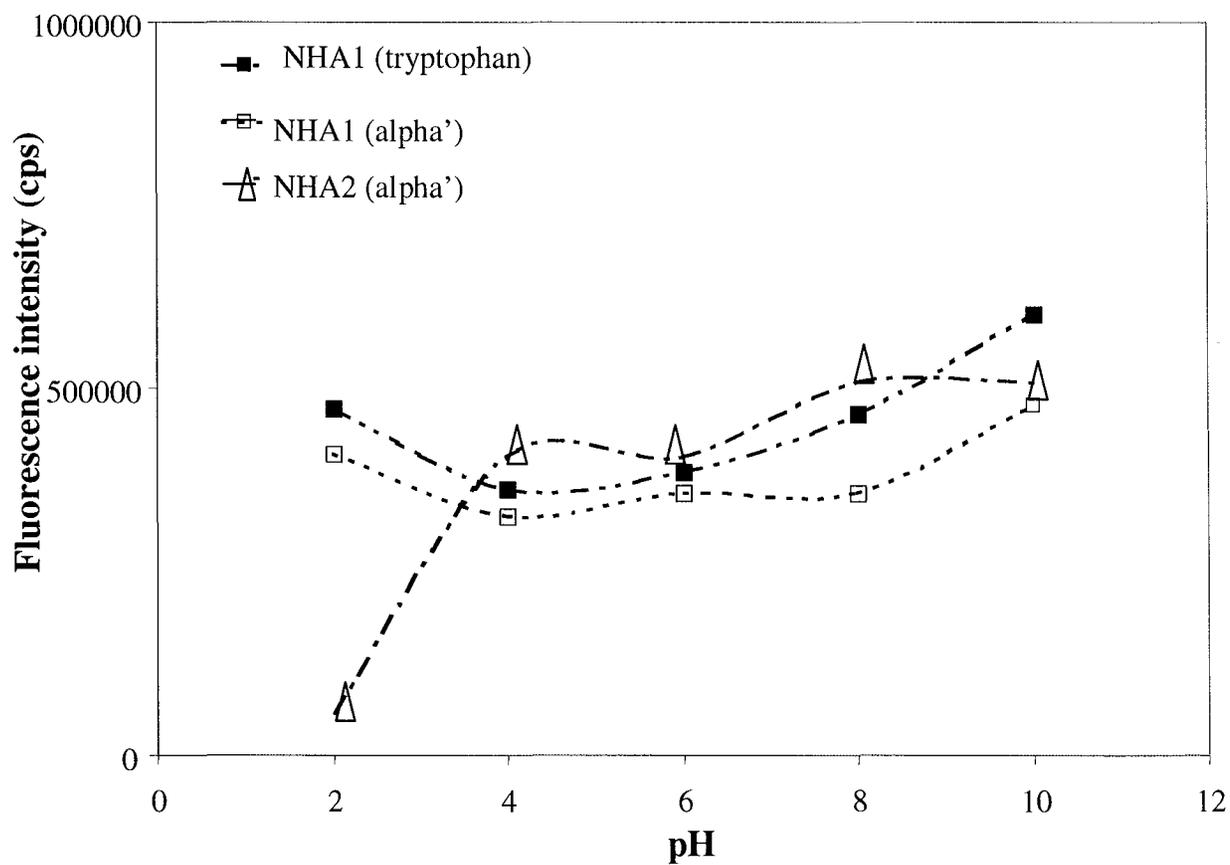
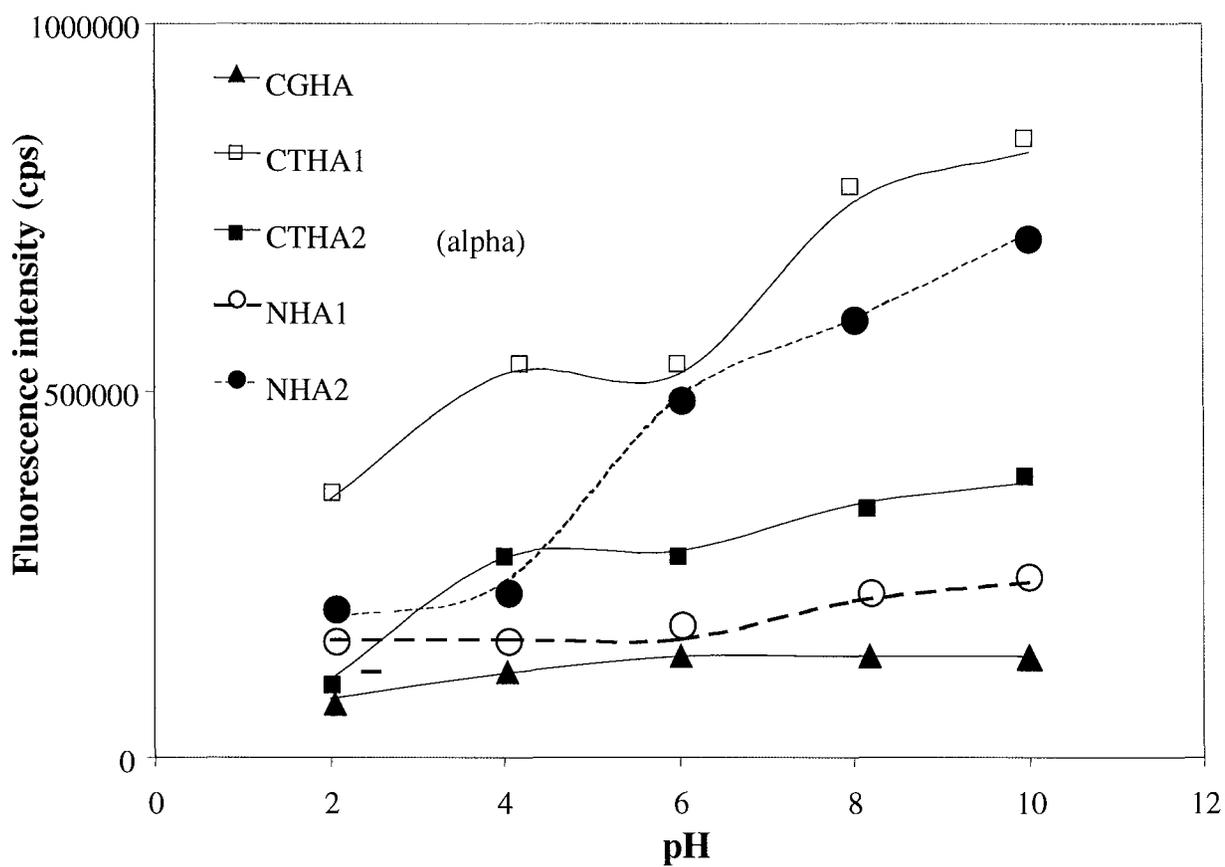


Figure (8)

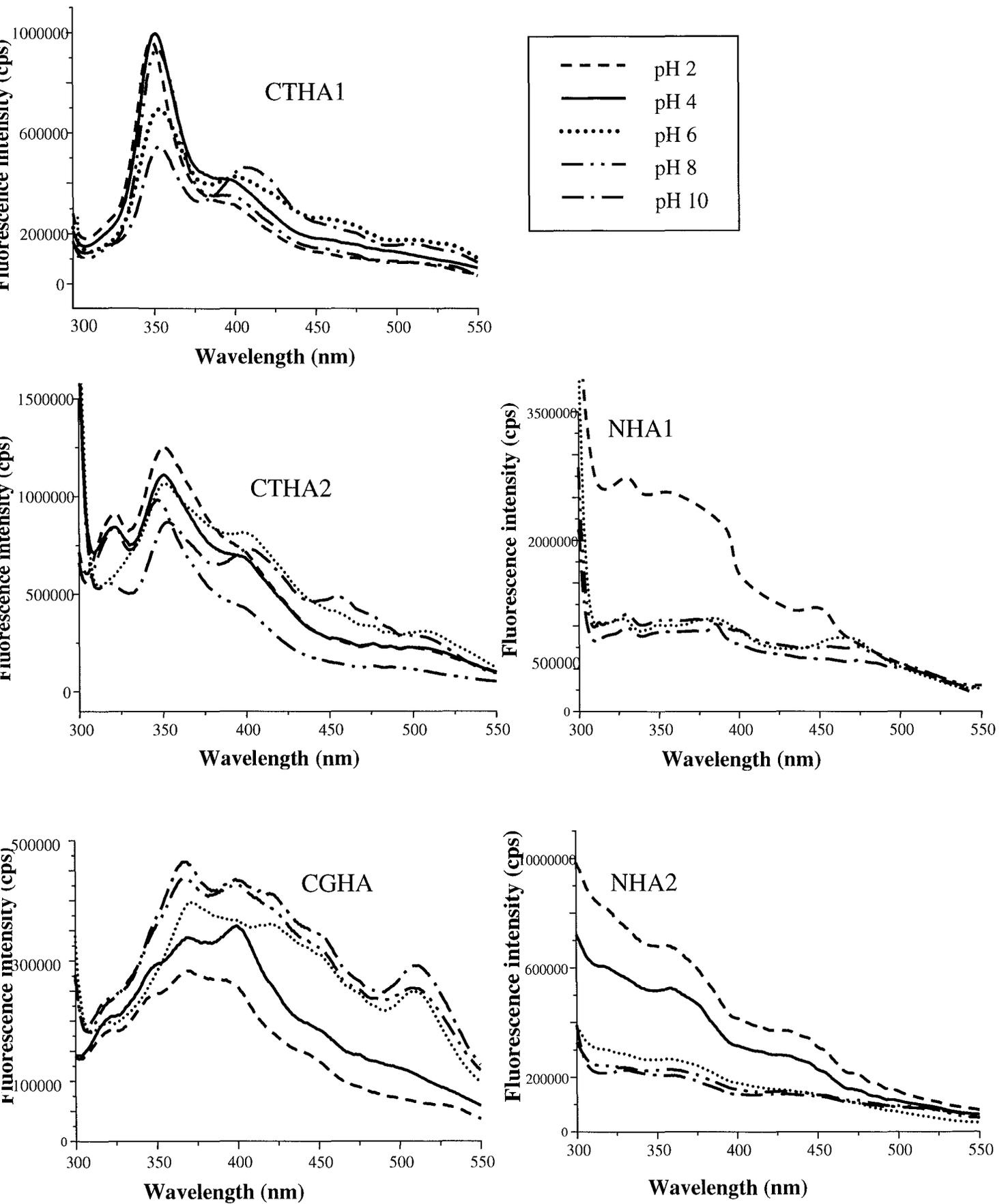


Figure (9)

Table 1.

Type of HA	%C	%H	%O	%N	pK _{A1} (meq/g)	pK _{A2} (meq/g)	pK _{A3} (meq/g)
<i>Mean natural humic acid composition¹</i>	50-60	4-6	30-35	2-6	3.7-4.3 (5.6-8.9)		9.1 (2.1-5.7)
<i>Soil extracts (Andreux et al., 1977)</i>					< 4 (0.8-1.4)	5-6 (0.6-1.3)	> 7 (0.7-1.3)
NHA1	48.58	7.56	34.35	9.51	3.7 (2.1)	8.9 (0.4)	10.1(10.6)
NHA2	44.2	5.95	44.25	5.6	3.2 (2.7)	8.5 (0.3)	9.5 (15)
CGHA	40.7	1.9	57.4	2.6	4.6 (2.3)	5.1 (0.8)	7.2 (0.6)
CTHA2	41.2	2.7	56.1	9.8	3.9 (4.1)	7.7 (0.2)	9.8 (1.3)
CTHA1	25.3	2.9	62.9	8.9	3.8 (3.8)	7.6 (0.1)	9.6 (1.5)

^a Description, elemental analysis (all in wt%) (O=100%-ΣC, H, N) and acid functional groups values.

¹ Only indicative for commercial and aquatic humic acids.

Table 2.

Type of HA	H/C	N/C	I _f /DOC	E ₂ /E ₃	E ₄ /E ₆	HIRP (%)
NHA1	1.87	0.17	68615	2.59	18.54	51.1
NHA2	1.61	0.11	15082	2.82	11.45	52.2
CGHA	0.56	0.05	11.46	1.90	19.76	84.5
CTHA2	0.78	0.20	202	2.37	26.10	82.8
CTHA1	1.38	0.30	1844	2.82	37.57	76.6

H/C and N/C : atomic ratios

I_f : fluorescence maxima intensities obtained from EEM for 30 mg/L aliquots

DOC : Dissolved Organic Carbon in mg/L

E₂/E₃ (UV measurements) calculated for 100 mg/L aliquots (See Figure 6)

E₄/E₆ (UV measurements) calculated for 100 mg/L aliquots (See Figure 6)

HIRP : Hydrophobic indexes determined by Reverse-Phase Chromatography as areas ratios of "B" peaks to "A" ones (See Figure 5)

Table 3.

Pyrolysed fragment	Classification	Areas				
		CTHA1	CTHA2	CGHA	NHA1	NHA2
Acetonitrile	Proteines	225	248	760	404	18
Toluene		13	2	30	765	116
Pyridine		3	1	8	20	9
Methylpyridine		1	1	6	10	4
Pyrrole		3	4	48	32	1
Methylpyrrole		2	0	21	26	0
Benzonitrile		0	2	12	0	13
Phenylacetonitrile		1	0	4	9	0
Indole		0	0	0	61	0
Methylindole		0	0	0	8	0
Total Distribution		39%	25%	44%	25%	16%
Hydroxypropanone	Polysaccharides	2	3	11	5	20
2 methylfurane		1	1	5	0	0
2-furaldehyde		1	2	6	0	0
Indene		2	0	2	8	3
Total Distribution		4%	4%	14%	1%	16%
Acetamide	Aminosugars	12	60	37	32	19
Methyl acetamide		0	15	0	4	2
Total Distribution		7%	20%	6%	2%	11%
Phenol	Hydroxy-Polyaromatics (HPA)	11	10	46	62	127
<i>Paracresol^a</i>		3	5	14	402	0
<i>Metacresol^a</i>		0	0	0	0	149
Total Distribution		17%	3%	16%	26%	39%
Benzene	Miscellaneous	7	0	12	191	9
Benzendiol ^b		115	120	0	0	0
Styrene		2	2	12	16	10
Acetic acid		20	31	90	36	23
Propionic acid		0	1	9	0	67
Total Distribution		33%	48%	20%	46%	18%
CO₂		575	488	2850	3765	638

^a both attributable to proteins and HPA parts (*see the text for discussion*)

^b catechol included

II.2.4. Choix et propriétés des polluants xénobiotiques

Les composés xénobiotiques sont tous les jours plus nombreux et il devient impossible d'en donner une liste exhaustive, cependant, on peut du moins préciser leurs principales fonctions chimiques. On peut citer, en guise d'exemple, les composés organiques halogénés bon marché aux nombreuses applications industrielles. On y rencontre d'excellents solvants, des pesticides variés, de très bons isolants pour les transformateurs, des antiseptiques et des agents de protection du bois (Pelmont, 1993). Des intermédiaires de synthèse, comme le chlorure de vinyle s'ajoutent à la liste. D'autres composés organochlorés sont engendrés de façon involontaire notamment lors du traitement d'eau potable, il s'agit des trihalométhanes (THM) et plus généralement des matières organiques halogénées dont certaines sont toxiques, voire cancérigènes (Oxenford et al., 1993). C'est le cas de la phase de blanchiment de la pâte à papier qui peut engendrer ce type de composés.

Deux familles de substances xénobiotiques sont d'intérêt particulier car soupçonnées d'être cancérigènes à très faibles concentrations. Il s'agit des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des polychlorobiphényles (PCB) (Richardson, 1996).

Nous avons choisi de travailler avec un représentant de chaque grande famille de micropolluants : le pyrène (HAP), le dodécyl sulfate de sodium ou SDS, le nonyl-phényl-polyéthylène glycol ou NPE, le bromure de cétyl-triméthyl-ammonium ou CTAB (tensio-actifs), l'atrazine et la sulcotrione (herbicides).

Dans ce qui suit, nous présentons leurs principales propriétés physico-chimiques, de biodégradabilité et de toxicité, leur pertinence d'utilisation dans le cadre de notre étude pour la Zone Atelier Moselle, et enfin les conditions opératoires de travail pour chacun de ces polluants (préparations des solutions utilisées pour les analyses de spectrofluorimétrie et les mesures de tension de surface).

II.2.4.1. Le pyrène, représentant des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)

Le *pyrène* (Figure II.2(7)) a été le premier représentant choisi pour l'étude des interactions HAP - MON.

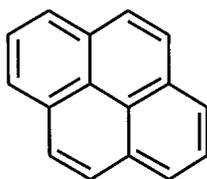


Figure II.2(7)
Le pyrène, représentant des HAP pour notre étude.

a) Propriétés physico-chimiques, biodégradabilité et toxicité

Celles-ci ont été détaillées dans la partie II.1.1.5, au travers de l'utilisation du pyrène comme sonde de polarité des milieux organisés complexes en solution. Rappelons uniquement que les composés lipophiles comme les hydrocarbures sont hydrophobes, c'est-à-dire qu'ils sont solubles dans un solvant non polaire et gras mais difficilement solubles dans l'eau. De telles substances ont tendance à maintenir un contact aussi faible que possible avec l'eau et à se concentrer dans un environnement non polaire et non aqueux. Nous comprenons donc que les tissus lipidiques de tous les organismes vivants peuvent stocker ce polluant : c'est la bioaccumulation. Il peut ensuite être métabolisé par certains organismes aquatiques ou rejeté sans dégradation dans le milieu naturel. Il n'est donc pas biodégradable. La toxicité des HAP est très variable, sept d'entre eux étant particulièrement cancérigènes ; le benzo-[a]-pyrène est le plus répandu de ces sept substances.

b) Origine et pertinence d'utilisation dans le cadre de notre étude

Les hydrocarbures polycycliques aromatiques, ou HAP, sont des sous-produits de transformation du pétrole et du charbon dont un certain nombre sont cancérigènes. On les retrouve dans les retombées atmosphériques polluées par les procédés thermiques (y compris les véhicules motorisés) ou les industries de transformation du charbon et dans les déchets de ces industries. On les retrouve donc de manière récurrente dans tous les milieux aquatiques. Ce sont des polluants ubiquistes, donc d'intérêt pour notre étude.

c) Préparation des solutions

Pour notre étude, nous nous sommes placés à une concentration de 10^{-6} mol/L en pyrène ²¹ pour les études de polarité avec l'acide humique (II.1.1.5.), soit 210 µg/L et les essais de traitabilité de la matière organique en présence de polluant (V.3. Chapitre V). Cette concentration permet de nous placer dans des conditions optimales pour l'utilisation de cette sonde de fluorescence pour l'étude de systèmes macromoléculaires organisés et se situe à une valeur moyenne située entre la norme en vigueur pour la limite de qualité des eaux brutes utilisées pour la production d'eau destinée à la consommation humaine égale à 1000 µg/L (teneur pour 6 HAP présents majoritairement dans les eaux) et la valeur de la norme du benzo-3,4-pyrène donnée pour la CEE ²² dans les eaux de consommation égale à 0,2 µg/L.

Lors de l'étude de l'inhibition de fluorescence (ou « quenching ») de la matière organique (IV.2), nous avons travaillé sur une gamme en pyrène variant de 10^{-8} à 10^{-6} M.

II.2.4.2. Le Dodécyl Sulfate de Sodium (SDS), le Bromure de Cétyle Triméthyl Ammonium (CTAB), le Nonyl Phénol Ethoxylé (NPE) : trois représentants de classes distinctes de tensio-actifs

Les composés présents dans les détergents sont principalement des tensio-actifs ioniques. Les tensio-actifs anioniques de type alkylbenzène sulfonates linéaires (ASL) sont les plus utilisés. On peut y ajouter des tensio-actifs cationiques divers qui sont principalement des sels d'ammonium quaternaires arylés ou alkylés et les tensio-actifs non ioniques qui sont des alcool-éthoxylates, des alkylphénol-polyéthoxylés ou des esters d'acides gras et de poly-glycols ²³. Les détergents industriels sont des produits complexes contenant un ou plusieurs agents de surface et des composés minéraux (carbonates, phosphates, polyphosphates, perborates), souvent associés à des matières organiques améliorantes (carboxyméthyl cellulose, alkanolamides), à des enzymes hydrolysants et à des séquestrants (dérivés de l'acide éthylènediamine tétracétique (EDTA) et de l'acide nitriloacétique) ²⁴. Ces détergents peuvent faciliter, par leur pouvoir mouillant, la dispersion et le transfert d'autres polluants comme les pesticides ¹.

²¹ Sigma Aldrich Chimie (Lyon, France), pureté > 99,9%.

²² Directive européenne (n°75/440/CEE) du 16 juin 1975, transcrite en droit français par le décret n°89-3 du 3 janvier 1989 modifié pour les eaux douces utilisées pour la production d'eau destinée à la consommation humaine.

²³ <http://surfactants.net/>

²⁴ <http://www.eau-rhin-meuse.fr>

Nous avons choisi de porter notre étude sur ces 3 classes de composés. Les molécules des tensio-actifs anionique, cationique et non ionique utilisées sont représentées dans la Figure II.2(8).

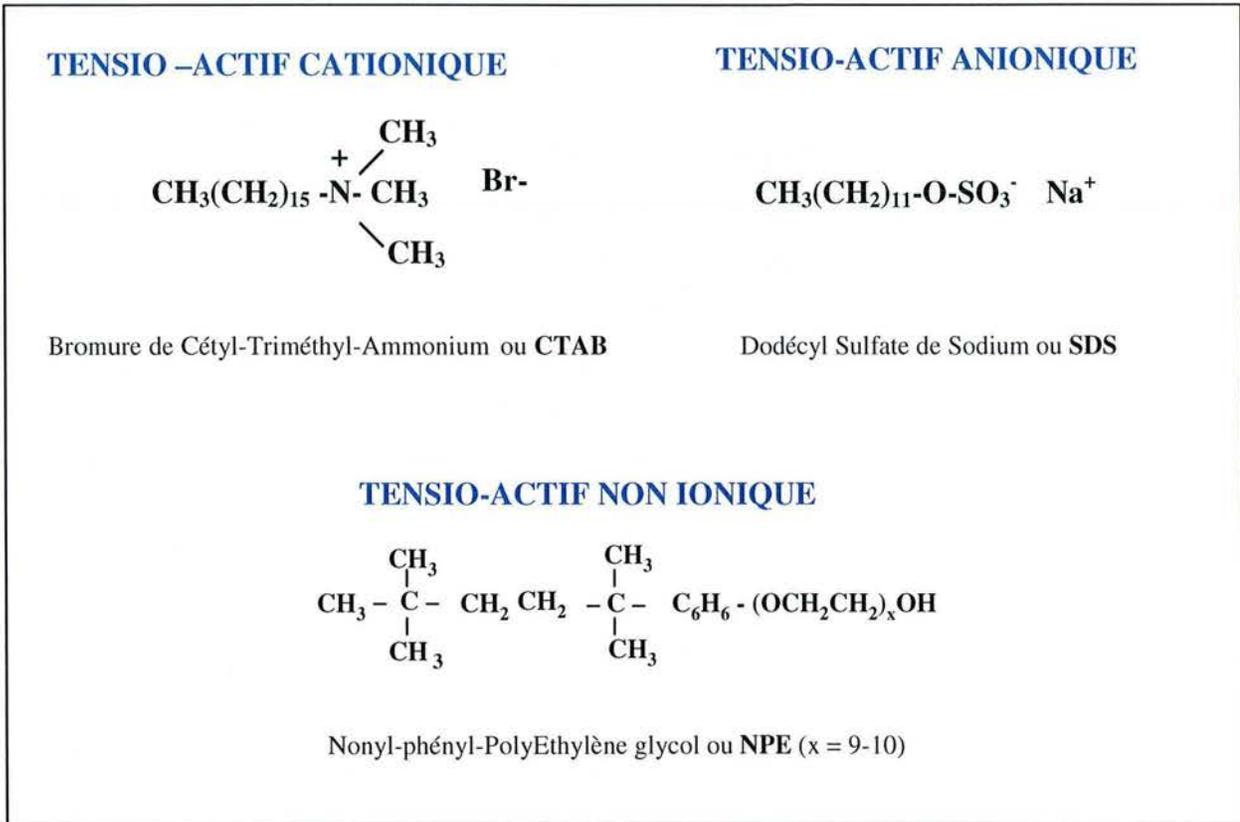


Figure II.2(8)
Les différentes classes de molécules tensio-actives de l'étude.

De nombreuses substances organiques comme les savons, les détergents, les acides gras, possèdent à la fois des caractères hydrophobe et hydrophile : ce sont des substances amphiphiles. L'absorption des composés hydrophobes par les substances en suspension, les sédiments, la biomasse ou les sols est fonction du caractère lipophile de ces substances et du contenu en carbone organique des matières solides absorbantes. Le caractère lipophile d'une substance peut être évalué à partir du coefficient de partition octanol/eau K_{ow} (Tableau II.2(4)). Ce caractère lipophile est également important pour prédire la bioaccumulation dans la chaîne alimentaire.

Tableau II.2(4)

Principales constantes physico-chimiques des 3 classes de tensio-actifs considérées.

Composé	Solubilité à 25°C en mg/L	Cte de Henry à 25°C atm.m ³ /mole	Coef de partage octanol/eau K _{ow}	Partage sol/eau Log K _{se}	Partage eau/air Log K _{ea}	Partage sol/air Log K _{sa}
SDS	100		5 200	2,1		
NPE	5		13 000	2,5		
CTAB	400 000	0,00032	1,5	-1,4	1,9	0,5

Si les composés tensio-actifs ont réglementairement des effets toxiques limités et une bonne biodégradabilité, les composés secondaires formés après évolution biologique peuvent être toxiques et moins biodégradables.

a) *Le SDS*

Biodégradabilité et toxicité

Le SDS est assez biodégradable et ne persiste pratiquement pas au travers du traitement biologique des eaux usées. Par contre, on le retrouve dans les boues (environ 25%) par l'intermédiaire de boues de décantation primaire au niveau de boues épandues en agriculture. D'ailleurs, des composés plus toxiques, dérivés biologiques des tensio-actifs peuvent apparaître dans les boues suite au traitement biologique et au cours de l'évolution biologique des boues elles-mêmes. Leur dégradation dans les sols est néanmoins moins rapide que dans une station d'épuration biologique. Ces propriétés physico-chimiques restent valables pour les autres détergents.

La toxicité du SDS est faible (concentration létale 50% pour les poissons entre 1 et 10 mg/L).

Origine et pertinence d'utilisation dans le cadre de notre étude

Ce composé est largement utilisé au niveau domestique et industriel dans les préparations commerciales de lessives. Les sulfates d'alkyle (R-O-SO₃⁻, Na⁺), dont fait partie le dodécyl sulfate de sodium, sont essentiellement utilisés comme détergents (shampooings et savons) et bactéricides et employés en pharmacie^{25, 26}. Ainsi, le dodécyl sulfate de sodium (SDS), appelé aussi lauryl sulfate (LaS) est un représentant des substances tensio-actives utilisées comme détergents anioniques dans les lessives domestiques et dans les savons.

²⁵ <http://www.univ-tln.fr/~gfev/ChIndus/ORGAN INDUSTRIELLE.htm>

²⁶ <http://www.biam2.org/www/Sub3846.html>

Préparation des solutions

Des solutions de SDS²⁷ de 1, 5 et 10 g/L ont été utilisées pour les ajouts dosés²⁸.

La concentration micellaire critique (CMC) de ce tensio-actif est de 8.10^{-3} M soit 2,3 g/L (Adamson, 1990). Nous avons travaillé à concentration constante en acide humique (fixée à **10 mg/L** pour les acides synthétiques et le 2^{ème} extrait d'acide humique naturel (AHN2) et à **30 mg/L** pour le 1^{er} extrait (AHN1), concentrations imposées par les limites de détection du signal de fluorescence émis) et pH contrôlé (pH 8). Nous avons fait varier la concentration en SDS de 1/10 000 à 0,8 fois sa concentration micellaire critique en solution aqueuse (soit 250 µg/L à 2 g/L). D'une part, ces concentrations couvrent la gamme de teneurs en agents de surface définie par la norme de la CEE²⁹ de 200 µg/L et celle³⁰ déterminée dans les eaux brutes destinées à la production d'eau destinée à la consommation humaine égale à 500 µg/L d'autre part.

b) Le NPE

Biodégradabilité et toxicité

Par biodégradation, les alkylphénol-polyéthoxylés (groupe auquel appartient le NPE de notre étude) peuvent produire des alkyl- et des nonylphénols. Ces tensio-actifs neutres (alkylphénol-polyéthoxylés $R-\phi-(OCH_2CH_2)_n-OH$, ϕ pour le cycle benzénique) peuvent s'accumuler dans les algues, les poissons, atteignant des valeurs de 5,8 mg/kg (Ahel et al., 1993). Les composés phénoliques, comme le 4-nonylphénol, sont plus résistants à la biodégradation dans l'environnement. Leur intégration progressive dans la dynamique des matières organiques naturelles du sol en limitera l'impact potentiel. Rappelons enfin que l'action tensio-active de ces composés peut augmenter la solubilité d'autres micropolluants organiques et donc leur bio disponibilité vis-à-vis des organismes vivants du sol (Thiele et al., 1997).

La toxicité des alkylphénol-polyéthoxylés est reconnue ainsi que celle des nonylphénols obtenus par biodégradation. Les condensats d'oxydes d'éthylène ne sont plus utilisés dans les lessives à usage domestique en raison de la possibilité de formation de

²⁷ Réactif Roth Sochiel (Lauterbourg, France), pureté > 99%, fd électrophorese .

²⁸ **Remarque : Quelque soit le type de polluant considéré, la méthode d'ajouts dosés était strictement la même pour tous nos essais.**

²⁹ Directive européenne (n°75/440/CEE) du 16 juin 1975, transcrite en droit français par le décret n°89-3 du 3 janvier 1989 modifié pour les eaux douces utilisées pour la production d'eau destinée à la consommation humaine.

³⁰ Directive européenne (n°80/778/CEE) du 15 juillet 1980 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine.

produits de dégradation toxiques. Guenther et al., 2002, ont également montré la formation de nonyl- phénols à partir de nonyl-phénol éthoxylés lors de l'opération de traitement des eaux (essentiellement lors de la digestion anaérobie). Cependant, les données toxicologiques et écotoxicologiques restent incomplètes à ce jour en particulier pour les composés issus de leur évolution biologique. La toxicité des composés phénoliques dérivés des détergents est à rapprocher de celle des alkylphénols qui peuvent aussi se retrouver comme contaminants des caoutchoucs ou comme anti-oxydants et stabilisants des monomères de matières plastiques. Les effets connus de ces substances sur l'homme sont des effets aigus allergisants et des effets aigus sur la pigmentation de la peau. Ces mêmes études ont montré que les petits homologues des NPE, les métabolites carboxylés, les nonylphénols (NP) et les alkylphénols (AP), pouvaient provoquer des effets œstrogéniques sur les organismes aquatiques et chez les mammifères et les oiseaux, alors que les dérivés éthoxylés plus longs n'avaient pas ce type d'effets.

Origines et pertinence d'utilisation dans le cadre de notre étude

Les alkylphénol-polyéthoxylés sont des détergents très utilisés en industrie, agriculture et en usage privé (Isobe et al., 2001). Ils se composent de 2 principaux groupes : les nonylphénol-polyéthoxylés et les octylphénol-éthoxylés (respectivement à 80 et 20% en utilisation commerciale) (Rothman, 1982). Les condensats d'oxydes d'éthylène (ainsi que les esters de saccharose, les esters d'acides gras et les amphotères) sont utilisés pour l'assainissement (composant affecté : matières grasses) en industrie alimentaire.

Le nonyl phénol-éthoxylé (NPE) avec une moyenne de 9,5 motifs éthoxylés a été choisi comme représentant des agents de surface neutres. Il s'agit de la troisième et dernière catégorie de *système amphiphile* non chargé étudiée.

Les industries susceptibles d'être concernées sur le bassin mosellan sont :

- la manufacture France Pneumatique Michelin, Golbey (procédé de purification Détox)
- toutes les entreprises d'agrochimie du bassin mosellan, car ces molécules rentrent également dans la formulation des agents dispersant utilisés en agrochimie pour de nombreuses cultures du bassin mosellan.

Préparation des solutions

Les ajouts dosés en polluant réalisés pour l'étude du quenching de fluorescence ont été réalisés à partir d'une solution mère de NPE ³¹ de 1 g/L.

La CMC de ce polluant déterminée par Sigma Aldrich (Lyon, France) est de $6,3 \cdot 10^{-5}$ M soit 0,4 g/L. Nous avons mis en présence cet agent de surface et nos différentes fractions d'AH pour des concentrations de 1/10 000 à 0,8 fois la CMC du polluant (soit 0,004 mg/L à 0,03 g/L). Il n'existe pas de valeurs de normes CEE reportées dans la littérature pour ce type de tensio-actif dans les eaux naturelles. Cependant, dans des échantillons d'eau de rivière (Isobe et al., 2001 ; Long et al., 1998), des valeurs moyennes de 0,05 à 1 µg/L (eau brute) et de 0,5 à 13 µg/g de matière sèche (sédiments) ont été déterminées.

c) Le CTAB

Biodégradabilité et toxicité

Les amines aliphatiques, comme le CTAB, sont des intermédiaires chimiques de la synthèse des détergents cationiques que l'on peut retrouver dans leurs dérivés de biodégradation. Ces composés volatils essentiellement irritants sur l'homme peuvent avoir des effets toxiques au niveau hépatique, rénal ou cardiaque, mais ne sont pas cancérogènes.

Origines et pertinence d'utilisation dans le cadre de notre étude

Les sels d'ammonium quaternaires sont utilisés comme agents de trempage et de rinçage en industrie alimentaire et en industrie laitière et de la boisson. Actifs à tout pH, mais dépendant des résidus organiques et la dureté de l'eau ³², ils affectent les levures, les moisissures et les bactéries (Gram + et -) à 200 ppm. Ils sont également utilisés dans les applications domestiques privées, comme agents de nettoyage de surface au niveau industriel et institutionnels ³³ (hôpitaux).

Le tensio-actif cationique, bromure de cétyl ammonium (CTAB ³⁴), a été choisi comme représentant des sels d'ammonium quaternaire, détergents largement utilisés en industrie (notamment comme agent de surfacage dans de nombreux procédés industriels et comme agents de trempage et de rinçage en industrie alimentaire, laitière et de la boisson).

³¹ Réactif Sigma Aldrich Chimie (Lyon, France), 9-10 motifs éthoxylés.

³² Fiche technique 5 AMPAQ (Association des manufacturiers de produits alimentaires du Québec) : Nettoyage et Assainissement en Industrie Alimentaire.

³³ http://www.mst.dk/udgiv/publications/2001/87-7944-383-4/html/kap03_eng.htm.

³⁴ Réactif Sigma Aldrich Chimie (Lyon, France), pureté > 96%.

Cette famille de détergents peut notamment faciliter la dispersion et le transfert d'autres polluants comme les pesticides par leur pouvoir mouillant et rentre donc dans la formulation de nombreux produits agrochimiques.

Les industries susceptibles d'être concernées sur le bassin mosellan sont :

1) Boissons, laiteries :

- Brasseries Kronenbourg SA, Champigneulle (type épuration : biologique)
- Etablissement Vedial SA, Ludres (type épuration : biologique)

2) Autres industries alimentaires :

- Société industrielle de transformation des produits agricoles, Arches (id)
- Glaces Thiriet, Eloyes (id)

Préparation des solutions

Pour nos essais de quenching de fluorescence avec la matière organique, nous avons travaillé avec différentes solutions de CTAB de 0,5 à 5 g/L (solubilisation à chaud) en ajouts dosés.

La concentration micellaire critique de ce polluant est de $9 \cdot 10^{-4}$ M soit 0,3 g/L (Savelli et al., 1990). Nous avons travaillé par la même méthode que celle utilisée pour le SDS pour nos différentes fractions d'AH sur une gamme de concentration de 1/10 000 à 0,8 fois la CMC du CTAB (soit de 0,03 mg/L à 0,24 g/L).

II.2.4.3. L'atrazine et la sulcotrione, deux molécules d'herbicides appartenant respectivement au passé et au futur de l'agrochimie

Les pesticides présentent une très grande variété de composés utilisés en tant que biocides contre différents organismes cibles. On distingue les insecticides, les fongicides, les herbicides, les raticides, les bactéricides, les acaricides, les nématocides et les molluscides. On distingue les substances chlorées pesticides, qui peuvent être alicycliques ou aromatiques. Les plus utilisées et toxiques pour l'homme ont été les dichlorophényléthanes (DDE, DDD et DDT) cancérigènes. Les "drines", "danes" et "chlors" (aldrine, dieldrine, endrine, chlordane, heptachlor, heptachlor époxyde, methoxychlor) sont fortement toxiques et possèdent une structure alicyclique complexe. Les isomères de l'hexachlorocyclohexane (HCH) dont le lindane, sont toxiques et cancérigènes. Des dérivés chlorés de l'acide phénoxyacétique sont aussi toxiques et utilisés comme herbicides (2,4-D et 2,4,5-T). Parmi les autres substances

pesticides organiques, non chlorées, il y a des hydrocarbures aromatiques avec un groupement carbamine (-O-CO-NH-CH₃) comme les carbamates (carbaryl, carbofuran, propoxur) et les thiocarbamates (manèbe). On distingue également l'atrazine, du groupe des triazines, très toxique et mutagène. On trouve aussi d'autres composés toxiques souvent suspectés d'être cancérogènes, comme des organophosphorés soufrés insecticides (parathion, malathion, toxaphène), des substances aromatiques aminées (paraquat), des organométalliques. Dans cet ensemble très hétérogène, on voit apparaître aujourd'hui des composés de substitution avec une action biologique spécifique et qui vont remplacer progressivement les pesticides classiques pour en limiter l'impact sur l'homme et les organismes vivants non ciblés.

Nous avons choisi de porter notre étude sur l'atrazine, utilisée traditionnellement pour les cultures de maïs, retirée du marché en 2002. Puis nous avons étudié l'interaction de la matière organique avec la sulcotrione, nouvelle molécule utilisée prochainement en remplacement de l'atrazine (Figure II.2(9)).

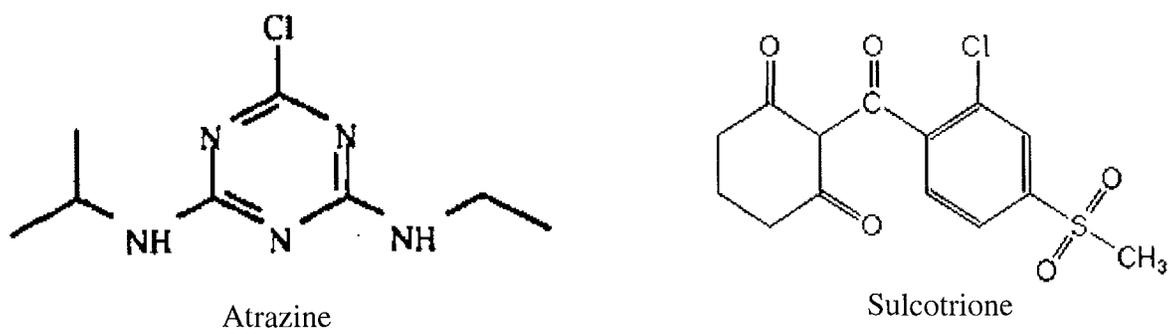


Figure II.2(9)
Structure chimique des 2 molécules d'herbicides de notre étude.

a) Propriétés physico-chimiques, biodégradabilité et toxicité

L'atrazine et la sulcotrione sont des molécules ayant globalement une faible solubilité dans l'eau (150 et 160 mg/L à 25°C). Elles sont par exemple moins solubles qu'un herbicide courant comme le 2,4-D (620 mg/L), mais plus solubles que les urées substituées (chlorouxon, etc.), autre famille de molécules également utilisées comme herbicide.

La biodégradabilité et la toxicité des herbicides, et en particulier de la sulcotrione, sont relativement peu étudiées. Seul Cherrier, 2003, a montré que la dégradation de la sulcotrione,

en conditions contrôlées ou naturelles, était assez rapide (30% de minéralisation au bout de 60 jours). Les limites de concentrations des produits phytosanitaires fixées par les directives européennes reflètent en général des limites de détection, et ne se réfèrent pas aux effets toxicologiques des composés.

b) Origine et pertinence d'utilisation dans le cadre de notre étude

Si l'atrazine a largement été utilisée dans les cultures de maïs en Lorraine jusqu'à son interdiction, il n'en demeure pas moins que les composés dérivés issus de sa décomposition biologique, chimique ou physique ont des temps de demi-vie de plusieurs années (Schiavon, 1980). Ce polluant et de manière plus générale l'ensemble des *s*-triazines présente donc une préoccupation dans leur devenir dans l'environnement.

La sulcotrione¹², homologuée en France depuis 1993, a un objectif de remplacement de cette ancienne molécule d'atrazine. Cette molécules présente en effet une efficacité agronomique remarquable (Rouchaud et al., 1996 et 1998), même dans des contextes climatiques difficiles comme la Lorraine. De ce fait, cet herbicide est préconisé lors des programmes de désherbage, seul ou associé à d'autres molécules. Mais les travaux portant sur son devenir dans l'environnement après application sont peu nombreux.

c) Préparation des solutions

Nous avons travaillé pour les 2 polluants sur des gammes de concentrations respectant les normes en vigueur de la CEE pour l'atrazine : sa teneur dans les eaux de consommation était de 0,1 µg/L. Les campagnes de prélèvements de l'Agence de l'Eau réalisées sur la Moselle entre 1997 et 1999 ont permis de doser des teneurs en atrazine³⁵ de 0,02 à 0,1 µg/L dans des prélèvements d'eau brute et de 0,5 à 3 µg/L dans la phase aqueuse de l'eau (après extraction par solvant). Pour la sulcotrione¹², nous avons donc respecté cette gamme de teneurs et travaillé pour des concentrations de 0,01 à 10 µg/L en sulcotrione. Des solutions de 0,1 et 1 mg/L ont été préparées pour réaliser la gamme d'ajouts dosés en polluants lors des études d'inhibition de fluorescence de la matière organique.

³⁵ Réactifs étalons standards Cil-Cluzeau (Sainte Foy La Grande, France).

Plusieurs modèles ont été proposés pour décrire la structure des acides humiques en solution (cf. Chapitre I partie I.2.2).

Les travaux de Kazpard, 2001, avaient montré, par spectroscopie de fluorescence du pyrène, que certaines parties des macromolécules d'acide humique catéchol/glycine semblaient se réarranger au cours de l'agrégation provoquée par les sels d' Al_{13} utilisés lors d'un traitement par coagulation. A des faibles teneurs en aluminium, des pseudo-micelles intra ou intermoléculaires semblaient se former alors qu'à des concentrations plus élevées, la structure initiale désordonnée des acides humiques semblait restaurée.

Ces études s'étaient notamment appuyées sur les travaux de Ganaye et al., 1997, qui avaient étudié la sorption du pyrène sur différentes suspensions de sols (montmorillonite) et comparé les résultats avec ceux obtenus par des mesures de polarité en spectrofluorimétrie. L'utilité de la technique avait notamment été démontrée par la bonne corrélation des résultats obtenus par spectrofluorimétrie avec les coefficients de partage et solubilité de ce micropolluant (K_{oc} et K_{ow} respectivement).

En outre, Engebreston et von Wandruska, 1994, ont étudié l'influence des ions en solution sur la conformation des substances humiques. En utilisant le pyrène comme molécule sonde des micro-environnements hydrophobes, ils ont montré la reconformation des macromolécules humiques en présence de cations (Mg^{2+}). Le mécanisme décrit rejoignait celui proposé par Kazpard, 2001, dans lequel les pseudo-micelles humiques intramoléculaires précédaient la formation des interactions inter moléculaires induites par de plus fortes concentrations en sels métalliques ajoutés.

Il nous semblait donc essentiel de confirmer les résultats obtenus avec la sonde pyrène par l'utilisation d'autres molécules sensibles aux micro-domaines hydrophobes susceptibles de se former en solution pour des concentrations variables en acide humique (études de polarité et de viscosité des micro-domaines).

L'objectif du Chapitre III est donc d'étudier la structuration des macromolécules en solution aqueuse afin de mieux appréhender les interactions avec les micro-polluants présentées dans le Chapitre IV.

Différentes sondes de polarité et de viscosité ont été utilisées à cet effet : le pyrène (faisant l'objet de l'ARTICLE II), les rotors de type « cinnamylidène » et « coumarine » (respectivement fonctionnalisés 2-CN et -CNCOOEt) déjà étudiés au Département de Chimie Physique des Réactions (DCPR) de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie des Industries Chimiques (ENSIC) par Adibnejad, 1996, la sonde D 7760 commercialisée par la société

Molecular Probes Europe (Leiden, The Netherlands) pour sa chaîne latérale aliphatique positivement chargée (ammonium) de structure apparentée aux tensio-actifs cationiques susceptibles d'être des micro-polluants du milieu naturel aquatique (voir notre étude avec le CTAB au Chapitre IV) et enfin une nouvelle sonde rotor de type « coumarine » CouC12 possédant une chaîne aliphatique hydrocarbonée (chaîne dodécyl) non chargée correspondant à celle du tensio-actif SDS synthétisée pour notre travail.

Seules des études sur la fraction synthétique d'acide humique catéchol/glycine AHCG ont été réalisées à pH = 8 contrôlé.

Chapitre III

Comportement des substances humiques
en solution aqueuse

Le pyrène apparaît comme une excellente sonde de polarité pour étudier les molécules d'acide humique (Kalyanasudaram et Thomas, 1976 ; Kazpard, 2003).

L'ensemble des résultats de l'étude avec la sonde pyrène est présenté dans l'ARTICLE II figurant à la fin de ce chapitre.

Nous présentons dans ce qui suit l'ensemble des méthodes et résultats associés à notre étude du comportement des substances humiques en solution grâce aux différentes sondes de fluorescence.

III.1. Utilisation des sondes de polarité et de viscosité pour l'étude de systèmes macromoléculaires organisés

En incorporant une sonde sensible aux modifications de son environnement (polarité, viscosité...) au sein de systèmes susceptibles de donner lieu à des microdomaines hydrophobes en solution aqueuse, il est possible de mettre en évidence l'existence de tels microdomaines.

Les sondes de fluorescence nous donnent des renseignements sur le comportement de molécules en milieu aqueux, et plus particulièrement sur leur :

- aptitude à former des microdomaines hydrophobes
- capacité à incorporer des substances hydrophobes au sein des microdomaines
- propriétés tensioactives.

Parmi les sondes utilisées en fluorescence et plus particulièrement au Département de Chimie-Physique des Réactions (DCPR), nous pouvons citer le pyrène et le rotor moléculaire (Figure III.1(13)).

III.1.1. Descriptions physico-chimique et photophysique des sondes

III.1.1.1. Le pyrène

Le pyrène, appartenant à la famille des HAP, présente les caractéristiques adéquates pour l'étude des systèmes amphiphiles :

- une faible solubilité dans l'eau ($4 \text{ à } 6 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$),
- une longue durée de vie de fluorescence (jusqu'à 400 ns),
- une sensibilité à un microenvironnement apolaire.

Le spectre de fluorescence typique du pyrène (sous forme monomère) présente 5 raies situées entre 370 nm et 400 nm (Figure III.1(1)). De plus, le pyrène est capable de former un excimère, et le spectre de fluorescence de ce dernier est non structuré, son maximum se situant aux alentours de 480 nm. Les études réalisées avec les excimères du pyrène sont susceptibles de donner des informations sur la fluidité (ou encore la cohésion, l'ordre ou la viscosité selon les auteurs) du milieu environnant la sonde.

Des études préalables ont montré que le rapport I_1/I_3 des intensités de la première bande I_1 et de la troisième bande I_3 est caractéristique des changements de polarité du milieu environnant la sonde. Dans le cas de la formation de microdomaines hydrophobes, l'étude des variations de I_1/I_3 en fonction de $\log(C)$ pour le pyrène met en évidence une diminution de I_1/I_3 allant, à partir d'une concentration égale à la concentration minimale d'agrégation, de sa valeur dans l'eau vers une valeur « plateau » qui caractérise la polarité du microenvironnement.

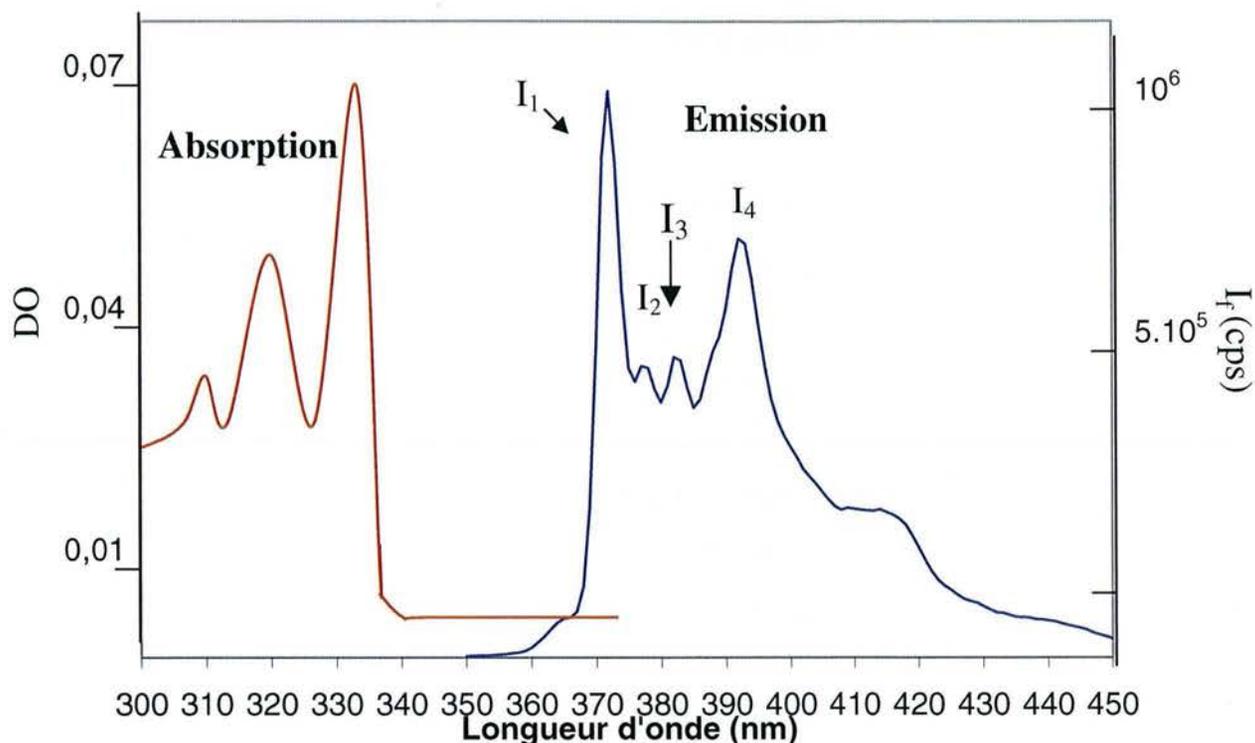


Figure III.1(1)
 Spectre d'absorption et d'émission de fluorescence du pyrène
 (10^{-6} M dans l'eau, excitation à 332 nm).

III.1.1.2. Les rotors moléculaires

Les rotors moléculaires sont des sondes de fluorescence pour lesquelles les transitions non radiatives sont dues principalement aux mouvements rotatoires internes de ces molécules. La fluorescence est fortement influencée par l'environnement. Dans un système susceptible de donner des microdomaines hydrophobes, les rotors sont donc à la fois des sondes de polarité et de viscosité.

Le rendement quantique de fluorescence ϕ_f , défini comme le rapport entre le nombre de photons émis par fluorescence par unité de temps au nombre de photons absorbés pendant le même temps, peut être calculé comme suit par rapport au rendement quantique de fluorescence initial ϕ_0 dans le milieu ne contenant pas de sonde :

$$\frac{\phi_f}{\phi_0} = \frac{\text{aire} * DO_0 * n^2}{\text{aire}_0 * DO * n_0^2} \quad (\text{équation [III.1(1)])}$$

avec aire_0 = aire sous la courbe d'émission sans la sonde

aire = aire sous la courbe d'émission avec la sonde

DO_0 = densité optique à la longueur d'onde d'excitation sans la sonde

DO = densité optique à la longueur d'onde d'excitation avec la sonde

n = indice de réfraction¹

- si la viscosité augmente, les mouvements de la molécule sont bloqués, donc il y a une diminution des processus non radiatifs et le rendement quantique de fluorescence ϕ_f/ϕ_0 augmente,
- si la température augmente, la viscosité diminue et le rendement quantique de fluorescence diminue,
- si la polarité augmente, l'état Triplet de Croisement Intersystème appelé T_1 à la Figure I.1(2) (*Triplet Inter Crossing System TICT*, Figure III.1(2)) est favorisé ce qui diminue le rendement quantique de fluorescence.

Dans le cas de la formation de micro domaines hydrophobes, l'étude des variations de ϕ_{fmax} en fonction de $\log(C)$ met en évidence une diminution de ϕ_{fmax} allant, à partir d'une concentration égale à la C_m , de sa valeur dans l'eau vers une valeur plateau final qui caractérise la cohésion du micro environnement.

L'étude de ϕ_f/ϕ_0 en fonction de $\log(C)$ nous donnera une valeur de plateau final caractéristique de la viscosité locale du micro domaine hydrophobe.

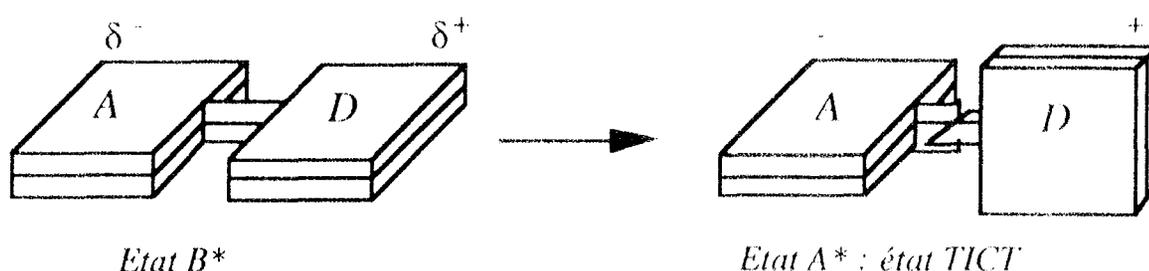


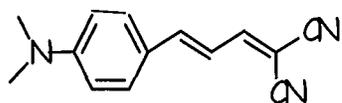
Figure III.1(2)

Schématisme de la torsion d'un rotor moléculaire dans l'espace.

La fluorescence est fortement influencée par l'environnement. Comme on peut le voir sur la figure, la différence d'énergie entre l'état excité S_1 et l'état fondamental S_0 n'est pas la même que l'on se trouve dans une conformation plane ou dans une conformation à géométrie perpendiculaire.

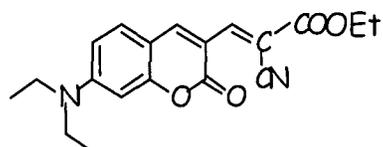
¹ La phase majoritaire de nos solutions étant la phase aqueuse, on a considéré pour toute notre étude $n = n_0 = 1$.

Plusieurs sondes de polarité et/ou viscosité (rotors) commerciales ou synthétisées à l'ENSIC ont été choisies dans notre étude du comportement des substances humiques en solution : le rotor 2-CN, le rotor coumarine -CNCOOEt, la D 7760 et le rotor coumarine CouC12 (Figure III.1(3)).

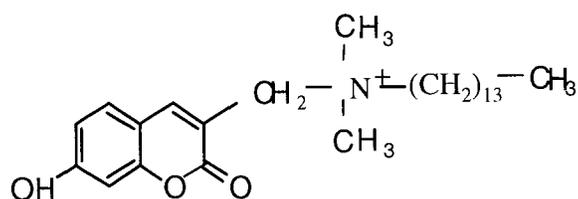


Rotor 2-CN ou

4-(N,N-diméthylamino cinnamylidène malonitrile)

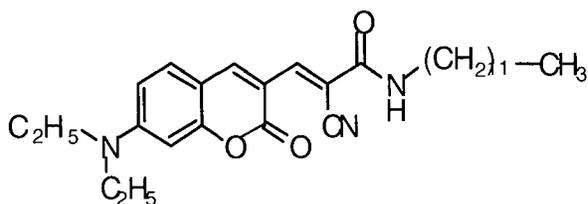


Rotor coumarine -CNCOOEt



D 7760 (Molecular Probe)

-coumarine avec extrémité tensio-active cationique (ammonium)



Rotor coumarine CouC12

avec extrémité aliphatique linéaire (synthèse ENSIC)

Figure III.1(3)
Formules chimiques des sondes de fluorescence utilisées.

Le Tableau III.1(1) récapitule les principales propriétés de ces sondes en milieu aqueux (au pH de l'eau ultra-pure).

Tableau III.1(1)
Principales propriétés des sondes de fluorescence utilisées.

Nom produit	Origine	$\lambda_{\text{abs max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{f max}}$ (nm)	ϕ_f
Rotor 2-CN	Adibnejab, 1996	497	580	0,004
Rotor coumarine - CNCOOEt	Adibnejab, 1996	525	570	0,007
D 7760	Molecular Probes (Leiden, The Netherlands)	380	490	0,009
Rotor CouC12	Synthétisée par Jung et Frochot en 2002	470	680	0,05

a) Rotor 2-CN

Les spectres d'absorption et d'émission de cette sonde en solution aqueuse sont données à la Figure III.1(4). L'étude complète de la réponse de la sonde suivant la polarité et la viscosité du milieu a été faite au DCPR par Adibnejad, 1996.

Le détail de la préparation des solutions est décrite en fin de chapitre.

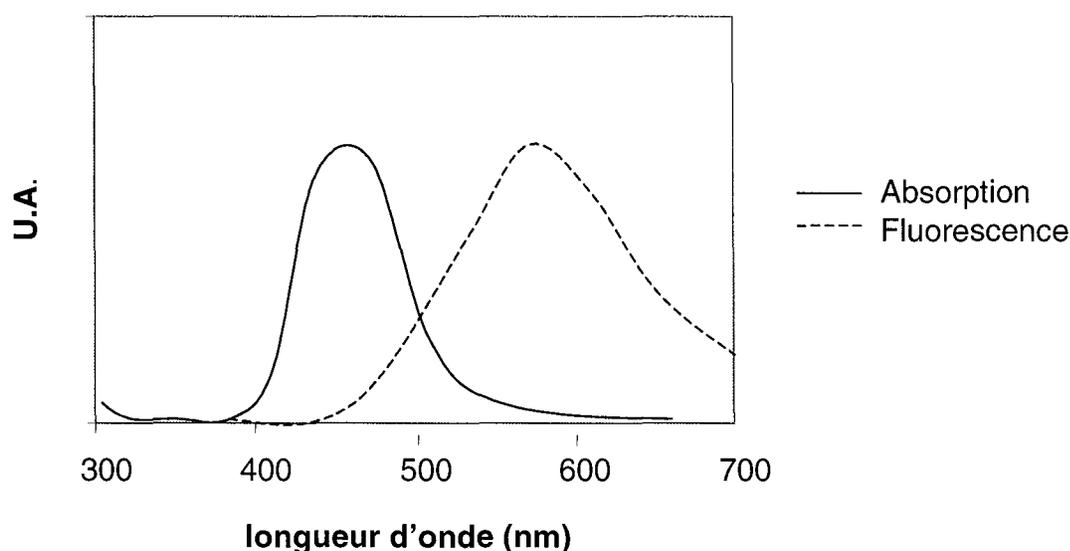


Figure III.1(4)

Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence en solution aqueuse de la sonde rotor2-CN (densité optique et intensité de fluorescence normalisées, excitation 480 nm).

Les tracés des courbes représentant l'évolution de la polarité (suivie par le déplacement de la longueur d'onde maximale d'émission) et de la micro-viscosité (rendement quantique de fluorescence) présentent des variations très aléatoires et ne correspondent pas aux courbes obtenues pour d'autres milieux micellaires étudiés au DCPR. En réalisant cette

étude, nous nous sommes aperçus d'un certain nombre de problèmes spécifiques au comportement photochimique des substances humiques en solution aqueuse. Des problèmes d'absorption parasites (filtres) importants et difficilement corrigibles² ont notamment été mis en évidence. Des essais réalisés avec des concentrations en rotor plus élevées dans le milieu ne sont guère plus satisfaisants .

b) Rotor coumarine CNCOOEt

Les spectres d'absorption et d'émission de cette sonde en solution aqueuse sont données à la Figure III.1(5). Toute l'étude détaillée en fluorescence de cette sonde figure dans Adibnejad, 1996. Le détail de la préparation des solutions est décrite en fin de chapitre.

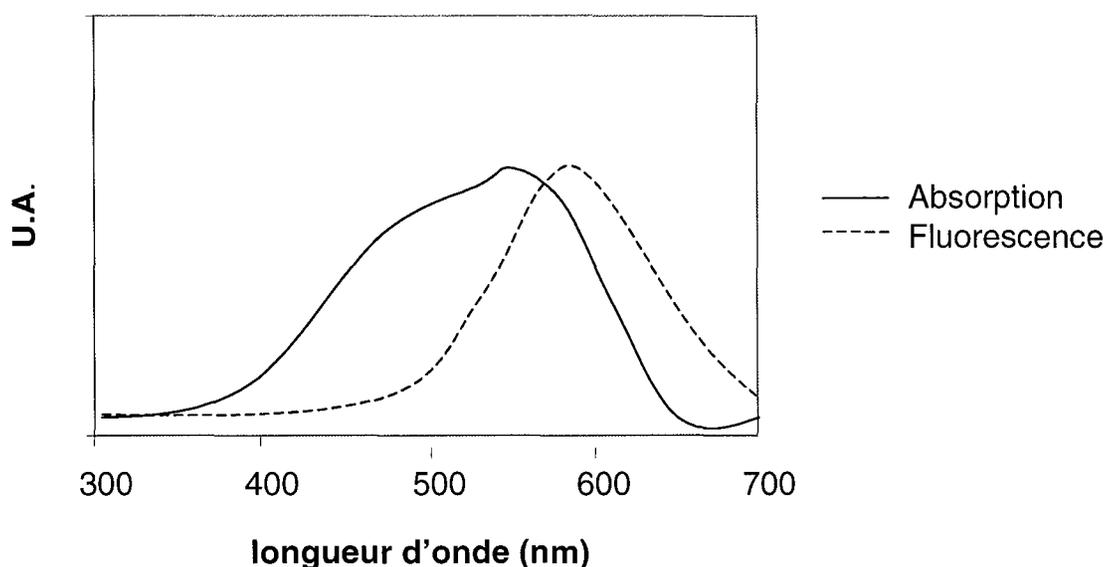


Figure III.1(5)

Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence en solution aqueuse de la sonde rotor 2-CN (densité optique et intensité de fluorescence normalisées, excitation 525 nm).

Aucune variation cohérente en terme de polarité et viscosité n'a pu être dégagée de l'étude avec cette sonde.

² Par rapport aux corrections utilisées avec le pyrène. Les sondes autres que ce HAP présentent en effet un signal de fluorescence non comparable. Par rapport au pyrène, le rapport signal/bruit de fond est nettement plus faible : le rapport entre la fluorescence du rotor et celle des solutions d'acide humique n'est plus que d'un facteur 4 environ, alors qu'elle était de plus de 10 dans le cas de l'étude avec une concentration de 10^{-6} M de pyrène dans le milieu. Si nous essayons de corriger les effets de filtres internes par la correction habituelle proposée par Auger et al., 1995, (voir II.1.1.5.2.), d'une part nous obtenons des résultats tout aussi aléatoires concernant le rendement quantique, et nous n'obtenons plus de variations significatives dans la détection du maximum d'émission de fluorescence.

c) Sonde D 7760

Cette sonde est vendue en tant que sonde de pH et de polarité par la société Molecular Probes Europe (Leiden, The Netherlands). Nous avons donc dans un premier temps testé l'influence du pH sur ses propriétés intrinsèques d'absorption et de fluorescence étant donné que pour la suite de notre étude en présence d'acide humique, nous avons travaillé à pH 8 contrôlé.

La sonde D 7760 présente 2 formes distinctes de solution (Figure III.1(6)): aux pH acides (inférieurs à 6), un premier chromophore présente un maximum d'absorption à 320 nm. Aux pH neutres et basiques (supérieurs à 6), le maximum d'absorption se déplace à 380 nm en longueur d'onde. Les mesures de fluorescence montre une inhibition du signal de fluorescence avec l'augmentation du pH du milieu. Nous pensons que le proton de la fonction -OH du groupement coumarine, susceptible d'être arraché à la molécule aux pH les basiques du milieu, peut engendrer un blocage des phénomènes de résonance électroniques (par perte de ce groupement électrodonneur), et donc engendrer une inhibition de la fluorescence de la sonde. Il nous a fallu également comprendre le comportement de cette sonde en fonction de la polarité du milieu en solution, avant de pouvoir l'utiliser avec les solutions aqueuses contenant les acides humiques. Dans un premier temps, nous avons mesuré l'absorption et l'émission de fluorescence de la sonde dans des mélanges eau/dioxane (Figure III.1(7)). Les chromophores ne changent pas en nature, puisque aucun déplacement en longueur d'onde n'est enregistré en absorption (exception faite du milieu aqueux). Nous avons constaté le déplacement du maximum d'émission de fluorescence vers les plus courtes longueurs d'onde quand le milieu devenait de moins en moins polaire (*i.e.* augmentation du pourcentage de dioxane dans le milieu). Le comportement de la sonde dans l'eau est très atypique dans ce cas également

Si l'on retranche la fluorescence des substances humiques à celles des solutions en présence de sonde D 7760, aucune variation de polarité n'est enregistrée. Ce résultat est cependant issu d'une correction mathématique et en présente toutes les limites. Des mesures effectuées à une concentration dix fois supérieure en sonde (10^{-5} M) n'améliorent pas le signal de fluorescence. Il est donc délicat de conclure en l'absence d'une éventuelle d'association entre la sonde D 7760 et les substances humiques.

Influence du pH

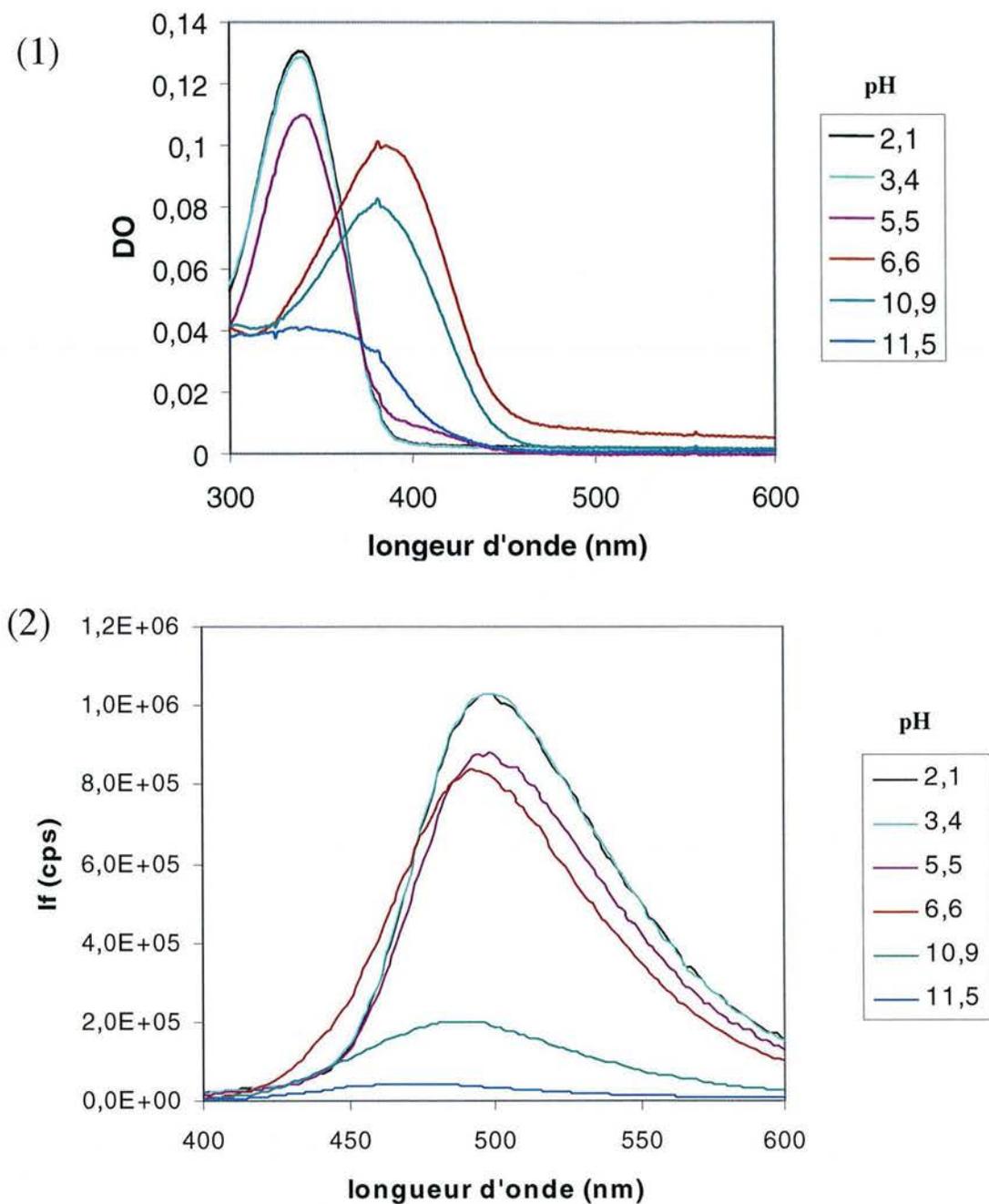
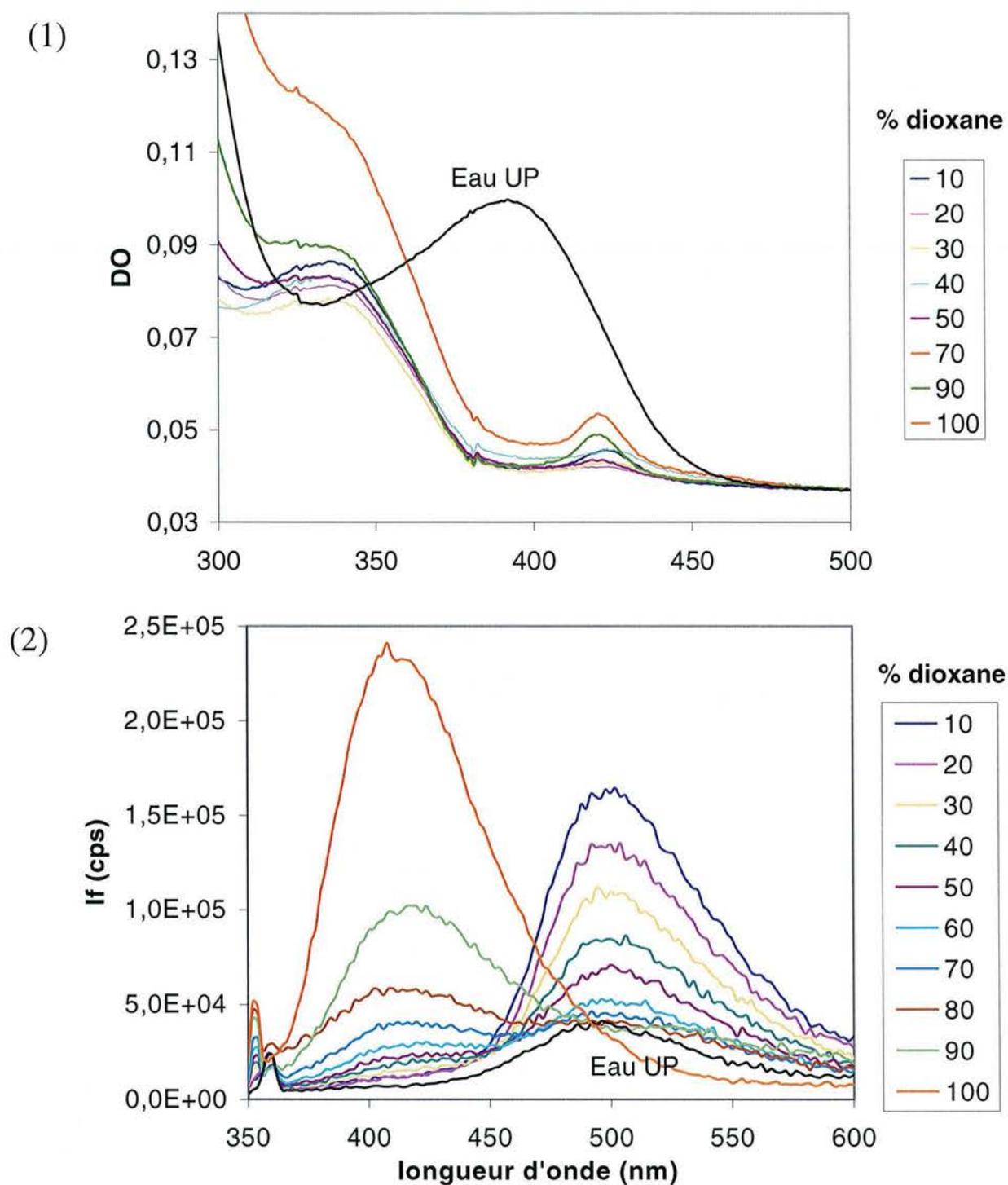


Figure III.1(6)

- (1) Influence du pH sur le spectre d'absorption de la sonde D 7760 ($10^{-5}M$)
 (2) Influence du pH sur le spectre d'émission de fluorescence de la sonde D 7760 ($10^{-5}M$, $\lambda_{ex} = 320$ ou 380 nm suivant le maximum correspondant au pH de mesure).

Influence de la polarité du milieu : mélanges eau/dioxane



Influence de la polarité du milieu : autres solvants

Puis, nous avons utilisé d'autres solvants organiques de polarité différentes, protiques et aprotiques (Figure III.1(8)). Pour comprendre le comportement de la sonde D 7760 par rapport à la polarité du milieu, nous avons utilisé l'échelle de polarité de Reichardt, 1988, définie à partir du déplacement hypsochrome (traduisant l'effet de solvant sur la bande d'absorption de la sonde moléculaire) de la bande électronique de transfert de charge de 2 bêtaïnes A et B. Ainsi, le paramètre de polarité est simplement l'énergie de transition électronique présentée par la bêtaïne en solution :

$$ET(30) = \frac{hcNa}{\lambda} = \frac{28590}{\lambda} \text{ (kcal/mol)} \quad \text{équation [III.1(2)]}$$

avec λ la longueur d'onde en nm correspondant à la transition prise au maximum de la bande d'absorption correspondante.

Il a été démontré que cette énergie est directement proportionnelle à l'énergie de solvation du colorant à l'état fondamental. Nous avons donc mesuré les variations de longueur d'onde du maximum d'émission de fluorescence de la sonde pour deux familles de solvants (protiques et aprotiques), de polarité variable (Figure III.1(8)).

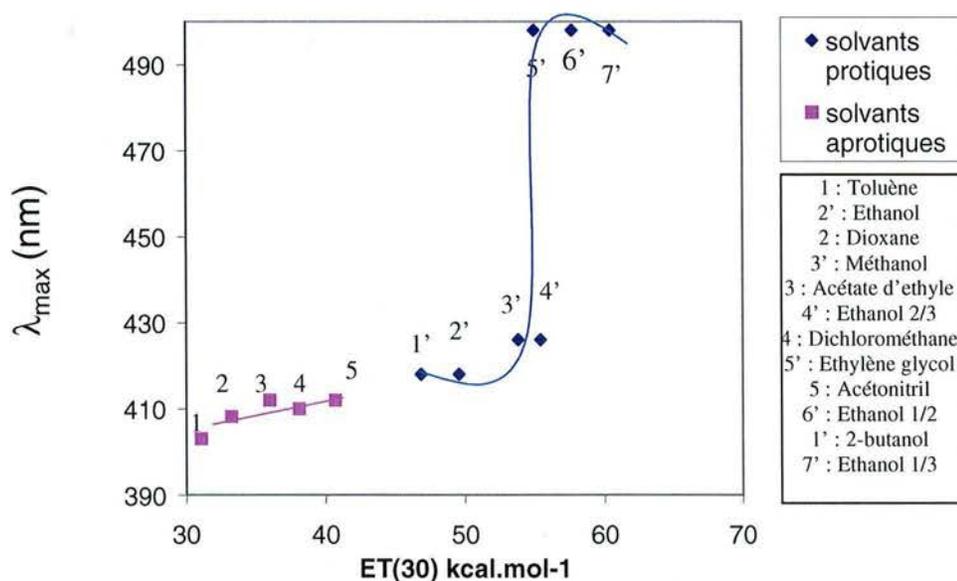


Figure III.1(8)

Influence de la polarité du solvant sur l'émission de fluorescence de la sonde D 7760.

d) Rotor CouC12

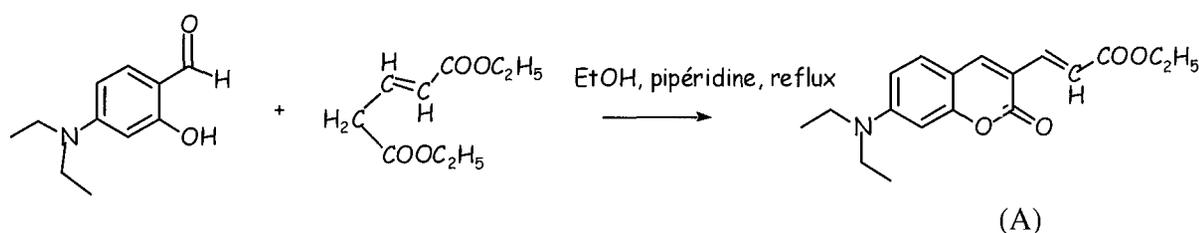
Le rotor moléculaire rotor CouC12 a été choisi pour deux raisons principales:

- Le domaine de longueur d'onde d'excitation de la sonde est tel que l'intensité de fluorescence de notre modèle est négligeable.
- Une extrémité alkyl, identique à celle du SDS, a été greffée lors de la synthèse de cette sonde pour étudier l'éventuelle interaction de cette chaîne hydrocarbonée avec les micro-domaines hydrophobes des acides humiques (Figure III.1(3)).

La synthèse de cette sonde a été effectuée à l'ENSIC et comporte 4 étapes :

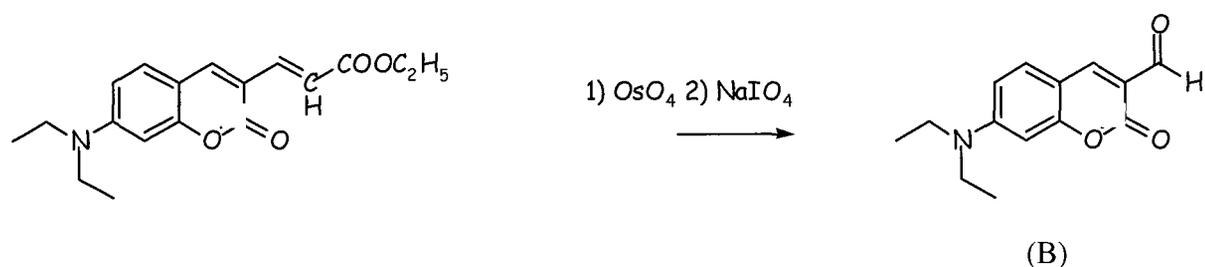
1) Synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino) coumarine-3-acrylate d'éthyle (A)

Cette synthèse fait intervenir le 4-diéthylamino-2-hydroxybenzaldéhyde et le glutaconate de diéthyle dans une condensation de Knoevenagel, en milieu basique. A une solution de 4-diéthylamino-2-hydroxybenzaldéhyde (12 mmol, 2,3 g) et de glutaconate de diéthyle (12,6 mmol, 2,34 g) dans 30 ml d'éthanol, on ajoute environ 30 gouttes de pipéridine. Le mélange est porté à reflux pendant 6 heures puis refroidi à température ambiante. Les cristaux oranges obtenus sont filtrés et lavés avec du pentane, puis recristallisés dans un mélange acétate d'éthyle/cyclohexane (M = 315 g/mol, rendement = 72,2 %).



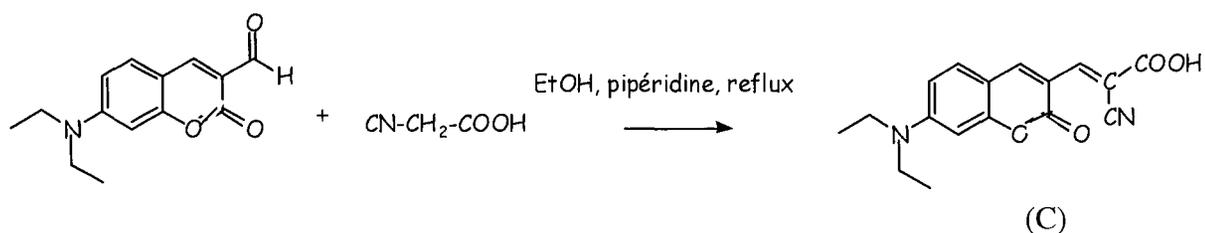
2) Synthèse de l'aldéhyde correspondant (B)

La double liaison de (A) est ensuite soumise à une cis-dihydroxylation par le tétraoxide d'osmium. Une réaction de Malaprade (oxydation du diol par NaIO_4) conduit à la formation de l'aldéhyde désiré. A une solution de 3,17 mmol de (A) (1g) dans 12 mL de THF et 3 mL d'eau, on ajoute 5 mL d'une solution de OsO_4 à 2,5% dans le t-butanol. Le mélange est agité pendant 1 heure à température ambiante puis on ajoute 6,97 mmol (1,5 g) de NaIO_4 en poudre sur une durée de 30 minutes. Le mélange réactionnel est agité pendant 2 jours. Le solvant est évaporé et la phase aqueuse extraite au CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée avec NaCl saturée puis séchée sur MgSO_4 . On obtient un solide de couleur orange, $M = 245$ g/mol, rendement = 46%.



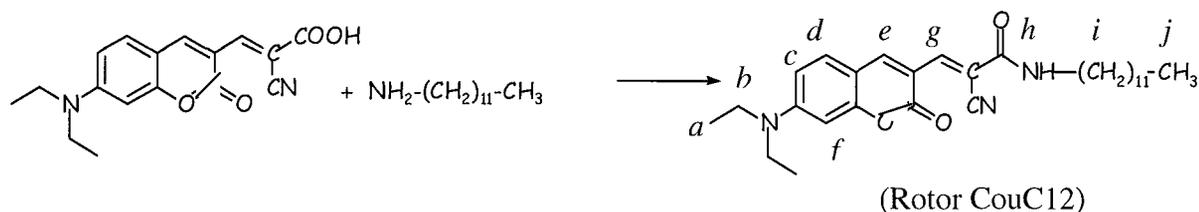
3) Synthèse de l'acide correspondant (C)

Un mélange constitué de 2 mmol de (B) (0,5 g) et de 4 mmol (0,4 g) d'acide cyanoacétique dans 7 mL d'éthanol est traité avec 40 mL de pipéridine. Le mélange est porté à reflux pendant 1 heure, concentré à l'évaporateur rotatif et purifié sur colonne de silice (éluant CH_2Cl_2 pour éliminer le produit de départ puis $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 80/20). On obtient un produit solide de couleur rouge $M = 312$ g/mol, rendement = 80 %.



4) Synthèse de la coumarine amphiphile rotor CouC12

L'agent de couplage (permettant d'activer la réaction) utilisé est un mélange DCCI (1,3-dicyclohexylcarboimide $C_{13}H_{22}N_2$) et de BtOH (1-hydroxybenzotriazole hydrate $C_6H_5N_3O$). L'acide C (0,5 mol, 0,16 g) est dissous dans 8,5 mL de CH_2Cl_2 . A cette solution maintenue à $0^\circ C$, sous atmosphère d'azote et sous agitation, on ajoute successivement le BtOH (1,2 équivalent, 0,6 mmol, 0,081g) en solution dans 0,9 mL de DMF, la DCCI (1 équivalent, 0,103g) dissoute dans 3 mL de CH_2Cl_2 . Après retour à température ambiante et agitation du milieu réactionnel pendant 30 min, l'amine solubilisée dans 3 mL de CH_2Cl_2 est ajoutée goutte à goutte (1,1 équivalent). On laisse le tout sous agitation pendant 2 jours. Le mélange est ensuite filtré, lavé avec CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée successivement avec une solution saturée de $NaHCO_3$ et séchée sur du sulfate de magnésium. Après filtration, le solvant est évaporé sous vide et le résidu chromatographié sur gel de silice ($AcOEt/CH_2Cl_2$, 25/75).



Le point de fusion de cette sonde est de $110^\circ C$.

Les résultats de RMN 1H ($CDCl_3$, 200 MHz) sont les suivants :

- 1,26 (3H, q, $-H_a$), $J = 2,5$ Hz
- 1,73 (3H, q, $-H_j$), $J = 2,5$ Hz
- 3,48 (2H, q, $-H_b$), $J = 2,5$ Hz
- 4,29 (22H, q, $-H_i$), $J = 2,5$ Hz
- 6,52 (1H, dd, $-H_f$), $J = 2,5$ Hz et 9 Hz
- 6,63 (1H, dd, $-H_c$), $J = 5$ Hz et 9 Hz
- 6,71 (1H, d, $-H_h$), $J = 2,5$ Hz
- 7,31 (1H, d, $-H_d$), $J = 2,5$ Hz
- 7,36 (1H, d, $-H_g$), $J = 2,5$ Hz
- 7,75 (1H, s, $-H_e$)

Les propriétés d'absorption (Figure III.1(9)), de fluorescence du rotor CouC12 (émission de fluorescence dans l'eau Figure III.1(9), et fonction de la polarité du solvant Figure III.1(10)) ont ensuite été étudiées.

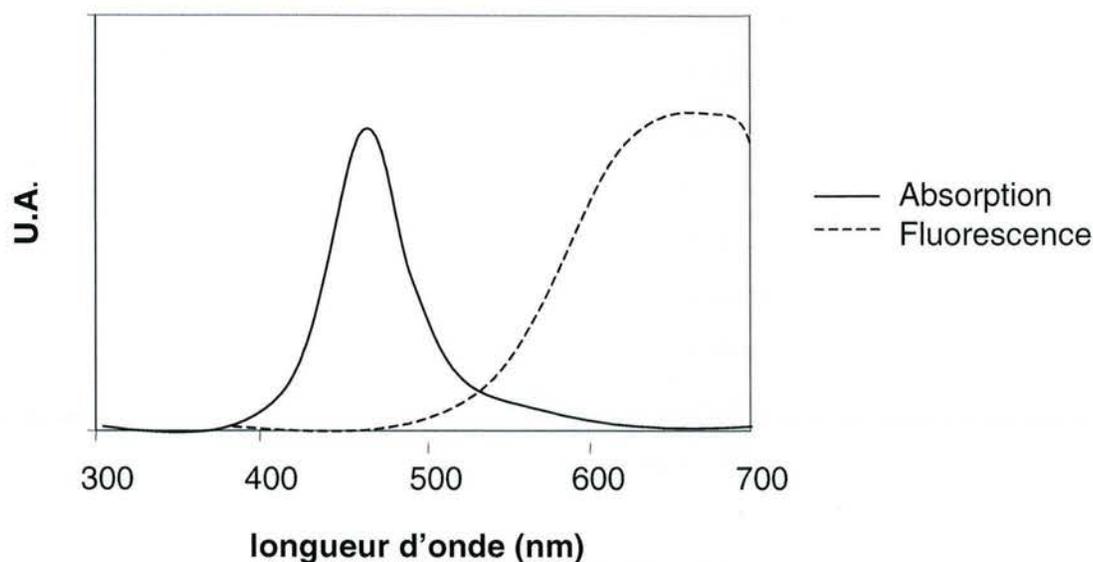


Figure III.1(9)

Spectres d'absorption et de fluorescence (densité optique et intensité de fluorescence normalisées, excitation 465nm) de la sonde coumarine CouC12 dans l'eau.

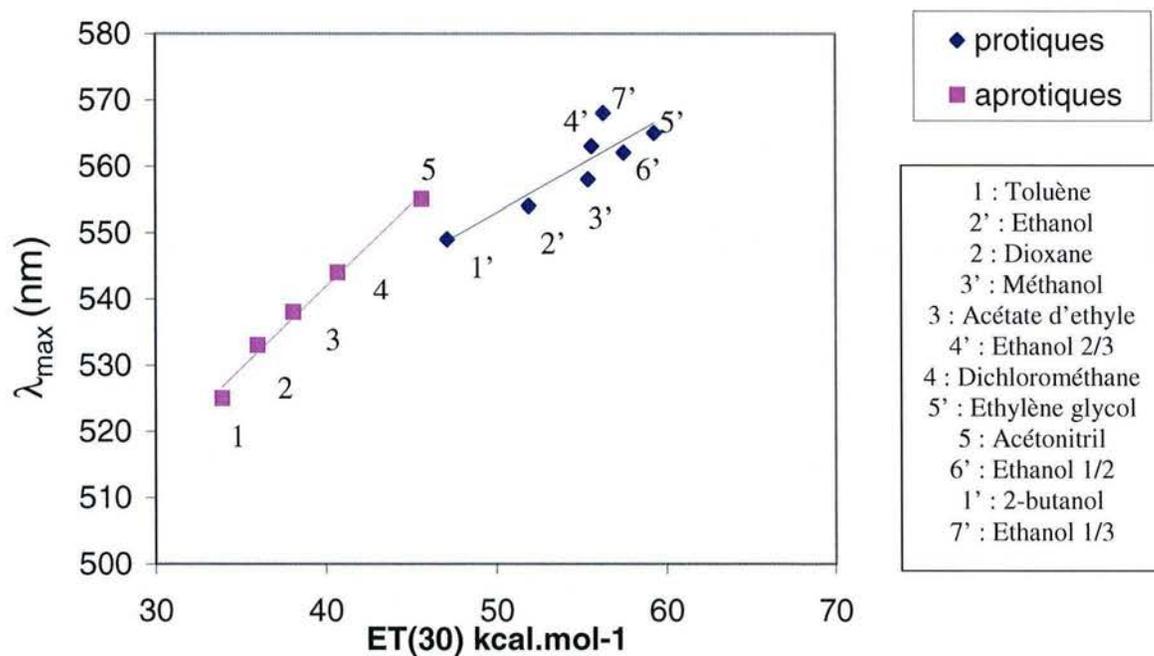


Figure III.1(10)

Influence de la polarité du solvant sur la longueur d'onde maximale d'émission de fluorescence de la sonde rotor coumarine CouC12.

Les résultats montrent une absence de variations aussi bien de la longueur d'onde maximale d'émission de fluorescence pour la sonde, ainsi que du rendement quantique de fluorescence.

Dans ces conditions de travail, ni la fluorescence ni les effets d'absorption internes intrinsèques aux substances humiques ne sont imputables aux absences de variation de polarité et viscosité constatées. Nous pouvons donc conclure que cette sonde n'a aucune affinité pour se fixer dans les micro domaines des macromolécules humiques.

En référence à la courbe du rendement quantique, les mouvements de la sonde ne sont pas bloqués, ce qui signifie que la sonde ne rentre pas, ou pas en totalité, dans les agrégats; la viscosité locale ne semble pas modifiée.

Les études parallèles réalisées en mesure de tension de surface et en fluorescence avec le tensio-actif sulfate dodécyl de sodium ou SDS (cf. Chapitre IV), nous feraient cependant penser à l'existence d'une interaction entre les parties hydrophobes des substances humiques et des chaînes alkyles en C₁₂.

Nous pouvons donc proposer un schéma d'explication (Figure III.1(11)) du mécanisme mis en œuvre de la façon suivante :

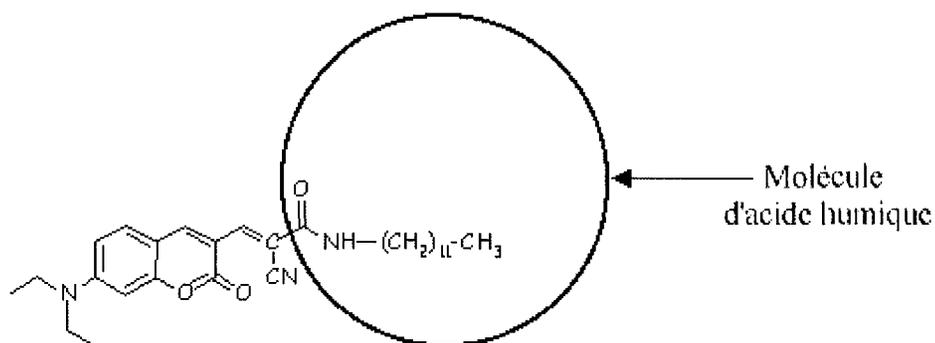


Figure III.1(11)
Représentation schématique de la fixation de la sonde coumarine rotor CouC12 sur l'acide humique.

Si la partie fonctionnalisée coumarine de la sonde reste à l'extérieur des agrégats d'AH, le rendement quantique de fluorescence reste constant et on ne notera pas de changement de la viscosité locale pour la sonde. Il en va de même pour l'absence de variation de polarité enregistrée.

III.1.2. Préparation des solutions d'acide humique en présence des sondes de fluorescence

III.1.2.1. Préparation des solutions contenant du pyrène

Dans les solutions finales d'acide humique, nous avons : [pyrène] = $1,1 \cdot 10^{-6}$ M au maximum (pour éviter la formation d'excimère) et 3% volumique en éthanol.

- La solution de pyrène servant à tous nos essais est de $1 \cdot 10^{-3}$ M dans l'éthanol (conservée au frais).
- Les solutions d'acide humique mères utilisées sont d'autre part préparées à des concentrations de 10 g/L, 1 g/L, 0,5 g/L dans de l'eau ultra-pure (MilliQ).
- Pour obtenir les solutions finales de pyrène et d'acide humiques, on a mélangé :
 - ❖ x ml de solution mère en acide humique 10, 1 ou 0,5 g/L
 - ❖ 20 μ l de solution mère en pyrène
 - ❖ on complète à 20 mL avec de l'eau ultra-pure
 - ❖ le pH est ajusté à 8 avec HCl ou NaOH (0,05 ou 0,1 N suivant le cas).

III.1.2.2. Préparation des solutions avec les rotors moléculaires 2-CN, CNCOOEt, D 7760 et CouC12

Initialement, pour nos premiers essais, nous nous sommes fixés dans tous les cas à une concentration finale en solution de $3,3 \cdot 10^{-6}$ M environ pour les sondes. Cependant, suite aux difficultés rencontrées que nous avons mentionné précédemment, nous avons dans un 2^{ème} temps augmenté ces concentrations pour aller jusqu'à $1,25 \cdot 10^{-5}$ M pour le rotor CNCOOEt, 10^{-5} M pour la sonde D 7760 et enfin $2,43 \cdot 10^{-5}$ M pour le rotor CouC12.

Les étapes de préparation des solutions sont les suivantes :

- Préparation de la solution de sonde $1 \cdot 10^{-3}$ M dans l'éthanol,
- Préparation des solutions mères d'acide humique dans l'eau,
- Préparation des solutions finales :
 - ❖ x ml de solution mère en composé 10, 1 ou 0,5 g/L
 - ❖ 30 μ l de solution mère en sonde (ajouté en solution juste avant la mesure car les rotors s'évaporent facilement)
 - ❖ on complète à 20 ml avec de l'eau ultra-pure
 - ❖ le pH est ajusté à 8 avec HCl ou NaOH (0,05 ou 0,1 N suivant le cas).

ARTICLE 2

Soumis à Environmental Science and Technology

**Interaction of pyrene fluoroprobe with natural and synthetic humic substances :
evidence for local molecular structure organisation and photophysical processes**

JUNG A.-V.¹, FROCHOT C.², VILLIERAS F.¹, LARTIGES B.S.¹, PARANT S.³,
VIRIOT M.L.², SELVE C.³, BERSILLON J.-L.¹

¹*Laboratoire Environnement et Minéralurgie (LEM),
UMR 7569 CNRS-INPL-ENSG, 15 avenue du Charmois, BP 40, 54501 Vandœuvre, France*

²*Département de Chimie Physique des Réactions (DCPR-GRAPP),
UMR 7630 CNRS-INPL-ENSIC, 1 rue Grandville, BP 451, 54000 Nancy, France*

³*Laboratoire de Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes (LCPOC),
UMR 7565 CNRS-UHP, Université Henry Poincaré (Nancy I), 54500 Vandœuvre, France*

Abstract

Interaction mechanisms of pyrene with different molecular weight fractions of synthetic humic-like acids (SHA) and natural humic acids (NHA) extracted from the Moselle River (France) suspended matters was carried out using molecular-scale techniques (polarity and quenching fluorescence methods) as well as interfacial air/water tension measurements. Polarity variation was followed by measuring the I_1/I_3 pyrene emission bands ratio. Stern-Volmer associative constants were determined by the quenching technique with humic materials as quenchers. The humic materials were previously characterized by various spectroscopic, liquid chromatography and elemental analysis methods (*1*). Despite an increase of surface activities observed for each fraction by surface tension measurements with humic substances concentrations, no specific interfacial tension changes due to pyrene were observed. On the polarity range variations of pyrene probe (I_1/I_3), no real “true-micellar” properties for synthetic humic acids were found suggesting that humic acids micellar representation cannot simply explain for pyrene hydrophobic trapping. The results obtained from the quenching technique measurements suggest some predominant specific intermolecular interactions like charge-transfer complexes between pyrene (electron donor) and humic aromatic units (electron acceptors) occurring in the entrapment mechanism of pyrene. By comparing SHA and NHA, polarizability, molecular weight and aliphatic chains (especially those containing nitrogen groups) were found to be the fundamental parameters which determine both molecular properties and entrapment pollutant capacities of humic acids in aqueous solutions. Only weak hydrogen bonds or high polarizability due to oxygen / hydrogen binding and peptidic-like moieties explain for the natural hydrophobic trapping.

***Key words* : natural and synthetic humic substances - fluorescence - pyrene - surface tension.**

Introduction

Understanding the fate and transport of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the environment is of a great importance for their regulation. PAHs are ubiquitous and have been identified in a variety of wastewaters, soils and natural waters (2-4). Although they also occur naturally, high levels of PAHs are mainly attributed to anthropogenic sources such as oil spills, automobile exhaust and coal refining processes. Mutagenic or carcinogenic effects of PAHs in aqueous media are clearly expected, according to traditional toxicity exposure tests. Pyrene, a mutagenic PAH, may be found in relatively high concentrations (data from Agence de l'Eau (5)) in river sediments (400 $\mu\text{g/L}$) as well as in water colloidal river compartment (100 ng/L). Moreover, pyrene is undoubtedly the most widely used fluorescence probe for organized media because of the well-established variation of its emission spectrum with the polarity of its immediate surroundings (6).

For a long time, it has been recognized that organic pollutants usually partition between aqueous media phase and natural organic matter, which was considered to have an indisputable role in the sorption and leaching of hazardous organic chemicals like PAHs in the environment (4, 7-9). Different techniques have been used to examine the binding capacities of various PAHs with natural organic matter (NOM). Most of them explored the river sediments NOM's binding capacity using adsorption methods, NMR or chromatographic methods (10-13). Most of these classical approaches require free pollutants concentrations measurements, before and after their binding with dissolved NOM in an aqueous reaction system even though separation steps often lead to poor quantitative binding efficiency estimations. Fluorescence quenching, however, does not require a separation step. Therefore, fluorescence spectroscopy has unique advantages in the study of contaminant binding to NOM whatever its origin (dissolved, suspended or sediment matter).

Molecular properties of humic substances have been recently recognized to influence removal of synthetic organic compounds from municipal and industrial wastewaters (14). Thus, the molecular size of humic substances was found responsible for the binding and environmental transport of both non-polar (15, 16) and slightly polar (pesticides) organic contaminants (17, 18). Polarity change in macromolecules structures could also affect the transport and remediation of pollution in the environment. Proposal already made in the literature range from a partition of the sorbates between water and micelle-like structures of the humic substances (19) to specific interactions of the sorbates with defined sorption sites of the humic substances (20). By correlating humic substances sorption properties with their

chemical parameters, it is possible to better identify the structures and the building blocks of humic substances that are decisive for their sorption behaviour. One approach toward understanding sorption properties of humic substances is to correlate “binding” coefficients determined by quenching measurements with others hydrophobic experimentally determined parameters. Analysis based on pseudo-micellar behaviour (19) showed that the increase of pyrene fluorescence with temperature in NOM solution can be related to the decrease of the dielectric constant of water. As water becomes a poorer solvent, humic polymers are thought to coil up and “squeeze” out the solvating water. Such dehydration has been offered in explanation of the well-known cloud-point behaviour of non-ionic surfactants (21). Increased pyrene fluorescence intensity with increased temperature in the presence of some humic acids thus may be ascribed to intramolecular micellar behaviour analogous to clouding. So far, pyrene fluorescence spectrum method has been used to predict solubility values and binding constants of nonpolar organic compounds to different sorbents. This probe appears to be a useful *in situ* tool for polarity estimation of activated sludge (22).

The mechanistic basis for interactions between PAHs and NOM is not yet sufficiently clarified to allow the development of a model for the prediction of sorption coefficients. Due to the complexity of humic molecules, one approach consists of synthesizing functionally defined polymers (23), integrating the main characteristics of amino-phenolic humic-like molecules (1).

A comparison of the interaction of the four ring non-polar PAH pyrene with different molecular weights SHA of catechol/glycine (CGHA) or catechol/triglycine (CTHA) polymers obtained by oxidation and humic acids extracted from the Moselle River (France) suspended matter was explored in the present paper. The amount of bound pollutant to each of the synthetic and natural humic acid fractions was correlated with the previous defined chemical properties. In an attempt to clarify the formation of micellar aggregates between pyrene and humic acids, surface tension of humic acids at different concentrations, alone and with pyrene was measured in order to detect if an interfacial modification could explain the pyrene entrapment in micellar-like domains. The results were correlated to a polarity pyrene-probe study.

Experimental section

Humic substances

Polymers prepared with catechol and glycine or triglycine as reactants, representing two different nitrogen sources were used in distinct synthesis (23). Two molecular weight SHA fractions (1-3.5 kDa and > 8 kDa, respectively CTHA1 and CTHA2) were obtained for the catechol/triglycine synthesis. An over 8 kDa catechol/glycine SHA fraction was collected (CGHA). The whole synthesis monitoring and detailed preparative processes are described elsewhere (1).

In our study, NOM consists of natural humic acids extracted from suspended river matters collected from the field (Nancy), according to the International Humic Substances Society (IHSS) standard procedure (24). Sodium saturated polymers greater than 8 kDa molecular weights were obtained after dialysis purification. Freeze-drying was performed. All natural and synthetic polymers were collected in their sodic forms. Two different polymers batches corresponding to two different field sampling campaigns were performed. The NHA1 extraction was realized during the summer season, the NHA2 during autumnal weather conditions.

Pyrene-Humic substances solutions

Pyrene (99+%) was purchased from Sigma-Aldrich Chemicals (Lyon, France) and carefully stored at 4°C in the dark. Crystals were dissolved in ethanol (99.5+% spectrograde, Carbo Erba, Orono, US) to make a stock solution of 10^{-3} M.

Solutions of 10, 5 and 0.1 g/L of SHA and NHA were first prepared in deionised ultra-pure Milli-Q water (Millipore, Billerica, MA, US). Dilutions of these solutions were made to obtain a polymer concentration scale from 0.1 to 1000 mg/L. 20 mL aliquots of SHA and NHA solution were then placed in glassware beakers and mixed with pyrene stock solution (10^{-3} M in ethanol) to obtain final concentrations of 10^{-6} M of pyrene. The volumetric content of ethanol introduced in the samples for fluorescence measurements did not exceed 0.1% and thus was considered negligible with respect to the solubility of pyrene in samples. The pyrene-SHA and pyrene-NHA solutions were then adjusted to pH 8 under stirring with dropwise addition of 0.1 M HCl. The pyrene-SHA and pyrene-NHA solutions were then allowed to equilibrate for one hour. Prior to fluorescence measurements, the samples were homogenized by stirring. I_1/I_3 pyrene fluorescence ratio versus SHA and NHA various concentrations was then recorded. The standard deviation of each I_1/I_3 value was calculated from three replicates.

Surface tension measurement

The solution used for surface tension measurements were prepared the same way as for the fluorescence measurements. The surface tensions (γ_s) were measured both for humic acid materials alone and in presence of pyrene at 10^{-6} M at pH 8 with Wilhelmy plate technique. The measurements were performed by using glass plates carefully cleaned first with sulfochromic acid, rinsed with Milli-Q ultra-pure water, then heated in Bunsen burner flame to avoid contaminants traces. γ_s values were obtained at $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$, using a KSV Sigma 70 tensiometer model (Cahn, Texas, US) and performed with constant solution volume of 20 mL. The accuracy of measurements was ± 0.1 mN/m. The surface tension of each solution was calculated twice with two immersion/emersion cycles mean results by origin linear intercepting from the receding branch. Standard errors between measurements for SHA fractions were 0.2 mN/m and 0.35 mN/m for natural ones (means for all fractions and concentrations ranges).

Fluorescence measurement

Steady-state fluorescence measurements were performed on a Spex Fluorolog-3 spectrofluorometer (Jobin-Yvon, Stanmore, UK) using 0.5 mm slits for the excitation and emission monochromators. The instrument was equipped with a 450W Xenon lamp (Jobin-Yvon). The sample temperature was maintained to $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ by a LTD6G temperature control unit (Grant, Sarose, UK). In order to compare the fluorescence intensities of all fluorescence spectra and to avoid time apparatus drift, the fluorescence was normalised with a 0.16 mg/L fluorescein solution buffered at pH10. Emission maximum of this reference solution was determined at 512 nm (excitation 472 nm) between each measurement.

Different corrections for inner-filter effects were tested for the samples used here (25, 26), especially for the measurement of the pyrene fluorescence in presence of strongly absorbing solutions of polymers (up to 1 g/L). Auger's correction (25) was found to yield the best linear fit for the intensity signals and also adequately correct the DOM absorption. Absorbance was measured by means of a Perkin Elmer (Boston, US) Lambda 2 spectrophotometer. The SHA and NHA intrinsic fluorescence was corrected by subtraction of emission intensities of SHA and NHA solutions without pyrene.

Determination of binding measurements by fluorescence

Fluorescence quenching corresponds to an interaction between the fluorophore and another specie leading to a diminution, or even extinction of the fluorescence signal. This

interaction may take place in the excited state of the fluorescence compound and be collisional in nature, in which case it is referred to as “dynamic quenching”. The excitation energy is transferred to the quencher and usually nonradiatively dissipated. Alternatively, the fluorophore and the quencher may associate in the ground state, leading to species that lacks the original fluorescence characteristics. This is termed “static quenching”.

Quenching interactions are described by the Stern-Volmer eq (1) :

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV}[Q]_0 \quad (1)$$

where I_0 and I are respectively the fluorescence intensity in the absence and in the presence of quencher, K_{SV} the Stern-Volmer quenching constant, and $[Q]_0$ the quencher initial concentration.

The equation holds for both dynamic and static quenching, provided that only one type of quenching is operative and that the fluorophore is present as a single population. Linear Stern-Volmer plots (I_0/I vs $[Q]_0$) are obtained under those circumstances.

In the case of dynamic quenching, the slope of the plot K_{SV} is $\tau_0 k_q$, where τ_0 is the unquenched fluorescence lifetime and k_q is the bimolecular quenching constant. For such collisional process, the quantity I_0/I may be replaced by τ_0/τ , where τ is the fluorescence lifetime in the presence of quencher. For static quenching, K_{SV} becomes the binding constant of the ground-state complex between fluorophore and quencher.

The reaction between pyrene and DOM can also be described as:



and the binding constant is given by eq (2):

$$K_{SV} = \frac{[\text{Pyrene - DOM}]}{[\text{Pyrene}][\text{DOM}]_0} = k_q \tau_0 \quad (2)$$

where $[\text{Pyrene}]$, $[\text{DOM}]_0$ and $[\text{Pyrene-DOM}]$ are respectively the uncomplexed pyrene, the initial DOM, and the complexed pyrene with DOM concentrations, k_q the bimolecular quenching constant, τ_0 the lifetime of the fluorophore in the absence of the quencher.

Pyrene fluorescence spectrum shows five main vibronic bands called I_1 , I_2 , I_3 , I_4 and I_5 respectively at 372, 377, 382, 390 and 395 nm in emission for a 332 nm excitation wavelength.

For quenching measurements, I_0/I_2 ratio was calculated, with I_0 and I_2 the pyrene fluorescence intensities respectively without and with humic substances both at 377 nm in emission for 332 nm excitation wavelength.

Three replicates were run for each sample for each quenching measurements to determine average binding constants.

Pyrene as a molecular probe for the study of organized media

The considered parameter is the ratio of the first (372 nm) to the third (382 nm) peaks in the spectrum (I_1/I_3), which exhibits a continuous change with polarity, ranging from 1.89 in DMSO to 0.56 in methylcyclohexane (27). This value is indicative and depends on the equipment. The effect is due to vibronic coupling of the 0-0 band at 372 nm and consequent perturbations in intensity, equivalent to the Ham effect in benzene (28). Moreover, pyrene exhibits several valuable photophysical parameters such as high quantum yield of fluorescence and long fluorescence lifetime (respectively $\phi = 0.6$, $\tau = 450$ ns in deaerated cyclohexane (27)). All these properties make pyrene suitable for probing rather complex system as whole or their non-polar part. Monomer emission can serve as a starting point to monitor processes in which excitation localised on pyrene is transferred to other chromophore due to dipole-dipole interaction or electron exchange (6, 29).

Moreover, pyrene is dynamically quenched and its solubility is enhanced in aerated solutions (30). Since no data were provided to show that oxygen was in any way important in the determination of partition constants, and that from literature reports, it remains quite unclear what the effect would be (31, 32), this parameter was also selected for interference study. The decrease in fluorescence lifetime in the presence of oxygen is given by a Stern-Volmer equation. I_1/I_3 has been measured for three different SHA and NHA solutions at three different concentrations in solutions, purged with N_2 during 5 min. No significant differences in the I_1/I_3 ratio were observed. All the measurements were also made after 5 min stirring of SHA and NHA with pyrene directly without purging the solutions.

Results and Discussion

SHA and NHA characterisations

A variety of analytical tools were used to characterize synthetic and natural extracted humic materials and have been presented elsewhere (1). The main properties (results from elemental analysis, hydrophobicity indices) are summarized in Table 1. Nitrogen contents were found to be approximatively three times more abundant in CTHA polymers than in CGHA ones. CTHA is presumed to have more “labile” peptidic bonds and lower aromaticity degree than CGHA polymer. NHA present different aromatic and peptidic structures. A previous study (1) showed that nitrogen nature and origin are one of the fundamental parameters governing fluorescent humic substances behaviour.

Surface tension measurements at the air / water interface

The surface tension measurements are showed in Figure 1. The surface tensions of all humic substances decrease with an increase of the samples concentration. No significant differences between humic acid and mixture of humic solutions with pyrene were observed, only a slight deviation was measured, obviously due to ethanol introduction in solutions when injecting pyrene (insert Figure 1).

Surface tensions measured a CTHA1 and CGHA solutions linearly decrease with increasing SHA concentrations, whereas NHA1, NHA2 and CTHA2 have hyperbolic shapes. CTHA1 and CGHA surface tension linear plots are similar to natural soil and leaf humic acids extracts reported in the literature (32), whereas NHA1, NHA2 and CTHA2 are closer from soil fulvic extracts. These different behaviours suggest that natural humic acids and CTHA higher molecular weight fraction (CTHA2) rather present a molecular crowding at the interface, whereas synthetic CGHA and CTHA1 polymers seem to behave like lesser charged polymers (e.g., ref 33 and Table 1 for SHA and NHA acidities). Molecular weight cannot explain the higher surface-tension depressing potential of CTHA2 compared to CTHA1. We have used the critical micellar concentration (CMC) method determination to calculate these concentrations for the natural humic substances. The results are reported in Table 2. The CMC values are twice lower than those determined in the literature for natural humic substances extracted from marine sediments (34). By determining break points of two surface tension versus logarithm of humic acid concentration straight lines, they have obtained 1 g/L for the CMC extracts.

Stern- Volmer plots

The I_0/I_2 versus SHA and NHA concentrations plots are represented in Figure 2. For all humic fractions, the quenching plots present a linear evolution at low concentrations (below c_{sd} concentrations reported in Table 2). Slopes of Stern-Volmer plots decrease from synthetic CGHA, CTHA2 and CTHA1 to natural NHA1 and NHA2. When considering higher SHA and NHA concentrations range (zoom Figure 2), upwards curvatures are observed for all humic substances.

A first upward curvature began at around 60 and 70 mg/L (dash lines limits in Figure 2), a second at around 100 mg/L (zoom Figure 2) and a third for higher than 600 mg/L (zoom Figure 2) HA concentrations for respectively CGHA and CTHA2 two fractions. CTHA1, NHA1 and NHA2 first breaking-off concentrations could respectively be marked at near 100, 280 and 300 mg/L (zoom Figure 2). NHA2 second stronger breaking-off concentration is at near 630 mg/L.

The standard view of the interactions of fluorescent compounds with humic materials is that two distinct populations of fluorophore exist in solution : one consists of molecules bound to the humic matrix, and the other consists of those remaining free in solution. Fluorescence of the first group is completely quenched (static quenching). The second group has no interaction with the humic material, but remains vulnerable to other quenchers that may be present in the solution (dynamic quenching). Since both dynamic and static quenching can be described by linear Stern-Volmer plots at low concentrations, it is possible that a dynamic quenching process was involved in the pyrene quenching experiment. Using higher concentrations may be necessary in order to reach the point at which deviation from linearity takes place (here called c_{sd}). Stern-Volmer analysis has been generally proceeded in 0 to 125 mg/L NHA concentration range (35). In presence of different cations salts, linear pyrene quenching plots were observed for NHA concentrations below 25 mg/L, then an upward curvature was observed for higher concentrations. Without cations, NHA have linear Stern-Volmer plot only until 10 mg/L. The authors suggest that NHA are more loosely structured without complexing sites salts, so that pyrene has more diffusional freedom. The collisional encountering are less frequent for cations-structured NHA structures, so that dynamic quenching is only permitted for higher NHA concentrations.

In our systems, Stern-Volmer plots show a great variability in the I_0/I_2 ratio, which could also result in a combination of dynamic and static processes. However, for concentrations below c_{sd} , the plots could be linearized to determine the K_{sv} values for the systems (Table 2). These K_{sv} values obtained for our systems are in good agreement with the

range found in the literature for different PAHs complexed with NOM (36, 37). For NHA and SHA concentrations below c_{sd} , we can also suggest that the polymers are rather subject to one type of quenching since pyrene will be rigidly entrapped in the more accessible hydrophobic sites of humic substances. On the other hand, due to structural change in NHA and SHA conformations, diffusional and collisional movements are favored. This could be explained by “cage”-like microstructures in humic substances where pyrene can enter during excited lifetimes of fluorophores.

The much higher CGHA K_{SV} values may be explained by differences in elemental analysis reported in Table 1. The H/C atomic ratio, which is a measure of -HC=CH- bonds that can be used as an indicator of the aromaticity degree (38), is substantially lower (greater aromaticity) for this polymer. It has been suggested (7) that an increase in C=C bonds number increases the molecular polarizability and thereby increases the strength of the van der Waals attractive forces. Moreover, the greater aromaticity could be also responsible for pi bonding interactions between the aromatic structure of the pyrene and the aromatic moieties of the SHA and NHA (39). Besides, the hydrophobicity indexes (HI in Table 1) calculated by reversed-phase high liquid chromatography in a water/acetonitrile elution gradient (1) for the different fractions show good correlation with the Stern-Volmer constants determined in 0- c_{sd} mg/L range. These results prove that the more hydrophobic the humic substances at the local scale, the more effective the quenching fluorescence with pyrene. Moreover, a previous work (1) has showed that CGHA polymer presents the more condensed aromatic structure. It can be concluded that the more condensed the polymer, the more efficiently quenched pyrene fluorescence and the more rigidly entrapped the fluoroprobe.

The very slight difference in the Stern-Volmer slopes relative to CTHA2 and CGHA polymers at concentrations below c_{sd} mg/L suggests that peptidic bonds contributions do not play a significant role in the first step of the interaction mechanism (static quenching). Nitrogen origin and structural incorporation in humic macromolecular assemblies will be predominant in the second step (dynamic quenching) of pyrene entrapment, since it will “delay” diffusional processes. According to (O+N)/C and Py/GC-MS analysis (1), it can be inferred that the nature of nitrogen source, and not its quantity, determines the type and final efficiency of quenching mechanism proposed here for pyrene. The NHA1 tryptophane part (an amino aromatic protein) is suspected to be responsible for other complex photophysical electron charge transfer, which will lead to the higher I_0/I_2 values.

Polarity measurements

Figure 3 shows the I_1/I_3 fluorescence intensity ratio as a function of SHA and NHA concentration in aqueous solution. In the original suspensions, I_1/I_3 is equal to 1.9 which indicates an average solvent environment of pyrene as polar as water. Upon increase of SHA and NHA concentration, I_1/I_3 decreases more or less drastically according to the type of humic acid fraction, then reaches a minimum for higher than 100 mg/L ($\log [c] = 2$) for all types of SHA and NHA and eventually remains constant at higher concentrations.

Critical polarity concentrations (c_{bp}) measured at the first breaking-off values of the I_1/I_3 versus $\log [c]$ plot were defined as following : 30 mg/L for CTHA2, 45 mg/L for the CGHA and 79 mg/L for the CTHA1 (reported in Table 2). For natural humic acid two extracts, the c_{bp} were found in a higher range. 220 and 280 mg/L critical concentrations were determined for respectively NHA1 and NHA2. We can note a first weak breaking-off at 100 mg/L in the I_1/I_3 ratio for the natural humic acid NHA1.

The different c_{bp} concentrations obtained suggest different solubilization sites for pyrene. More hydrophobic solvation pockets may indicate a more selective pseudo-stationary phase with better solvation capacity for hydrophobic compounds. When comparing the critical polarity value concentrations for SHA and NHA (Table 2), it can be deduced that most hydrophobic solubilization sites are provided by the different studied materials in the following decreasing order : CTHA2, CGHA, CTHA1, NHA1 and NHA2. This evolution suggests that the pyrene probe has been solubilized within a more hydrophobic environment when SHA and NHA concentrations increased. Such a behaviour, typically encountered during the formation of a micellar phase, can be described to an increased partition of pyrene into hydrophobic domains. The (O+N)/C atomic ratio commonly serves as a surrogate measurement of polarity (40). The results for humic acids ratios are presented in Table 1. From the great variability of the (O+N)/C ratios, we conclude that proteinous moieties cannot be responsible for the first I_1/I_3 polarity breaking-off. Moreover, for each humic fraction, the final ratio stabilization value depends on the polymer composition (41). Then, the higher the (O+N)/C ratio, the more hydrophobic the microdomains, for higher than 100 mg/L NHA and SHA concentrations. The peptidic bonds are also expected to determine the final polarity in the surroundings of the pyrene probe. According to the difference for chemical compositions between the synthetic CTHA models, longest carbon chain provide the most hydrophobic solubilization site for pyrene at molecular scale. Moreover, even with high molecular weights, natural humic acids present a weaker hydrophobic solubilization potential for pyrene, as compared with CTHA smaller molecular weight extracts. To conclude,

hydrophobic characteristics responsible for pyrene entrapment in humic structures are mainly due to (1) polarity, determined both by aromaticity and aliphatic chains substituents to the “hard nucleus” of humic acids (2) molecular weight of humic substances.

The measured pyrene I_1/I_3 values variations are consistent with the quenching results. The corresponding concentrations for breaking-off in Stern-Volmer plots, differentiating static from dynamic quenching, are quite close from c_{bp} values. The polarity observed here could also be defined as the sum of several binding forces. Pyrene solubilization sites could be affected by location of others aliphatic chains present on polymer backbone with respect to the location of the pyrene solute. Although the measured I_1/I_3 values are statistically different for each polymer, the differences are considerably smaller than those calculated for K_{sv} constant bonds, especially between CGHA and CTHA higher molecular weight polymers and the two natural extracts. It is likely that proximity between solubilized pyrene and -N groups, e.g., those located on the aliphatic chains, can influence the polarity reported by the pyrene probe. We can also notice that K_{sv} quenching technique could lead to an over-estimation for quantitative association, due to several contributions of photophysical complexation processes. This is in agreement with pyrene sorption studies on model and natural humic polymers (42) : sorption coefficients derived from fluorescence measurements are always higher than those derived from activity measurements using solid phase microextraction.

Moreover, at high concentrations where dynamic quenching occurs, SHA hydrophobic domains may be loosely structured than NHA. The pyrene probe has a more considerable diffusional freedom with this kind of macromolecules and a lesser tendency to be captured by HAs. For natural polymers, the resulting constriction of the pseudo-micellar domains not only excludes hydrophilic moities, but also largely eliminates the dynamic quenching component of pyrene fluorescence at low concentrations. All these results give confirmation that “true” binding is not a requisite to the quenching process.

Since no significant interfacial tension change was observed when introducing pyrene in solution, all combined data indicate a close physical association between the fluorophore and the quencher akin to a partitioning of the former into hydrophobic pockets. The comparison of natural and synthetic humic acid interfacial and polarity results suggests that the hydrophobic interactions are responsible for the organisation of the aggregates, regardless of HA origin. So, even if the hydrophobic characteristics of humic acid correlate well with the pyrene quenching capacity, the specific interactions with aromatic molecular sites depend on the total structural tridimensional photophysical environment of humic acids in solution. Some evidence of photophysical cage-like structures existence which are obviously

responsible for physical weak interactions (like Van der Waals forces) are shown by the present, not directly correlated results. These structures are a “true-micellar” aggregation step. These weak attraction forces could rather be described by uncharged yet polarised species. Many side chains present in humic molecules with polar character could also act as H-bond donors, acceptors or both. The strength of a particular H-bond can be modulated by competition from the solvent, molecular flexibility, cooperativity of structural organisation and constraints imposed by excluded water. The stabilisation effects due to a H-bond must also involve the loss of rotational and transitional entropy, as shown by dynamic quenching processes revealed by this study.

Summurizing the above, it is possible to formulate a conceptual model of humic acid behaviour with respect to pyrene in dilute solutions. The independent variable of this model is the humic acid concentration. This model holds whichever HA origin, either synthetic or naturally occurring. It is presented in Figure 4. Three main domains for Pyrene-HA associations are showed with increasing HA concentrations : (A) region where molecular photophysical “weak-adsorption” interactions between the fluoroprobe “pyrene” and the most hydrophobic HA sites takes place; this region allows to determine the Stern-Volmer binding constants between pyrene and HA molecules (B) region where polarity change are recorded in pyrene microenvironment; rotational and diffusional began to occur in solution (C) region corresponding to a “pseudo-micellar” organisation phase at the air/water interface. The high HA concentration region shows that organic matter micellar-like behaviour is independent from pyrene entrapment capacity.

Acknowledgments

This work was made within the frame of the programme “Zone Atelier du Bassin de la Moselle” with grants from Region Lorraine and CNRS. Field-centrifuge provided by Agence de l’Eau Rhin-Meuse for natural extracts sampling is gratefully acknowledged.

Literature Cited

- (1) Jung, A.-V. Institut National Polytechnique de Lorraine PhD dissertation **2004**.
- (2) Bouloubassi, I.; Saliot, A. *Mar. Poll. Bull.* **1991**, *22*, 127.
- (3) Bayard, R.; Barna, L.; Mahjoub, B.; Gourdon, R. *J. Contaminant Hyd.* **2000**, *46*, 61.
- (4) Countway, R.E.; Dickhut, R.M.; Canuel, E.A. *Org. Geochem.* **2003**, *34*, 209.
- (5) <http://www.eau-rhin-meuse.fr/Berm/htm>
- (6) Kalyanasudaram, K.; Thomas, J.K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2039.
- (7) Gauthier, T.D.; Seitz, W.R.; Grant, C.L. *Environ. Sci. Technol.* **1987**, *21*, 243.
- (8) Chin, Y.P.; Aiken, G.R.; Danielsen, K.M. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*, 1630.
- (9) Peuravuori, J. *Anal. Chem. Acta* **2001**, *429*, 75.

- (10) Karickhoff, S.W.; Brown, D.S.; Scott, T.A. *Wat. Res.* **1979**, *13*, 241.
- (11) Laor, Y.; Farmer, W.J.; Aochi, Y.; Strom, P.F. *Wat. Res.* **1998**, *32*, 1923.
- (12) Weber, W.J.; Huang, W.; Leboeuf, E.J. *Coll. Surf. A / Physicochem. Eng. Aspects* **1999**, *151*, 167.
- (13) Ghosh, U.; Gillette, J.S.; Richard, G.L.; Zare, R.N. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*, 1729.
- (14) Karanfil, T.; Kilduff, J.E.; Schlautman, M.A.; Weber, W.J. *J. Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 2187.
- (15) Chiou, C.T.; Kile, D.E.; Brinton, T.I.; Malcolm, R.L.; Leenheer J.A.; Mac Carthy P. *Environ. Sci. Technol.* **1987**, *21*, 1231.
- (16) Chin, Y.P.; Weber, W.J., Jr. *Environ. Sci. Technol.* **1989**, *23*, 978.
- (17) Piccolo, A.; Celano, G.; Conte, P. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 2442.
- (18) Piccolo, A.; Conte, P.; Scheunert, I.; Paci, M. *J. Environ. Qual.* **1998**, *27*, 1324.
- (19) Engebretson, R.R.; von Wandruska R. *Environ. Sci. Technol.* **1994**, *28*, 1934.
- (20) Schlautman, M.A.; Morgan, J.J. *Environ. Sci. Technol.* **1993**, *27*, 2523.
- (21) Myers, D. *Surfactants Science and Technology*, 2nd ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 1992.
- (22) Ganaye, V.A.; Keiding, K.; Vogel, T.M.; Viriot, M.-L.; Block, J.-C. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*, 2701.
- (23) Andreux, F. *Sci. Sol* **1981**, *4*, 271.
- (24) Thurman, E.M.; Malcolm, R.L. *Amer. Chem. Soc.* **1981**, *4*, 463.
- (25) Auger, R.L.; Jacobson, A.M.; Domach, M.M. *Environ. Sci. Technol.* **1995**, *29*, 1273.
- (26) MacDonald, B.C.; Lvin, S.J.; Patterson, H. *Anal. Chim. Acta.* **1997**, *338*, 155.
- (27) Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd ed.; Kluwer Academic/ Plenum: New York, 1999.
- (28) Nakajima, A. *Spectrochim. Acta A* **1974**, *30*, 860.
- (29) Turro, N.J. *Modern Molecular Photochemistry*; The Benjamin/cummings Pub.: MenloPark, 1978.
- (30) Danielsen, K.M.; Chin, Y.-P.; Buterbaugh, J.S.; Gustafson, T.L.; Traina, S.J. *Environ. Sci. Technol.* **1995**, *29*, 2162.
- (31) Green, S.; Blough, N.V. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 1407.
- (32) Chin, Y.-P.; Buterbaugh, J.M.; Gustafson, T.J.; Traina, S.J.; Danielsen, K.M. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 1409.
- (33) Chen, Y.; Schnitzer, M. *Soil Sci.* **1978**, *126*, 7.
- (34) Shinozuka, N.; Lee, C. *Mar. Chem.* **1991**, *33*, 229.
- (35) Ragle, C.S.; Engebretson, R.R.; von Wandruska, R. *Soil Sci.* **1997**, *162*, 2.
- (36) Landrum, P.F.; Nilhardt, S.R.; Eadle, B.J.; Gardner, W.S. *Environ. Sci. Technol.* **1984**, *18*, 187.
- (37) Gauthier, T.D.; Shane, E.C.; Guerin, W.R.; Seitz, W.R.; Grant, C.L. *Environ. Sci. Technol.* **1986**, *20*, 1162.
- (38) Chen, Y.; Senesi, N.; Schnitzer, M. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1977**, *41*, 352.
- (39) Chin, Y.-P.; Aiken, G.R.; Danielsen, K.M. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*, 1630.
- (40) Kukkonen, J.; McCarthy, J.F.; Oikari, A. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1990**, *19*, 551.
- (41) Frochot, C.; Muller, C.; Brembilla, A.; Carré, M.-C.; Lochon, P.; Viriot, M.-L. *Int. J. Polym. Anal. Charact.* **2000**, *6*, 109.
- (42) Mackenzie, K.; Georgi, A.; Kumke, M.; Kopinke, F.-D.; *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 4403.

Figures captions

FIGURE 1. Surface tension versus humic acid (HA) concentration (mg/L).

FIGURE 2. Synthetical and natural Stern-Volmer plots ([HA] in mg/L).

FIGURE 3. Pyrene I_1/I_3 ratio dependance with humic substances concentrations.

FIGURE 4. Summarizing view of the different Pyrene-HA interaction steps with the pertinent methods here described.

Tables

TABLE 1. Humic substances under investigation (ref 1).

TABLE 2. Stern-Volmer association constants and critical concentrations values for humic substances.

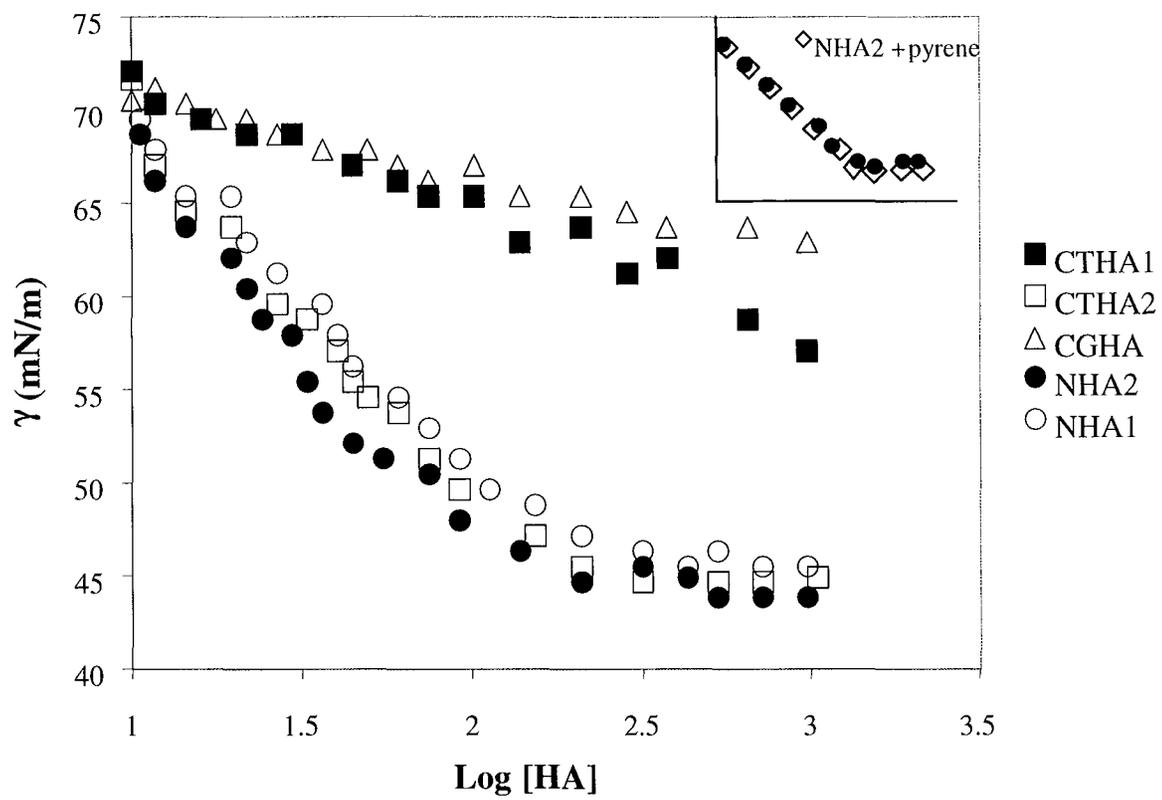


FIGURE 1.

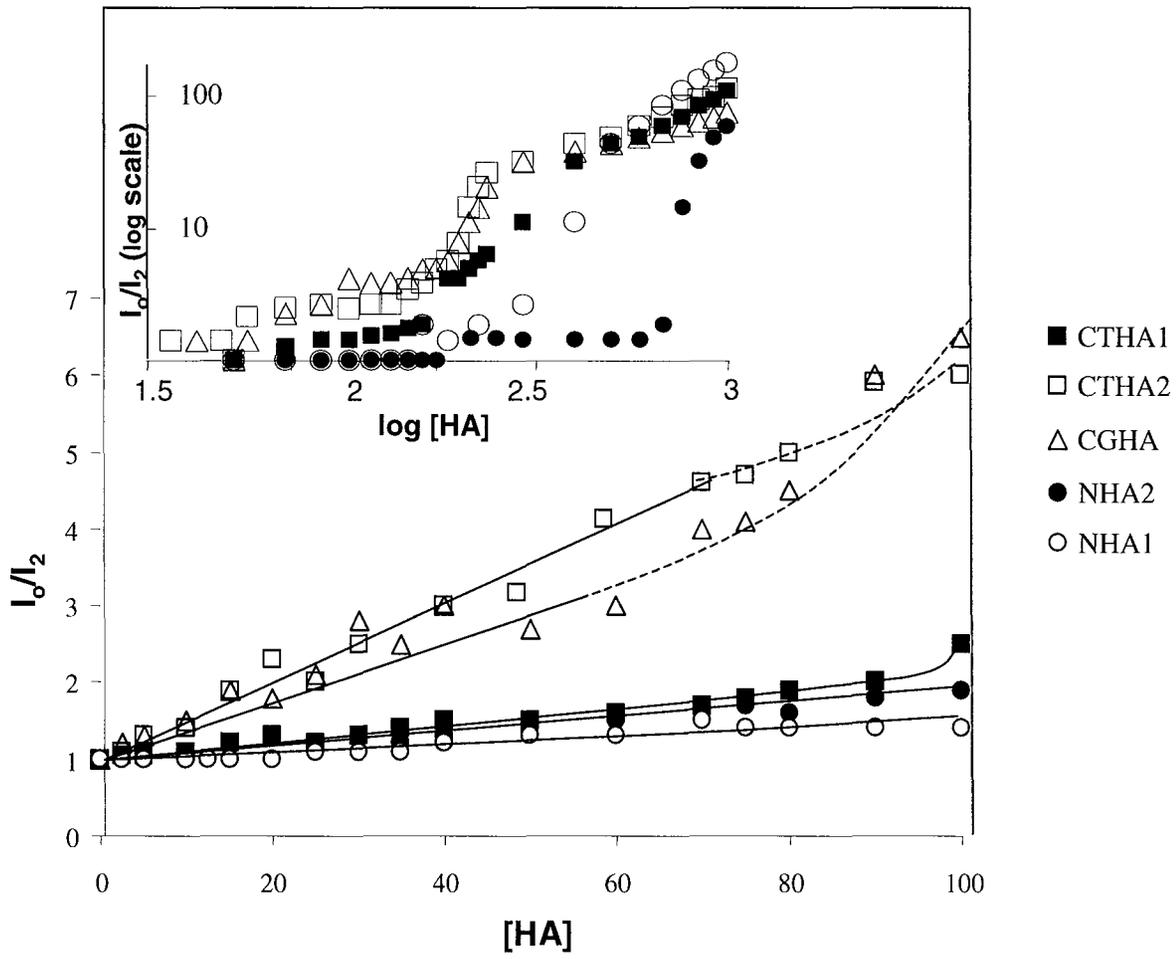


FIGURE 2.

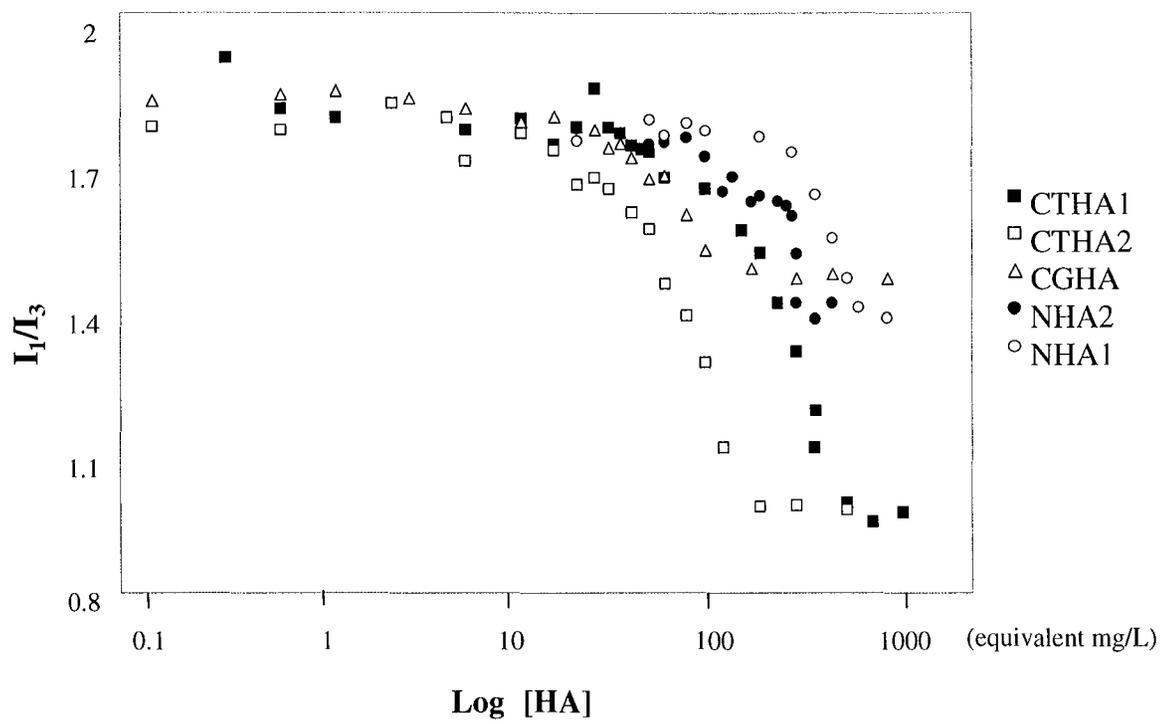


FIGURE 3.

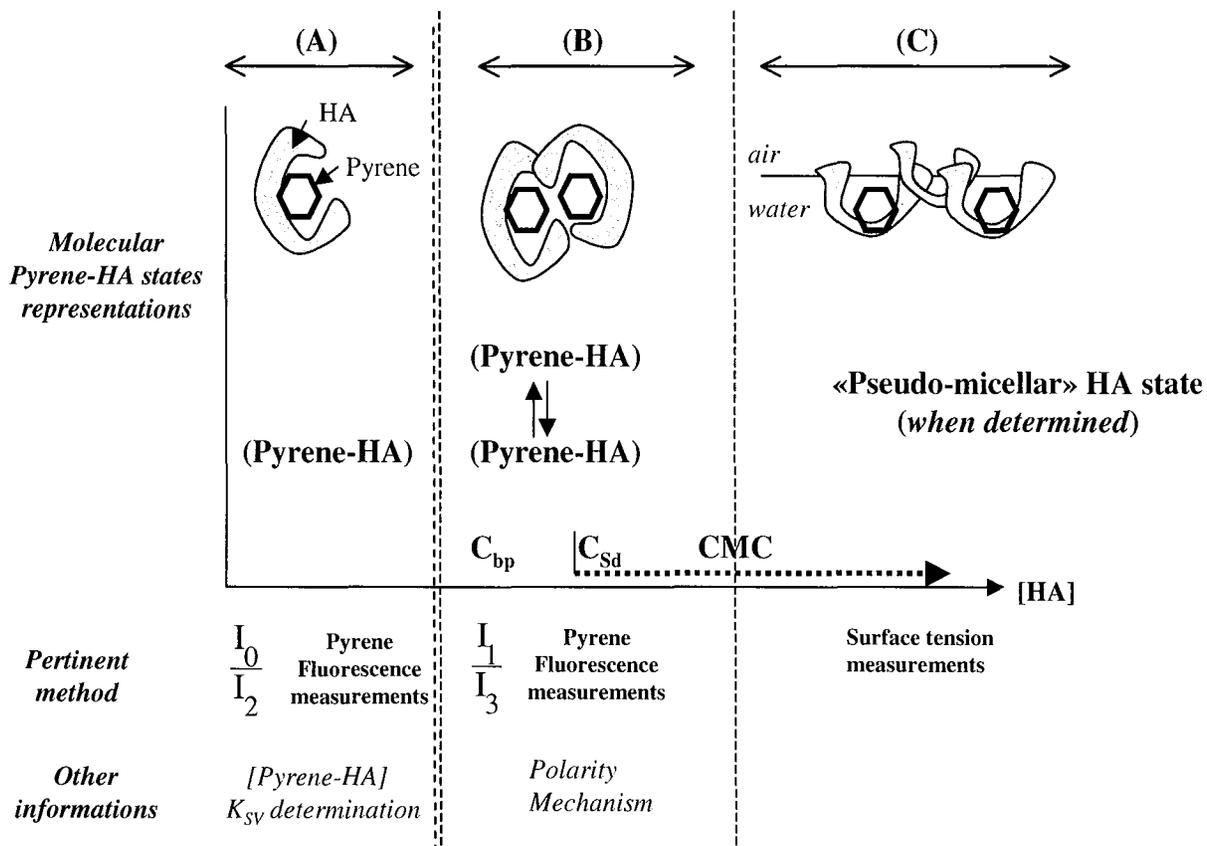


FIGURE 4.

TABLE 1

Humic acid fraction	O/C ^a	H/O ^a	(O+N) ^a /C ^a	H/C ^a	Total Acidity (meq/g)	HI ^b
CGHA	0.97	0.002	1.86	0.56	3.7	84.6
CTHA2	1.02	0.003	4.35	0.78	5.6	82.8
CTHA1	1.86	0.003	6.78	1.38	5.4	76.6
NHA1	0.53	0.014	3.27	1.87	13.1	51.1
NHA2	0.75	0.008	2.52	1.61	18.0	52.2

^a Elemental analysis (all in wt%) (O=100%-ΣC, H, N).

^b HI : Hydrophoby Index determined by RP-HPLC (See ref 1).

TABLE 2

Humic acid fraction	K _{SV} ^a (σ = +/- 0.05 10 ⁴ mL/g)	C _{bp} ^b (σ = +/- 0.5 mg/L)	C _{sd} ^c (σ = +/- 10 mg/L)	CMC ^d (σ = +/- 50 mg/L)
CGHA	5.50 10 ⁴ mL/g	45 mg/L	60 mg/L <i>(100 mg/L)</i> <i>(600 mg/L)</i>	*
CTHA2	4.50 10 ⁴ mL/g	30 mg/L	70 mg/L <i>(100 mg/L)</i> <i>(600 mg/L)</i>	320 mg/L
CTHA1	1.51 10 ⁴ mL/g	79 mg/L	100 mg/L	*
NHA1	0.52 10 ⁴ mL/g	<i>(100 mg/L)</i> 220 mg/L	280 mg/L	500 mg/L
NHA2	0.31 10 ⁴ mL/g	280 mg/L	300mg/L <i>(630 mg/L)</i>	450 mg/L

^a Stern-Volmer constants with 10⁻⁶ M pyrene, [HA] 1-30 mg/L, pH 8.

^b Pyrene (10⁻⁶ M) polarity change breaking-off concentrations (Figure 1).

^c Static/dynamic quenching mechanism transition concentrations (*in italic the 2nd and 3rd breaking-off values*).

^d Critical micellar concentration values determined as HA first concentration for γ stabilization value (* no stabilization value obtained).

CONCLUSION SUR L'ETUDE DES SUBSTANCES HUMIQUES PAR DES SONDES DE POLARITE ET/OU DE VISCOSITE

Cette partie nous a permis d'appréhender les difficultés de l'utilisation de certaines sondes de fluorescence avec des macromolécules aussi complexes que les substances humiques. Une interprétation globale de ces résultats est délicate. Nous pouvons émettre à ce stade deux principales hypothèses :

- soit les sondes ne « voient » des variations de viscosité locale que sur un certain domaine de concentrations de substances humiques, preuve qu'elles présentent un encombrement stérique moins favorable que celui du pyrène pour permettre l'enregistrement de variations de polarité ou de viscosité aux plus faibles concentrations. Il leur est donc nécessaire d'être en présence d'une quantité suffisante de molécules humiques pour détecter des variations. A des concentrations en acide humique trop importantes, sous l'effet d'une reconformation éventuelle des acides humiques, elles peuvent être expulsées des micro-domaines sous l'effet d'une contraction de structure tridimensionnelle du réseau dans lequel elles étaient piégées.
- soit les sondes sont bien appropriées à l'étude des micro-domaines de viscosités différentes, mais l'existence de groupements n'absorbant pas de lumière aux longueurs d'onde d'absorption (comme les chaînes aliphatiques par exemple), en se réorganisant lors de la reconformation (ou agrégation) des substances humiques en solution, vont provoquer la formation de nouvelles familles de groupements chromophores (et donc modifiant le diagramme des énergies électroniques du système initial) au sein des macromolécules. Ces effets, propres aux substances humiques, nous empêcheraient ainsi d'avoir des variations monodales en polarité et/ou viscosité comme il est généralement constaté pour des systèmes polymériques mieux définis.

La question de la pertinence de l'utilisation éventuelle de sondes avec les molécules humiques nous a fait aborder notre étude sous l'angle de la mesure de la fluorescence intrinsèque aux substances humiques. Les résultats de cette méthode sont détaillés dans le Chapitre IV suivant.

Le Chapitre III a permis une meilleure compréhension de l'organisation des substances humiques en solution, notamment grâce à l'utilisation de la sonde de fluorescence « pyrène ». Ses propriétés de fluorescence ont été mises à profit pour nous conforter dans l'existence de phénomènes de conformation des substances humiques complexes en solution aqueuse, faisant intervenir à la fois des effets de structure (réseau tridimensionnel des substances humiques) et des propriétés physico-chimiques plus globales (caractère hydrophobe notamment) des matières organiques. Le caractère tensio-actif des différents composés d'acide humique (naturelles et synthétiques) a été interprété grâce aux mesures de tension de surface, à l'échelle de l'interface air/solution aqueuse. De l'ensemble de ces mesures, une approche globale du système « acide humique dissous / pyrène » a pu être dégagée : l'interaction entre le pyrène et l'acide humique pourrait s'effectuer suivant différentes étapes, la 1^{ère} intervenant à de faibles concentrations en substances humiques (jusqu'à 20 mg/L environ, tous composés confondus) et semblerait correspondre à une interaction de nature purement photophysique entre les cycles benzéniques du pyrène et les parties aromatiques des acides humiques. Les différences quantitatives calculées grâce aux constantes d'association de Stern-Volmer nous ont montré une association plus forte entre le polluant et les composés humiques synthétiques par rapport aux composés naturels. Le 2^{ème} type d'interaction intervient à une concentration variable suivant la fraction humique considérée. Il apparaît en terme de variation de polarité des microdomaines appartenant aux macromolécules en solution. Il peut correspondre à un réarrangement moléculaire, à savoir une réorganisation des parties hydrophobes, dans lesquelles vient s'incorporer le pyrène, et hydrophiles en solution. Ces deux premières étapes sont indépendantes de la troisième, correspondant quant à elle à un phénomène d'agrégation « vrai » (*i.e.* vu à l'échelle de l'interface air / solution). Ce 3^{ème} phénomène n'apparaît pas systématiquement en solution aqueuse. Il semble directement lié à la nature de la MO, et est indépendant de la quantité de pyrène associée à la matière organique. Une possible explication des différences observées entre les composés, notamment celle concernant cette 3^{ème} étape, pourrait être directement liée à l'abondance de liaisons de type peptidique (issues de la décomposition microbienne en milieu aquatique) contenues dans les substances humiques : plus la MO en contiendrait, plus elle gagnerait en caractère tensio-actif, sans pour autant transporter davantage de pyrène. Ceci est le cas des substances humiques naturelles.

L'ensemble de ces informations est nécessaire à la compréhension des mécanismes d'interaction, de piégeage et de transport des micropolluants du milieu aquatique que nous abordons au Chapitre IV.

C'est dans cette partie de notre étude que nous présentons une approche des interactions de l'ensemble des micro polluants présentés au Chapitre II [(le pyrène (HAP), l'atrazine et la sulcotrione (herbicides), le NPE, SDS et le CTAB (tensio-actifs)] ou avec la matière organique dissoute. La méthodologie mise en oeuvre pour la mise en évidence des interactions avec la matière organique a été identique pour tous les polluants, quelle que soit la fraction humique considérée. Trois techniques principales ont été retenues : pour tous les polluants, des mesures en spectrophotométrie UV/Visible et en spectrofluorimétrie (méthode de l'inhibition de fluorescence de la MO présentée en II.1.1.2) ont été systématiquement réalisées. Pour les polluants à caractère tensio-actif (NPE, SDS et CTAB), des mesures de tension de surface (méthode de Wilhelmy présentée en II.1.3) ont également été réalisées en plus de ces techniques.

Chapitre IV

Interactions des micropolluants avec la
matière organique

Pour cette partie, comme cela a été précédemment détaillé (II.1), nous avons porté notre étude sur 3 types de matière organique dissoute : des solutions d'acides humiques synthétiques (3 fractions AHCG / AHCT1 / AHCT2 caractérisées dans l'ARTICLE I), naturels (AHN1 et AHN2 issus de 2 extractions à partir de MES, caractérisés et comparés aux fractions synthétiques dans l'ARTICLE I) et enfin sur des échantillons d'eau filtrés à 0,2 µm (prélevés pendant les 2 campagnes de recueillement des MES utilisées dans l'extraction des AHN, respectivement désignés comme ER1 et ER2). Pour chaque polluant testé, nous présentons donc les résultats relatifs à ces différentes fractions. Le protocole est le même pour toutes les mesures : nous avons procédé par ajouts dosés en polluant dans des solutions de concentration 10 mg/L en acide humique à pH 8 (sauf pour AHN1 où nous n'avons pu réaliser les essais à 10 mg/L en spectrofluorimétrie, mais à 30 mg/L seulement pour les raisons évoquées au Chapitre II)³⁸.

Nous mentionnons que les teneurs en acide humique des deux prélèvements d'eau n'ont pas été déterminées, seules des mesures de COT ont été réalisées. Les résultats ont été présentés au Chapitre II (II.1.1).

Les spectres UV/Visible ont été réalisés par balayage en absorption entre 200 et 700 nm. Le suivi de la variation des densités optiques pour certains chromophores typiques (*voir après*) et distinguables (absorbants à 270-290 et 330-350 nm³⁹) a été réalisée pour des concentrations croissantes en polluants présentant des interactions avec la MO. Ces deux chromophores sont nommés chromophores A et B. Pour les acides humiques naturels et l'eau de rivière filtrée, nous avons en outre mesuré la longueur d'onde d'absorption à 400 nm⁴⁰. Ce 3^{ème} chromophore a été noté C.

Les solutions contenant des polluants tensio-actifs ont été étudiées en tension de surface à 25°C (cf. Chapitre II pour la préparation des solutions).

³⁸ En raison des effets de filtre interne à 30 mg/L pour AHN2, nous avons préféré réaliser des mesures à 30 mg/L en tension de surface également avec cet acide humique pour avoir des résultats comparatifs avec l'ensemble des fractions plutôt que des mesures d'inhibition de fluorescence à 30 mg/L pour AHN2 en présence de polluants.

³⁹ La longueur d'onde exacte d'absorption considérée correspond au maximum de la bande correspondante et varie suivant les fractions de MO. Elle sera précisée à chaque fois.

⁴⁰ Cette longueur d'onde a été ajoutée aux 2 précédentes, étant donné la présence d'une bande d'absorption supplémentaire à cette longueur d'onde pour les matériaux naturels. La présence du chromophore C est certes moins distinguable sur le spectre d'absorption des eaux de rivière, mais son évolution a toutefois été suivie lors des ajouts de polluants afin de comparer les résultats avec ceux des AHN extraits correspondant à nos 2 prélèvements.

Un suivi du pH, de la conductivité et de la turbidité des solutions a également été réalisé sur les solutions de MO contenant les polluants.

Concernant les essais en spectrofluorimétrie, nous avons travaillé à 2 longueurs d'onde d'excitation (270-290 nm et 320-350 nm ⁴¹) pour les acides humique synthétiques. D'après les notations de Parlanti et al., 2000, nous avons choisi de noter les fluorophores de la façon suivante (correspondant respectivement aux différentes longueurs d'excitation / d'émission données entre parenthèses en nm) : δ (270-290 / 320-330 nm), α' (270-290 / 430-450 nm) et α (320-350 / 420-460 nm).

Les variations des résultats d'inhibition de fluorescence enregistrée ont été considérées comme significatives si les écarts enregistrés lors des ajouts dosés étaient supérieurs en valeur absolue à 2 fois la valeur de l'écart-type calculé pour 10 mesures réalisées sur 10 solutions de chaque fraction d'AH préparées de façon indépendante, et pour les deux longueurs d'onde d'excitation considérées (test de reproductibilité) ⁴².

Enfin, afin d'intégrer les résultats donnés à la fois en spectrofluorimétrie et en absorption UV/Visible de façon quantitative, des représentations des rendements quantiques de fluorescence ⁴³ pour les différents chromophores ont été données pour les polluants interagissant sur le spectre de l'AH.

⁴¹ La longueur d'onde exacte de fluorescence sera précisée dans ce qui suit et a été choisie suivant la position du maximum d'émission de fluorescence enregistré correspondant aussi au maximum des bandes d'absorption distinguables en UV/Visible propres à chaque fraction d'acide humique.

Par ailleurs, l'excitation à 400 nm en fluorescence n'a pas été réalisée, étant donné l'absence de références mentionnant cette composante en solution pour les substances humiques. Cependant, des essais futurs pourraient essayer de caractériser davantage ce chromophore, qui pourrait faire l'objet d'une étude à part.

⁴² Nous devons faire la remarque que nous n'avons pas corrigé la dérive de l'appareil dans le temps entre les différentes séries de polluants considérées (correction sur la valeur de l'intensité de fluorescence à partir d'une solution de référence de fluorescéine), étant donné que l'exploitation quantitative des interactions est basée sur un rapport d'intensités I_0/I . Ceci explique les différences qui peuvent être constatées sur les intensités de fluorescence de la MO entre 2 séries d'ajouts dosés en polluants réalisées pour la même fraction.

⁴³ Voir II.1.1.5. pour la définition générale.

IV.1. Interaction MO/pyrène

IV.1.1. Etude préalable du polluant « pyrène »

Afin de réaliser les essais d'inhibition de fluorescence de la MO avec le pyrène (pris dans ce cas comme inhibiteur), nous devons au préalable vérifier l'absence d'interférence dans nos mesures, car nous utilisons deux composés fluorescents, dont l'un des deux (le pyrène) présente un domaine d'émission de fluorescence proche de celui des AH et un signal environ 10 fois supérieur en intensité (pour une concentration de 10^{-6} M en pyrène) par rapport à celui de la MO.

Comme le montre la Figure IV.1(1), nous avons pu réaliser les mesures d'inhibition de fluorescence en excitant les solutions d'AH contenant le pyrène à 350 nm⁴⁴.

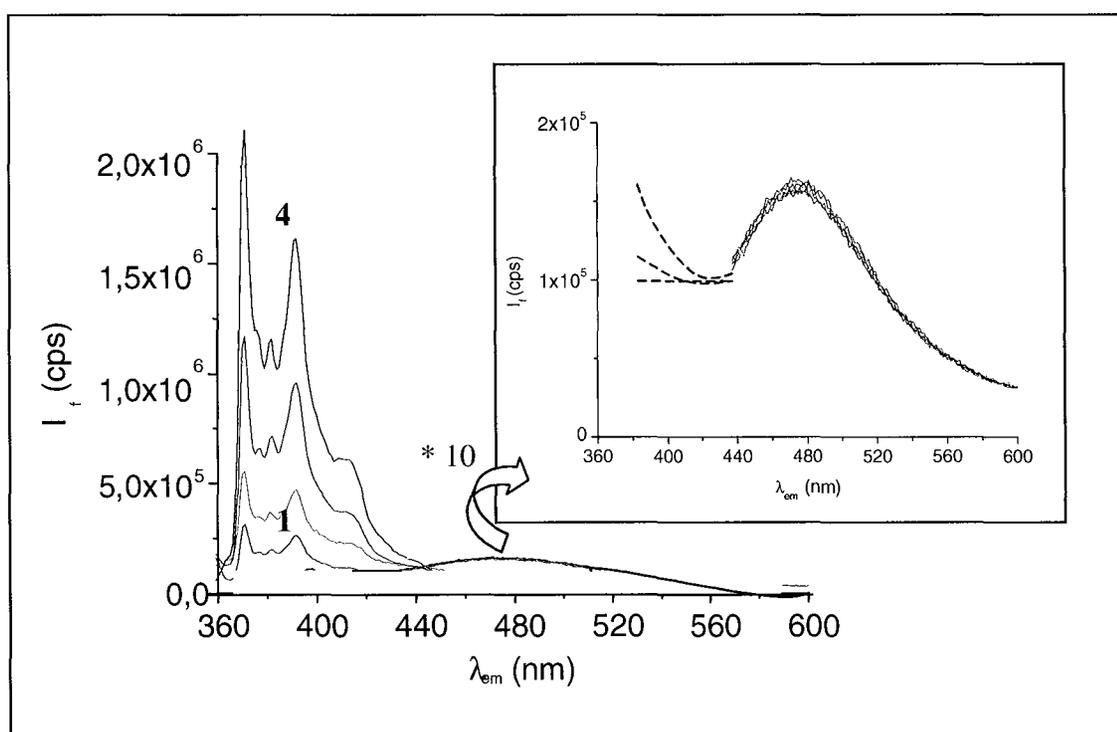


Figure IV.1(1)

Exemple d'absence d'inhibition de fluorescence du signal de la MO (excitation 350 nm) lors d'ajouts dosés en pyrène (10^{-10} (1) à 10^{-6} M(4))
Les spectres de fluorescence présentés dans le zoom sont spécifiques à la MO.

⁴⁴ Aucun essai en excitant à 270 nm n'a été réalisé, étant donné que le signal de fluorescence du pyrène ne peut être distingué de celui de la MO en émission à cette longueur d'onde d'excitation.

IV.1.2. Etudes des solutions « MO + Pyrène »

IV.1.2.1. UV/Visible

Concernant les mesures d'absorption UV/Visible, les essais réalisés ne permettent aucunement de conclure sur une éventuelle interaction entre le pyrène et la MO. Comme le montre la Figure IV.1(2), cette technique permet uniquement de suivre l'évolution de la quantité de pyrène ajoutée au milieu. Les AH absorbant aux mêmes longueurs d'onde que le pyrène, aucune conclusion sur l'interaction pyrène / MO ne peut donc être tirée de ces essais.

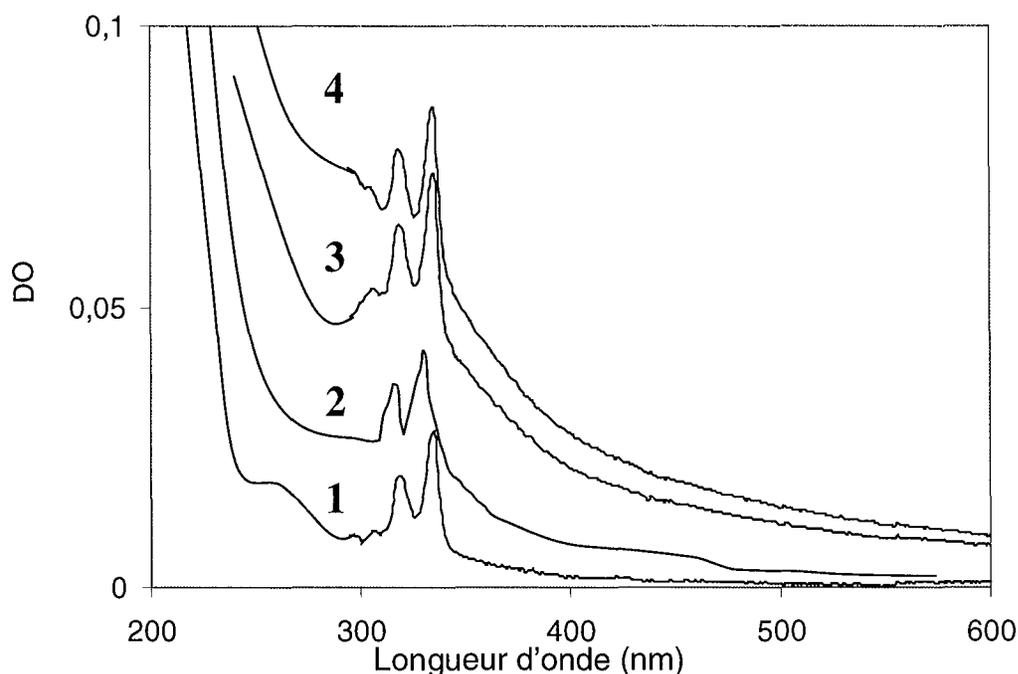


Figure IV.1(2)

Exemple du suivi UV/Visible des ajouts dosés en pyrène dans les solutions de MO (10^{-10} M (1), 10^{-9} M (2), $5 \cdot 10^{-7}$ M (3) et 10^{-6} M (4)).

IV.1.2.2 Inhibition de fluorescence

Les essais réalisés avec toutes les autres fractions d'AH présentent la même évolution que celle représentée sur la Figure IV.1(1): aucune inhibition de fluorescence de la MO en présence de pyrène (dont les concentrations varient entre 10^{-10} et 10^{-6} M) n'est enregistrée.

IV.2. Interaction MO/ atrazine et sulcotrione

IV.2.1. Etude préalable des polluants « atrazine » et « sulcotrione »

IV.2.1.1. UV/Visible

Nous avons mesuré les signaux d'absorption UV/Visible des 2 herbicides seuls en solution aqueuse (Figure IV.2(1)).

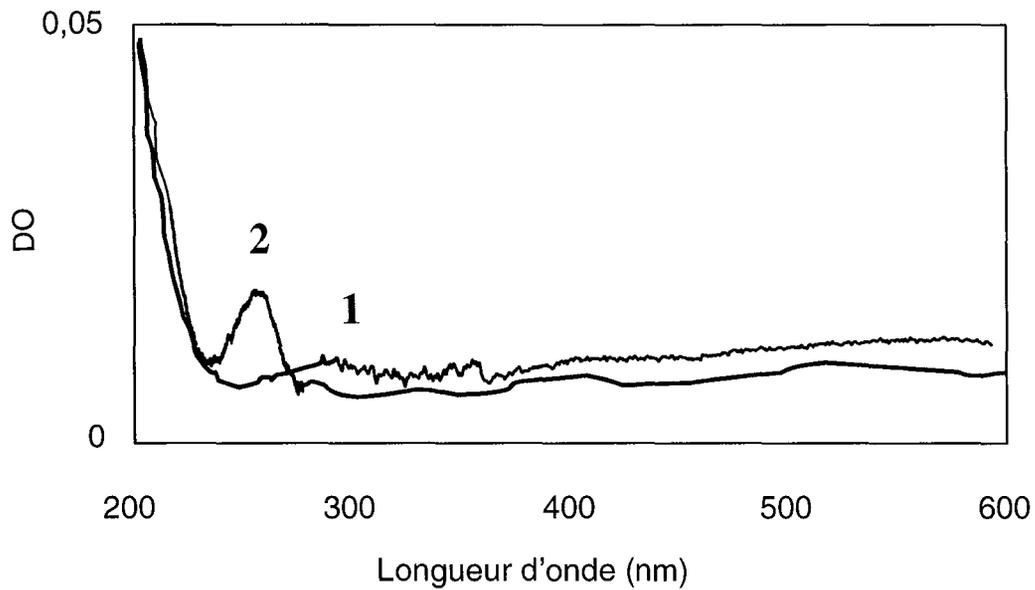


Figure IV.2(1)
Spectres d'absorption UV/Visible de l'atrazine (1) et de la sulcotrione (2)
(à 10 $\mu\text{g/L}$ dans l'eau UP. Parcours optique de 1 cm).

IV.2.1.2. Fluorescence

Aux concentrations de notre étude, nous avons vérifié l'absence de signal de fluorescence significatif (par rapport à celui de la MO) pour ces deux polluants aux longueurs d'onde d'excitation relatives aux différents fluorophores considérés.

IV.2.2. Etudes des solutions « MO + atrazine » et « MO + sulcotrione »

IV.2.2.1. UV/Visible

Les résultats obtenus pour l'ensemble des fractions d'AH et de MON d'eau de rivière présentent une évolution non significative en spectroscopie UV/Visible (Figure IV.2(2)).

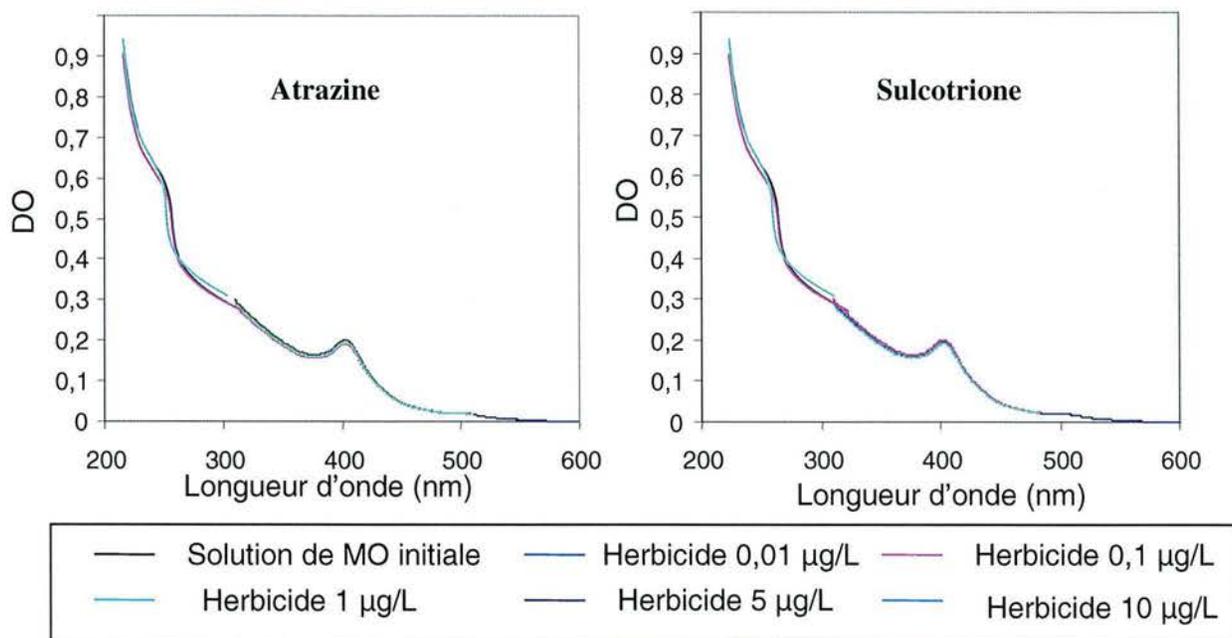


Figure IV.2(2)

Résultats des ajouts dosés en atrazine et sulcotrione dans les solutions de MO (exemple de AHN1).

Au vu de l'absence de modifications significatives des valeurs d'absorbance des solutions de MO contenant les herbicides, il n'y a pas d'interactions mesurables par la mesure de l'absorption de la lumière UV/Visible.

IV.2.2.2. Inhibition de fluorescence

L'analyse par fluorescence montre une quasi absence d'inhibition de fluorescence de la MO en présence des deux herbicides (Figure IV.2(3)).

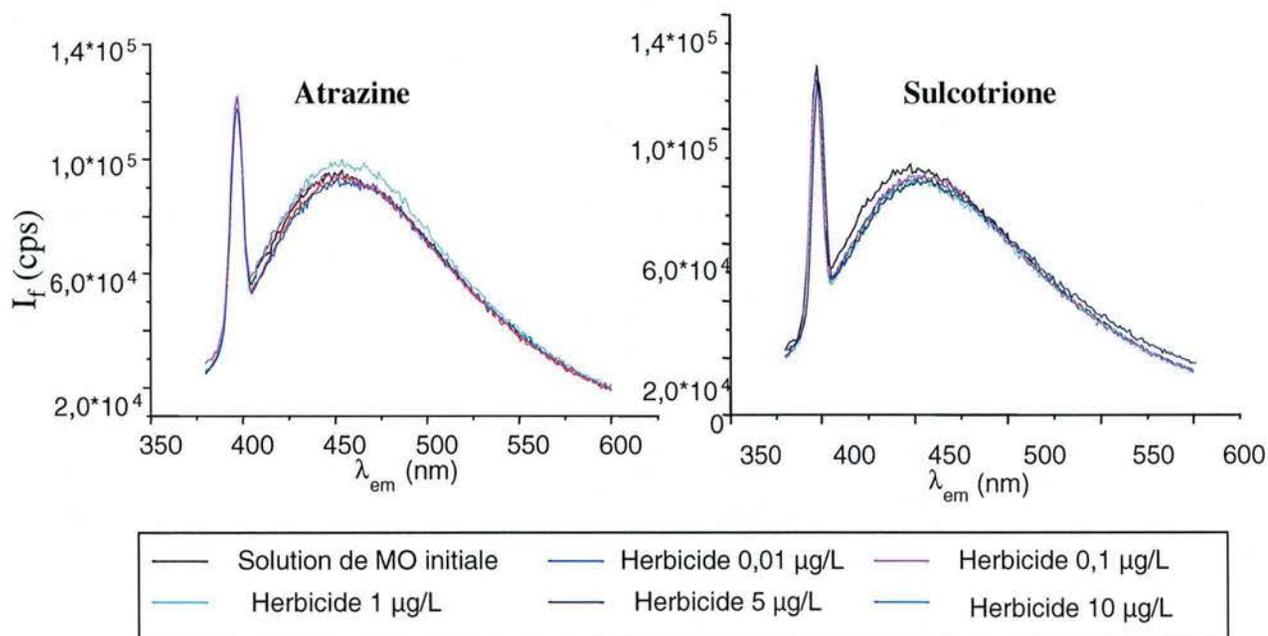


Figure IV.2(3)

Résultats obtenus en spectrofluorimétrie pour des ajouts dosés d'atrazine et de sulcotrione dans les solutions de MO (exemple pour le fluorophore α de AHNI).

Cette absence de modification dans les caractéristiques de fluorescence de la MO nous a fait conclure en l'absence d'interaction détectée par fluorescence.

IV.3. Interaction MO/NPE

IV.3.1. Etude préalable du polluant « NPE »

IV.3.1.1. UV/Visible

Pour le NPE, nous retrouvons les bandes d'absorption caractéristiques des noyaux benzéniques (254 nm) et des phénols (270 nm) (Figure IV.3(1)).

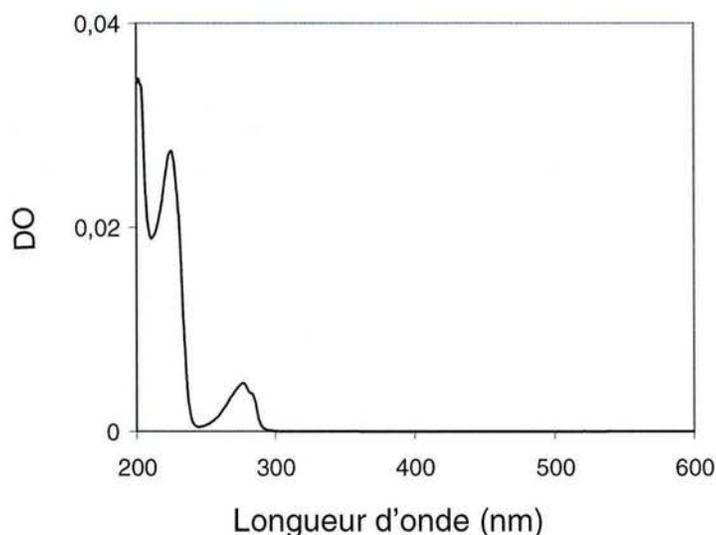


Figure IV.3(1)
Spectre d'absorption UV/Visible du NPE ($10^{-3}M$ dans l'eau UP).

IV.3.1.2. Fluorescence

Le NPE présentant un signal de fluorescence non négligeable pour une longueur d'onde d'excitation de 270 nm en comparaison de celui de la MO, nous n'avons pas effectué d'essais d'inhibition de fluorescence à cette longueur d'onde (Figure IV.3(2)).

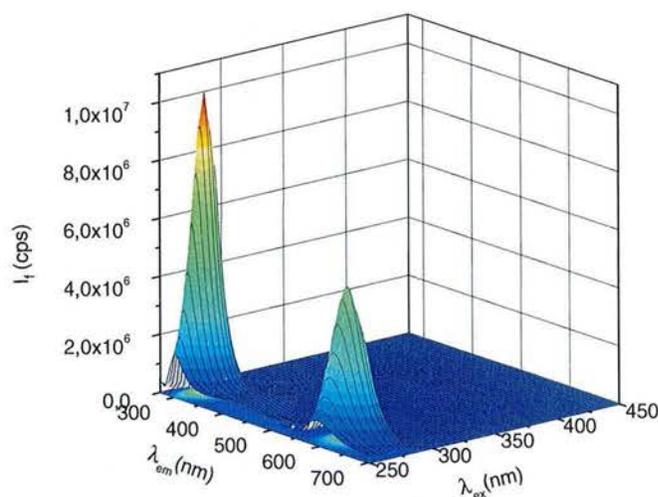


Figure IV.3(2)
Matrice d'excitation/émission du NPE.

Pour ce polluant, nous avons seulement procédé aux mesures de fluorescence en excitant le milieu à 330-350 nm en présence de MO.

IV.3.2. Etudes des solutions « MO + NPE »

IV.3.2.1. UV/Visible

La Figure IV.3(3) présente une série de courbes obtenues pour les fractions de MO en présence de NPE à différentes concentrations.

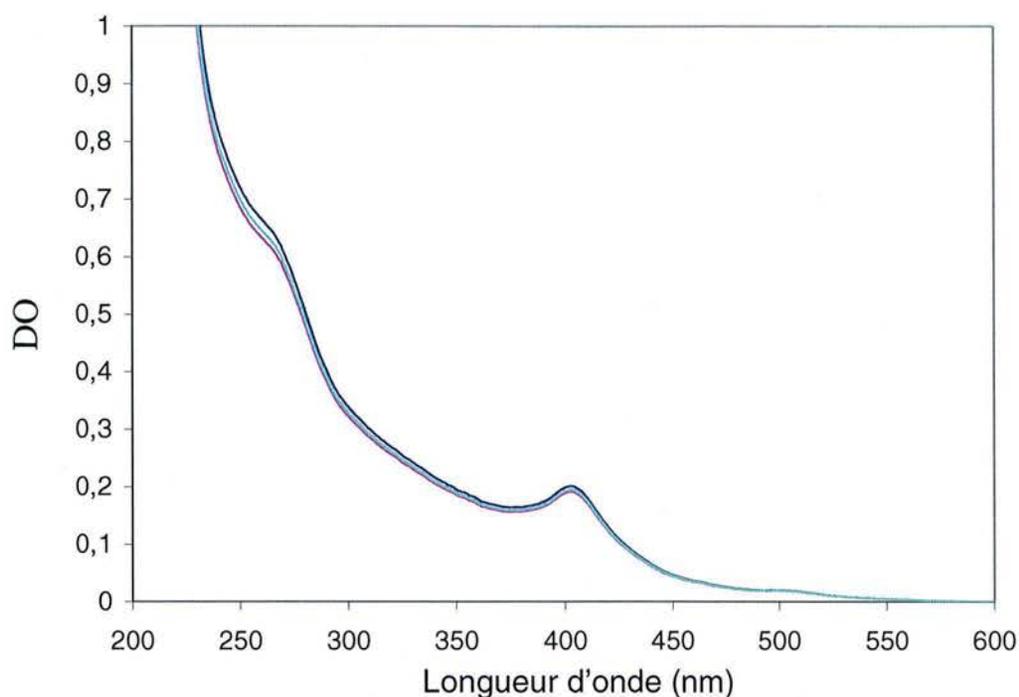


Figure IV.3(3)

Résultats obtenus en absorption UV/Visible pour les ajouts dosés en NPE (de 10^{-3} à $1,5$ CMC) dans les solutions de MO ($CMC_{NPE} = 6,3 \cdot 10^{-5} M$).

Aucun complexe absorbant dans l'UV ou le visible entre le NPE et la MO n'est donc mis en évidence.

IV.3.2.2. Inhibition de fluorescence

A la longueur d'onde d'excitation choisie, soit 330-350 nm, aucune inhibition significative n'a été observée (Figure IV.3(4)), quelle que soit la nature de la fraction de MO choisie.

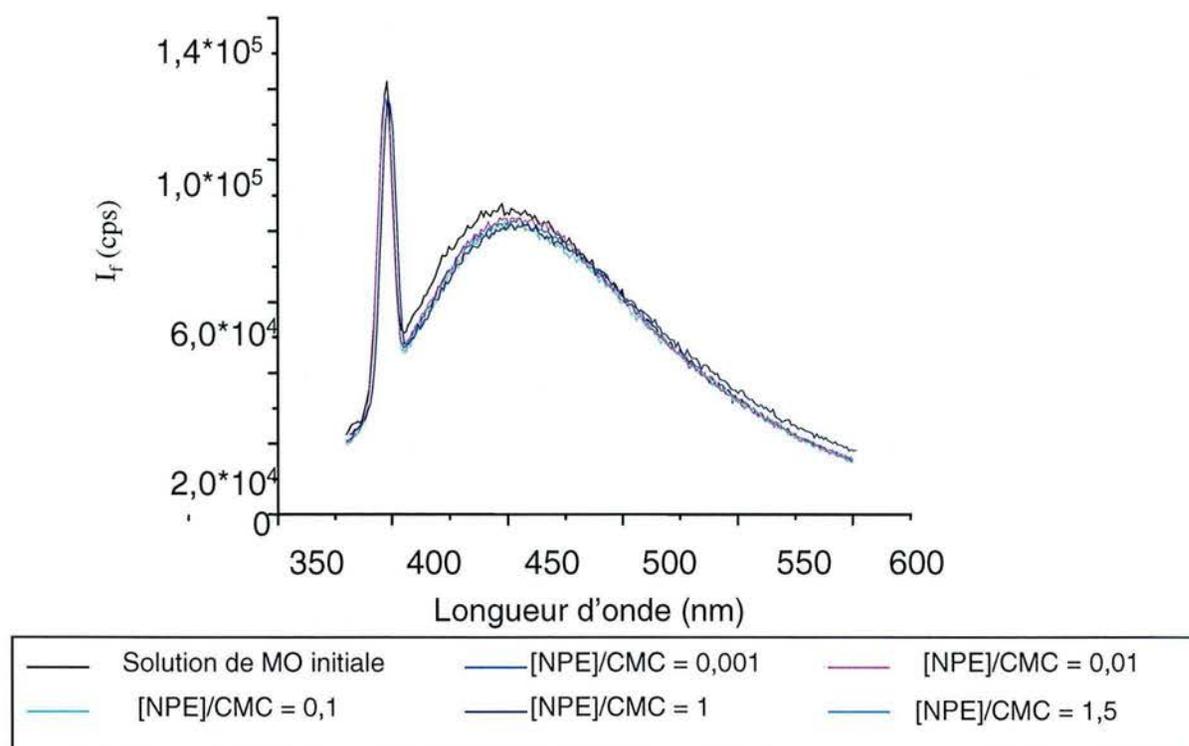


Figure IV.3(4)
Résultats des ajouts dosés en NPE (de 10^{-3} à $1,5$ CMC)
sur le signal de fluorescence de la MO.

IV.3.2.3. Tension de surface⁴⁵

Dans un premier temps, des essais utilisant la méthode de Wilhelmy ont été effectués avec le NPE seul. Nous avons retrouvé la valeur théorique de concentration micellaire critique (CMC) donnée par le fabricant (Sigma Aldrich, Lyon, France) pour le tensio-actif seul : $CMC_{NPE} = 6,3 \cdot 10^{-5}$ M.

Nous avons ensuite procédé aux ajouts dosés en NPE dans les solutions de MO. Un léger écart dans la courbe déterminée pour le NPE seul, constant pour l'ensemble des fractions humiques, a été décelé en présence de MO à concentration constante à pH 8 (Figure IV.3(5)).

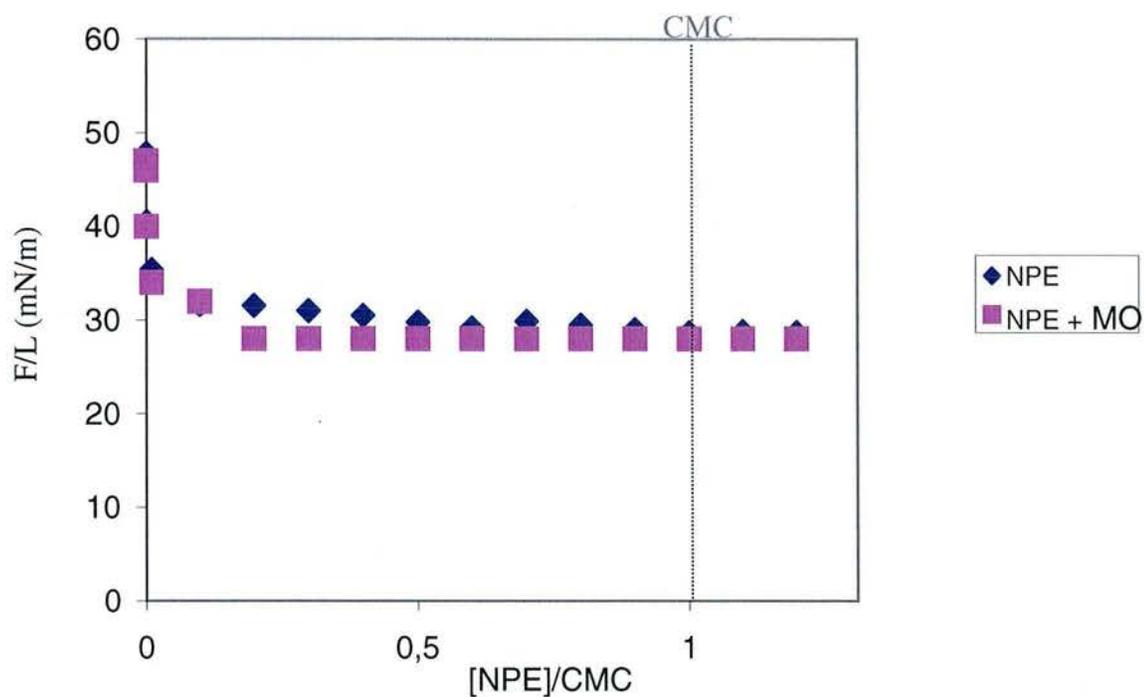


Figure IV.3(5)
Mesures de tension de surface des solutions de MO en présence de NPE.

L'interface est donc majoritairement dominée par les seuls effets du tensio-actif : une association significative entre la MO et le NPE à l'interface semble à écarter.

⁴⁵ Pour le NPE, aucune variation de turbidité ni de conductivité (par rapport au tensio-actif seul) n'a été mesurée dans les solutions préparées avec les acides humiques.

IV.4. Interaction MO/SDS

IV.4.1. Etude préalable du polluant « SDS »

IV.4.1.1. UV/Visible

Le spectre d'absorption UV/Visible du SDS est présenté sur la Figure IV.4(1).

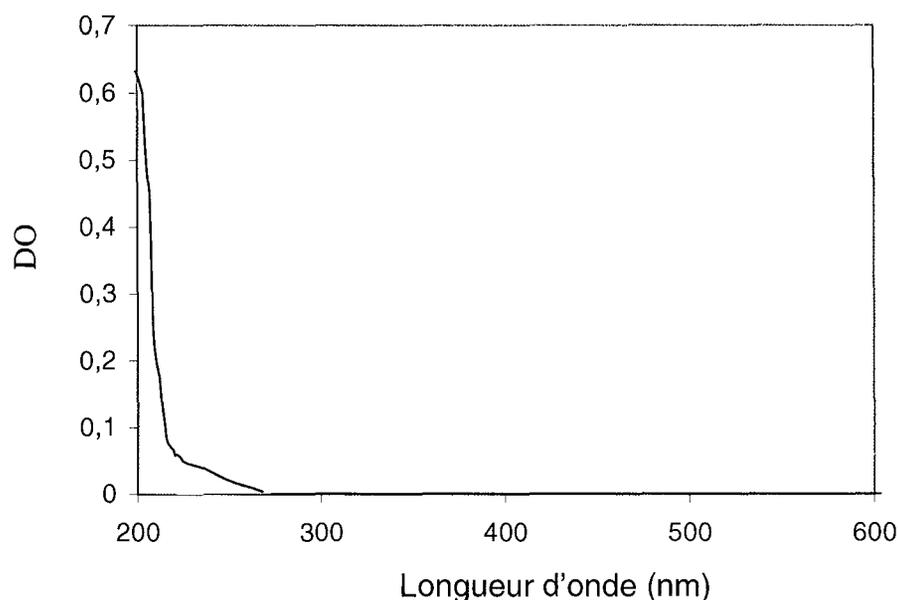


Figure IV.4(1)
Spectre d'absorption UV/Visible du SDS ($1,2 \cdot 10^{-2} M$) dans l'eau.

IV.4.1.2. Fluorescence

Le SDS ne présente aucun signal en émission de fluorescence à toute longueur d'onde d'excitation.

IV.4.2. Etude des solutions « MO + SDS »

IV.4.2.1. UV/Visible

Les fractions de MO présentant des modifications dans leurs spectres d'absorption UV/Visible en présence de SDS ont été l'eau de rivière ER1 et l'acide humique naturel AHN1. Nous avons dans ce cas également donné les résultats pour ER2 et AHN2 (Figure IV.4(2)) afin de permettre une comparaison effective entre nos prélèvements.

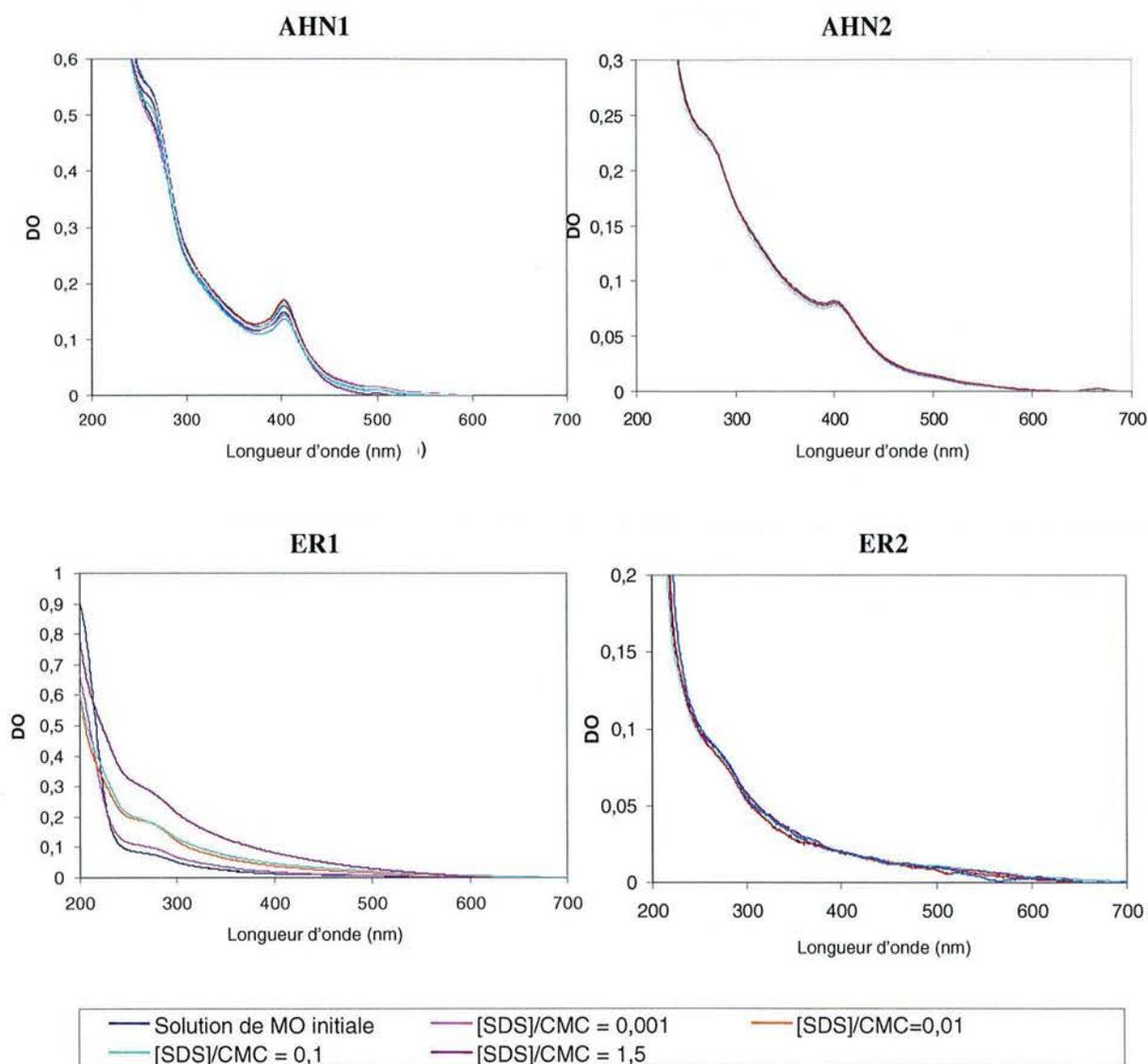


Figure IV.4(2)
Interaction UV/Visible entre le SDS et la MO (AHN1, AHN2, ER1, ER2).

Les variations des densités optiques pour les 3 chromophores A, B et C considérés sont représentées sur la Figure IV.4(3).

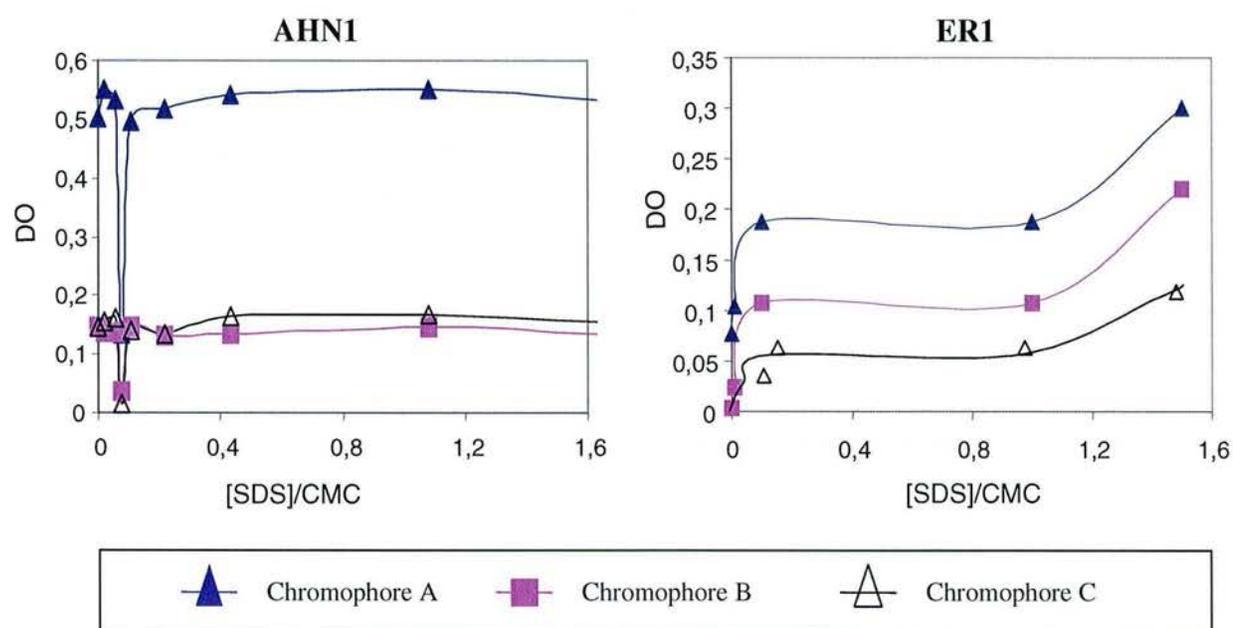


Figure IV.4(3)
Variations des densités optiques des 3 chromophores A (270-290 nm), B (330-350 nm) et C (400 nm) pour les solutions de MO (AHN1 et ER1) en présence de SDS.

L'évolution la plus importante est notée pour l'eau de rivière ER1, dont les 3 chromophores A, B et C sont fortement affectés par la présence de SDS : une augmentation rapide des densités optiques dès les plus faibles concentrations en SDS (< à 0,2 [SDS]/CMC) est visible. L'interaction mise en évidence par UV/Visible traduit la formation d'un complexe entre le SDS et la matière organique.

IV.4.2.2. Inhibition de fluorescence

En spectrofluorimétrie, seules les fluorescences de ER1 et AHN1 sont affectées par l'ajout de SDS (Figure IV.4(4) et Figure IV.4(5)).

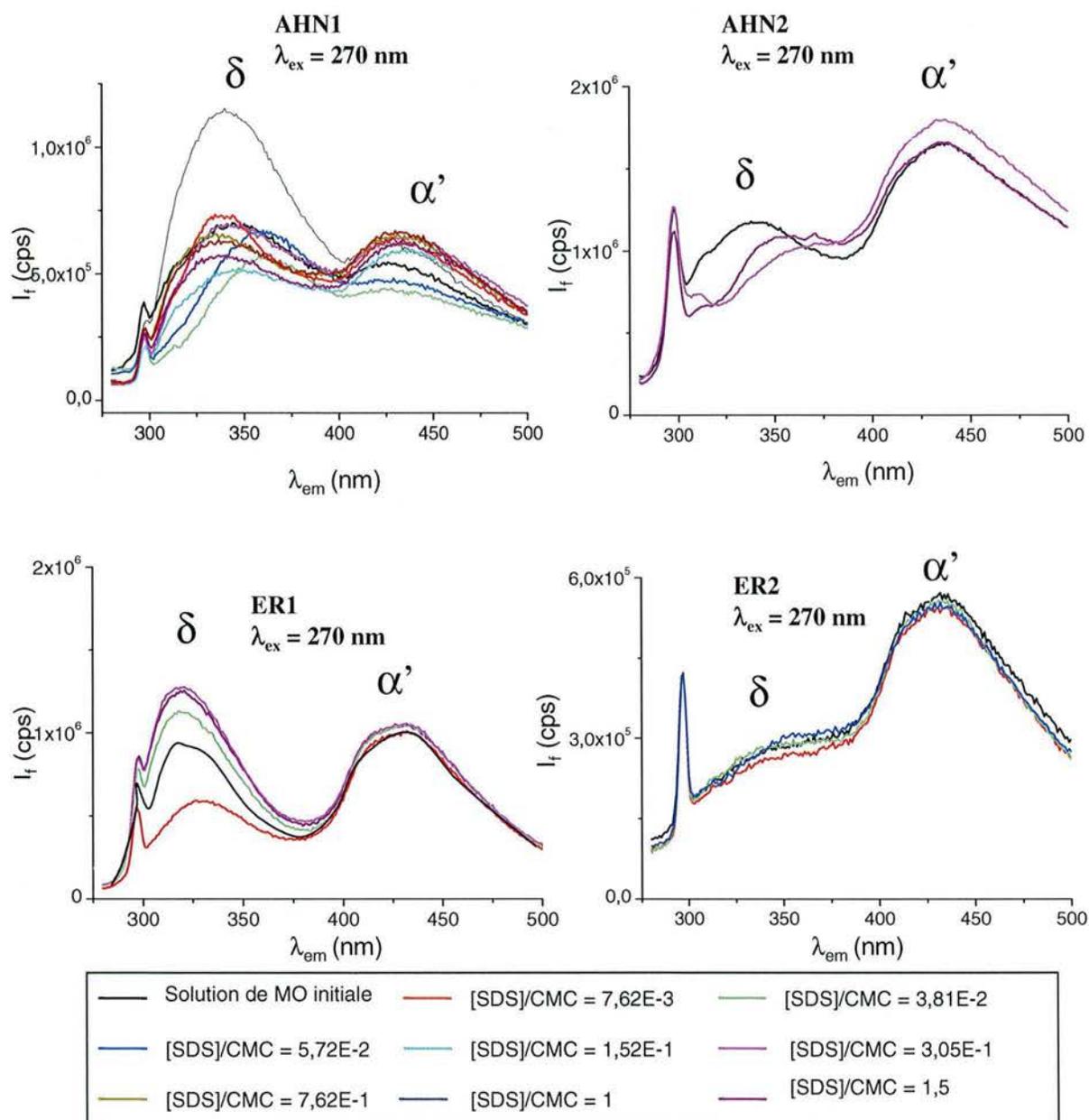


Figure IV.4(4)

Inhibition de fluorescence (fluorophore δ et α') des solutions de MO (AHN1, AHN2, ER1, ER2) en présence de SDS.

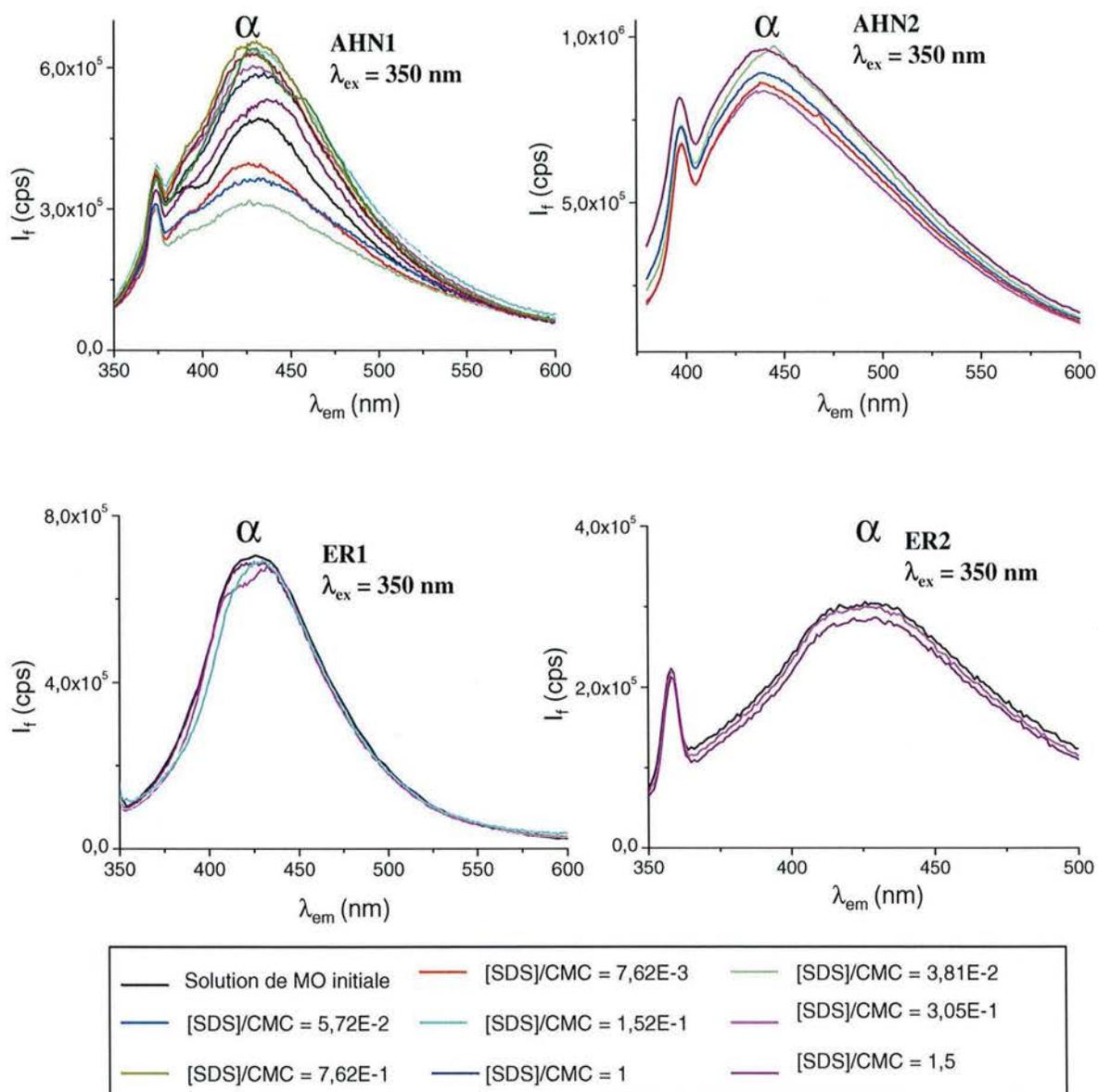


Figure IV.4(5)

Inhibition de fluorescence (fluorophore α) des solutions de MO (AHN1, AHN2, ER1, ER2) en présence de SDS.

Pour ER1, nous constatons que les composantes α et α' (humiques) sont assez faiblement affectées par la présence de SDS. Pour AHN1, l'inhibition de α et δ est quantifiable de façon significative et nous pouvons tracer les représentations de Stern-Volmer associées à ces 2 fluorophores (Figure IV.4(6)).

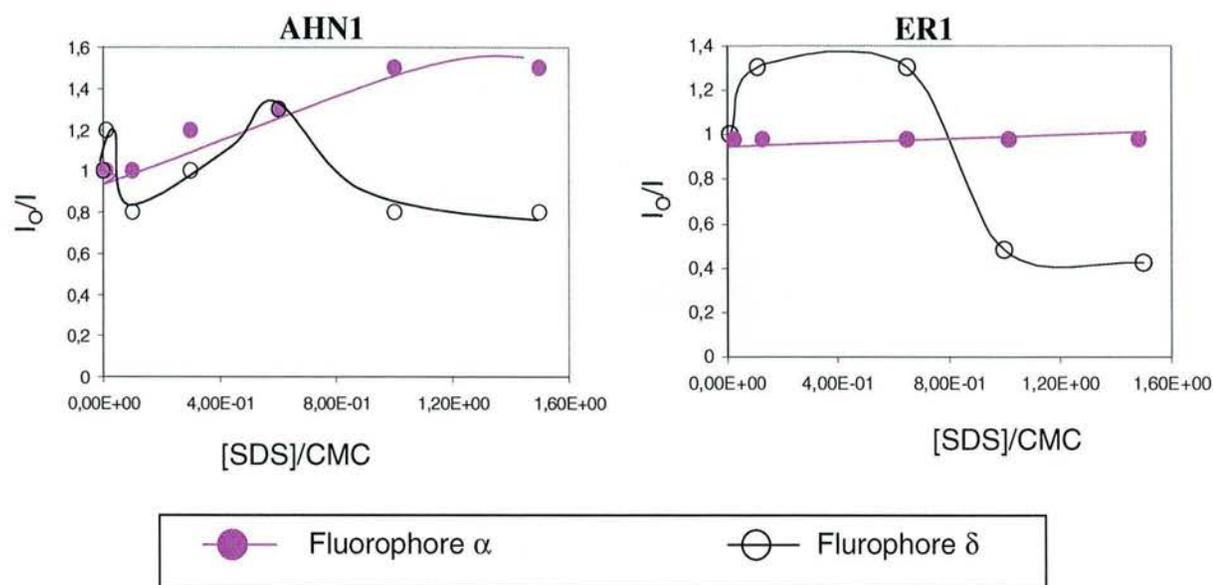


Figure IV.4(6)

Analyse de Stern-Volmer pour les solutions de MO (AHN1 et ER1) en présence de SDS.

Pour ER1, l'inhibition de fluorescence est linéaire pour le fluorophore α . La composante δ (tryptophane, protéique ou phénolique suivant les auteurs, cf. I.3.2) est affectée dans l'eau de rivière et les deux acides humiques naturels, mais de façon plus aléatoire. Pour l'acide humique AHN1, on constate 2 étapes : le signal de fluorescence est tout d'abord fortement inhibé dès l'ajout de faible quantité de SDS ($[SDS]/CMC < 0,1$). Cependant, les espèces fluorescentes ne semblent pas changer de nature (position constante du maximum d'émission). Au-delà de ces concentrations, on assiste à un déplacement du maximum d'émission de fluorescence de plus de 20 nm vers les grandes longueurs d'onde. Ce phénomène peut être attribué à la formation de nouvelles espèces (ou d'états excités triplets) en solution ou à un phénomène « d'émulsion » en solution entre les phases « SDS » et molécules organiques pouvant révéler ou au contraire bloquer la résonance électronique des structures liées à leur fluorescence (parties phénoliques notamment).

Les modifications du fluorophore δ sont particulièrement bien visibles sur les représentations tridimensionnelles des matrices EEM (Excitation Emission Matrices) données sur la Figure IV.4(7). Le phénomène d'émulsion que nous avons mentionné peut être justifié

par la révélation du fluorophore « protéique », particulièrement visible pour $[SDS] = 1,5 \text{ CMC}$, donc bien au-delà de la concentration micellaire critique du tensio-actif.

Solution de MO (ER1) initiale

$[SDS] = 8.10^{-3} \text{ CMC}$

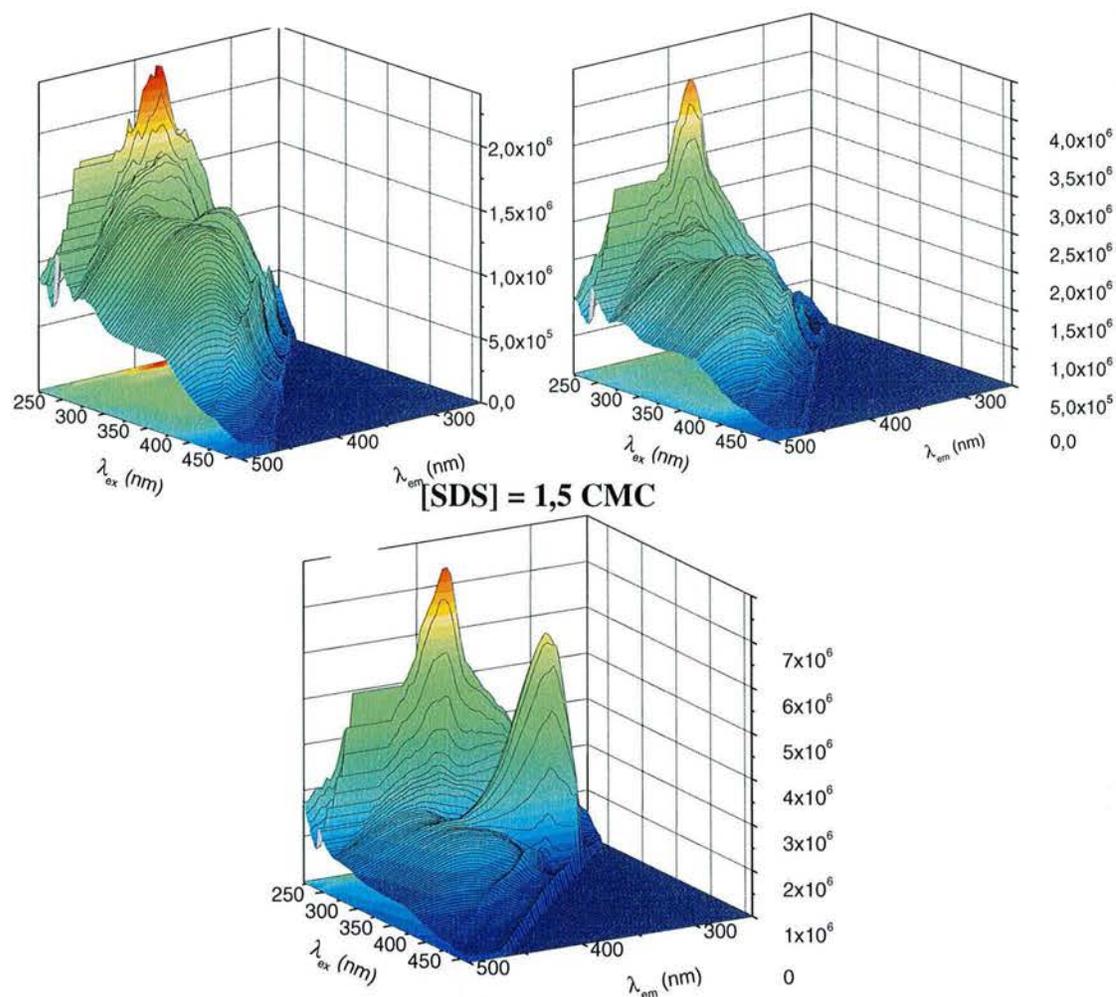


Figure IV.4(7)

Matrices EEM (Excitation-Emission) de ER1 en présence de SDS.

IV.4.2.3. Rendements quantiques de fluorescence

Comme nous l'avons précisé en introduction, ces courbes permettent d'avoir une estimation de l'évolution photophysique quantitative des phénomènes d'interaction en présence. Nous rappelons que le rendement quantique de fluorescence définit le nombre total de photons émis par le système par rapport au nombre de photons absorbés. Ce paramètre prend donc en compte à la fois les données d'absorption d'UV/Visible et celles d'émission de fluorescence. Les courbes des rapports des rendements quantiques ϕ_f ⁴⁶ des solutions

⁴⁶ cf. Equation III.1(1) du Chapitre III avec ici $aire/aire_0$ proportionnel à I/I_0 de l'analyse de Stern-Volmer.

« MO + SDS » par rapport au rendement quantique initial ϕ_0 ⁴⁶ (solution de MO) pour les deux principaux chromophores relatifs à notre étude sont représentées sur la Figure IV.4(8), pour les fractions de MO présentant une interaction notable avec le SDS (AHN1 et ER1).

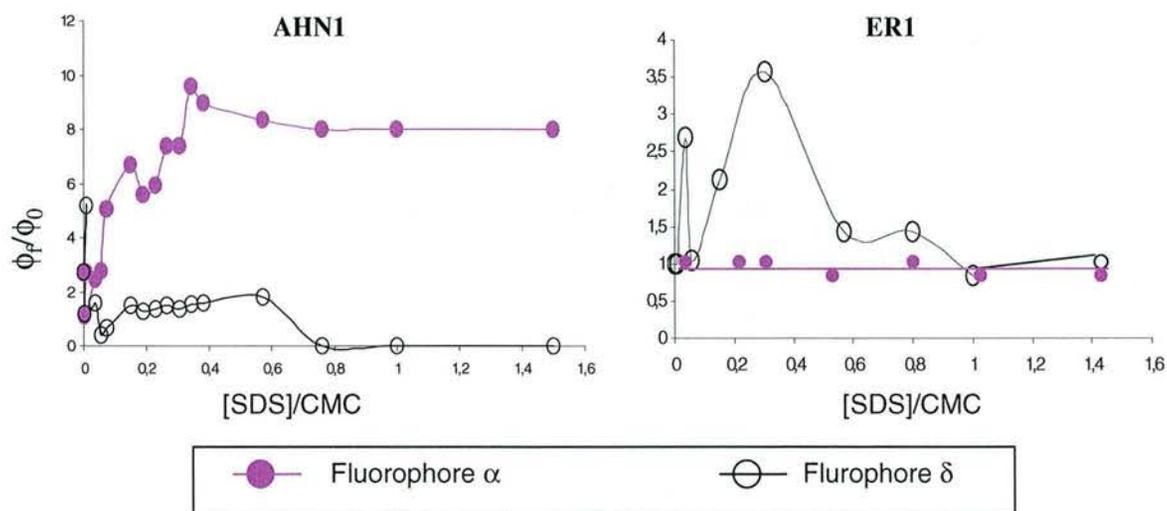


Figure IV.4(8)

Rendements quantiques de fluorescence pour les fluorophores α et δ des solutions de MO (AHN1 et ER1) en présence de SDS.

Pour le fluorophore δ , des phénomènes transitoires apparaissent pour des concentrations inférieures à environ 0,6 CMC. En effet, les rendements quantiques pour les 2 échantillons se stabilisent au-delà de 0,6 CMC : pour l'eau de rivière ER1, le rendement quantique du système final est identique à celui initialement présent en solution, alors que pour AHN1, le système est globalement 10 fois plus énergétique ($\phi_f/\phi_0 = 10$).

IV.4.2.4. Conductivité ⁴⁷

La Figure IV.4(9) montre l'évolution de la conductivité des solutions MO-SDS comparée à celle du tensio-actif seul en solution.

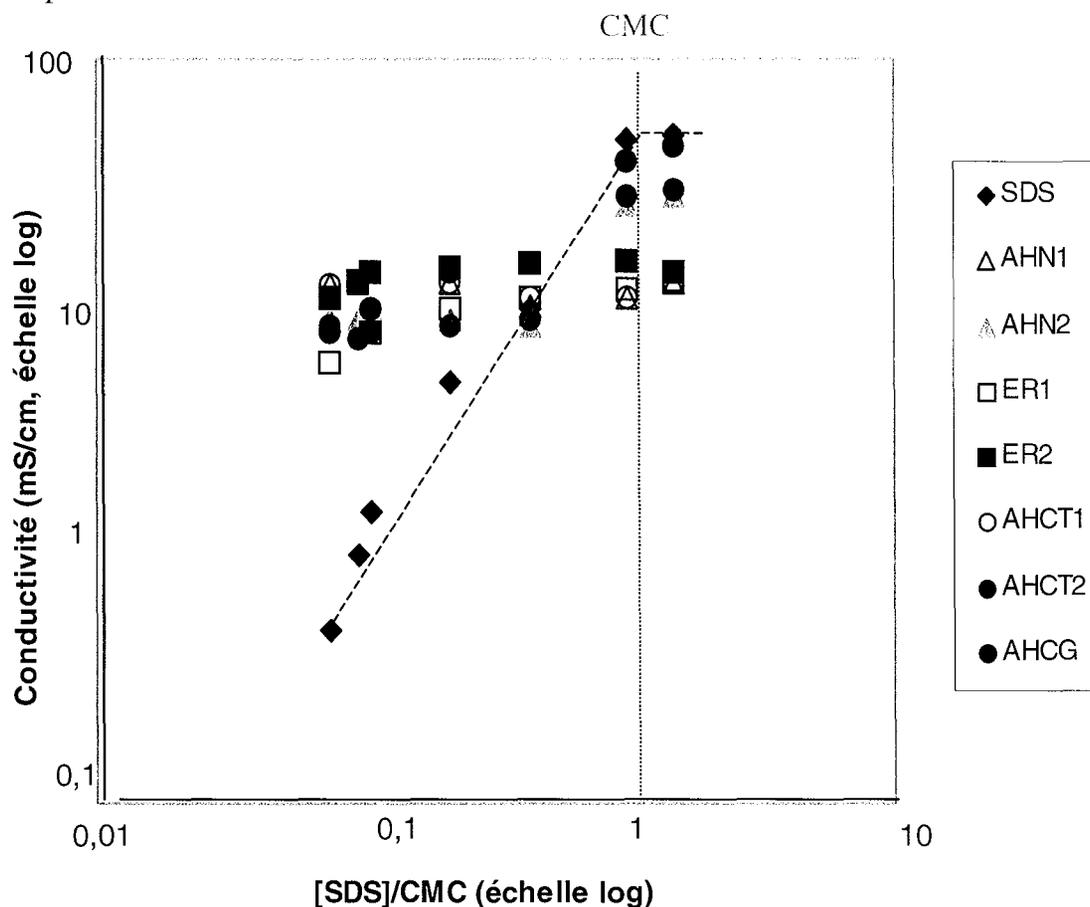


Figure IV.4(9)
Evolution de la conductivité des solutions de MO contenant le SDS.

Les acides AHN2, AHCT2 et AHCG présentent une augmentation significative de leur conductivité après la CMC du SDS, alors que pour les autres solutions de MO considérées (AHN1, AHCT1, eaux de rivière ER1 et ER2), elle restent constantes.

Pour toutes les fractions « MO + SDS », avant la CMC, comme la valeur de conductivité n'évolue pas de façon significative, nous pouvons penser que les molécules tensio-actives ajoutées restent pour une partie sous forme de monomères « libres » en solution, le reste interagissant avec les molécules d'acides humiques, mais globalement, le système est en « sous-saturation » par rapport au SDS seul. Ce sont essentiellement les

⁴⁷ Aucune variation de turbidité des échantillons n'a été mesurée avec le SDS. La turbidité reste constante à la valeur initiale des suspensions d'acide humique seul en solution.

évolutions de conductivité au-delà de la CMC qui permettent de comparer les effets des différents types de MO vis-à-vis de l'association avec le SDS :

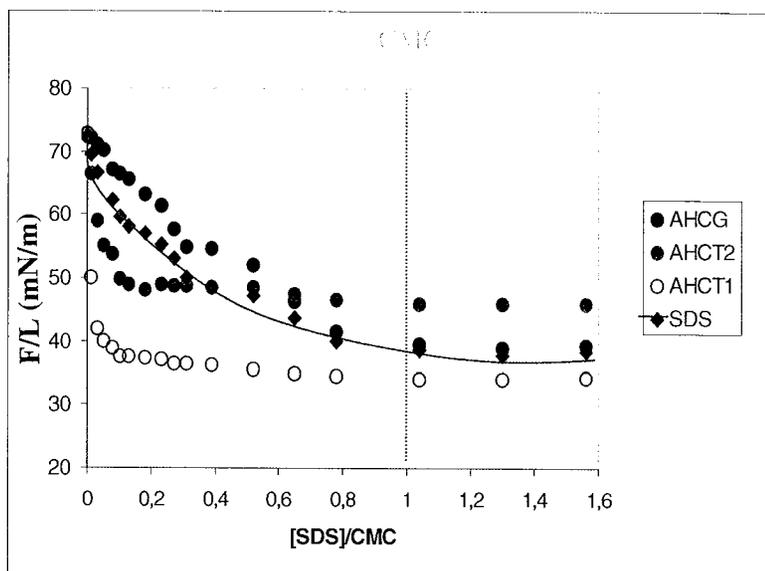
1. Pour les acides AHN2, AHCT2 et AHCG, l'augmentation de la conductivité est « parallèle » à celle constatée pour le tensio-actif seul en solution. Pour ces 3 fractions, l'association avec le SDS est donc plus faible que pour les autres fractions.
2. Pour les autres fractions AHN1, AHCT1 et les 2 eaux de rivière ER1 et ER2, au-delà de la CMC, les valeurs de conductivité en solution restent constantes. Ces fractions continuent de structurer l'interface aux plus fortes concentrations en SDS.

L'interprétation que nous donnons ici va de pair avec les résultats de tension de surface décrits ci-après.

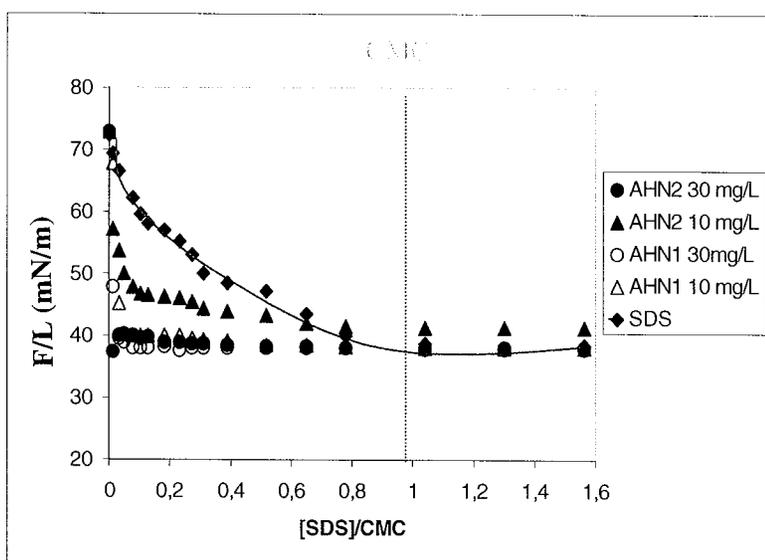
IV.4.2.5. Tensions de surface

La courbe obtenue pour le SDS seul (Figure IV.4(10)) permet de donner une valeur de sa CMC proche de la valeur théorique reportée dans la littérature (Adamson, 1990) : $CMC_{SDS} = 8.10^{-3} M$.

1



2



3

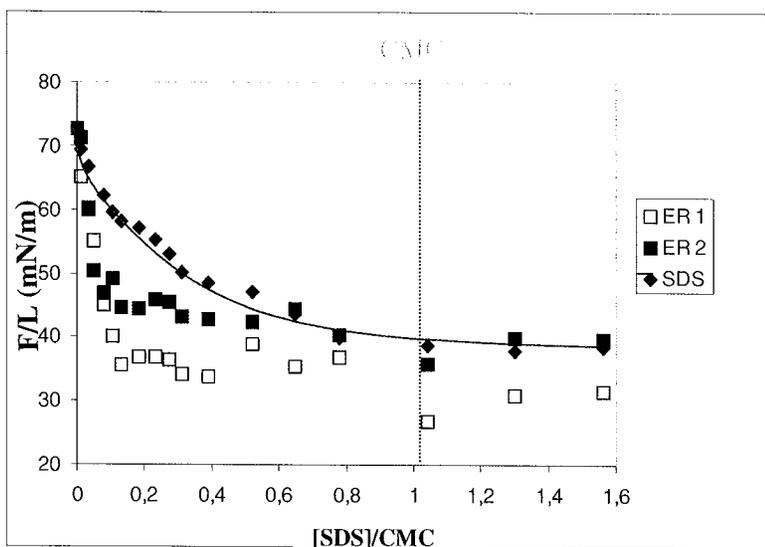


Figure IV.4(10)

Mesures des tensions de surface pour les ajouts dosés de SDS dans les solutions de MO (1 : substances synthétiques ; 2 : substances naturelles à 2 concentrations 10 et 30 mg/L ; 3 : eaux de rivière).

Les évolutions de tension de surface en fonction d'une concentration croissante en SDS dans les milieux sont différentes suivant le type de MO considéré, et ce de façon significative :

1. Pour l'ensemble des fractions, la tension de surface des solutions diminue quand la concentration en SDS dans le milieu augmente, ceci traduisant une augmentation de la teneur en groupements hydrophobes (type chaînes alkyles) à l'interface liquide/air.
2. Les valeurs des tensions de surface mesurées restent inférieures à celles enregistrées pour le tensio-actif seul en solution, exception faite de la fraction AHCG. Nous pouvons en conclure que cette dernière fraction va interagir avec les monomères de tensio-actif de façon à les contraindre à exposer une plus faible partie de leur chaîne hydrocarbonée hydrophobe dans l'air ou permettre de garder des tensio-actifs en solution. A l'opposé, les autres fractions d'acide humique vont agir en synergie avec le SDS pour permettre une plus grande concentration de molécules de tensio-actif à l'interface (Figure IV.4(11)). L'interaction entre le SDS et la MO à l'interface air/solution peut ainsi être représentée de la façon suivante :

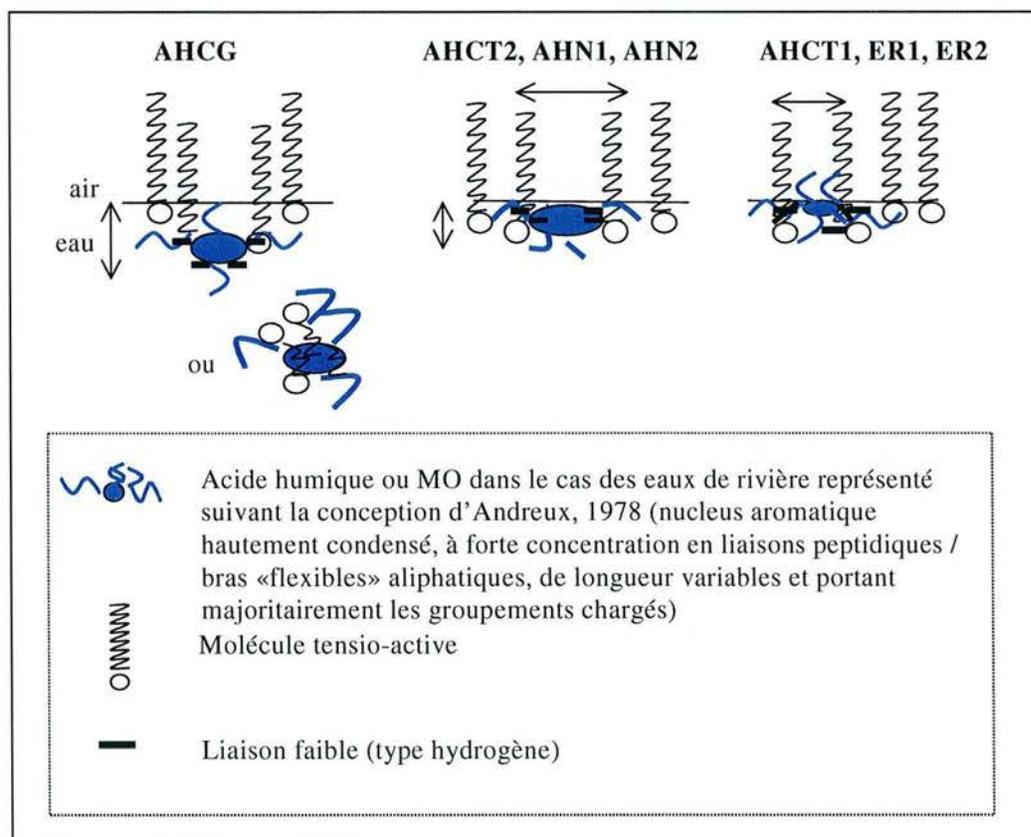


Figure IV.4(11)
Représentation de l'interaction entre le SDS et la MO à l'interface air/solution.

Ainsi, le système MO/SDS devient globalement plus tensio-actif que le tensio-actif seul en solution. Les effets vont être différents suivant le rapport « noyau aromatique » sur « chaînes aliphatiques » et vont expliquer les forces latérales et verticales ramenant les molécules de matière organique de façon plus ou moins importante à l'interface. Les molécules d'AHCG, globalement plus condensées que les autres fractions d'AHCT synthétiques vont être plus difficilement « ramenées » à l'interface eau/air. Si l'on compare les résultats obtenus pour les molécules synthétiques (Figure IV.4(9)), nous constatons que l'effet tensio-actif est plus marqué pour les petites molécules d'AHCT par rapport aux plus grosses. Nous pensons que les petites molécules, globalement plus chargées (cf. Tableau 1 de l'ARTICLE I), et plus hydrophiles, doivent subir un phénomène supplémentaire de reconfiguration lors de leur interaction avec le SDS. En effet, au vu la valeur du plateau final atteint en tension de surface (inférieure à celle du SDS), nous pouvons penser que la structuration de l'interface permet sans doute l'émergence d'un plus grand nombre de parties hydrophobes dans l'air (appartenant notamment aux substances humiques). Les eaux de rivière (et particulièrement ER2) contiennent des substances dont les propriétés à l'interface sont à rapprocher de cette dernière fraction. Enfin, les acides humiques naturels sont également « ramenés » vers l'interface par le SDS, et ce dès les plus faibles teneurs en tensio-actif, sans pour autant apporter de contribution importante de la part de leur parties hydrophobes (palier final rejoignant celui du SDS). L'effet de la concentration va renforcer le phénomène que nous venons d'expliquer.

Des résultats obtenus en flottation de minéraux utiles présentent des résultats similaires. Rao et Forssberg, 1993, ont étudié le comportement de collecteurs cationiques (amines) et anioniques (SDS) dans le procédé de séparation du feldspath à partir de minerai de quartz. Ils ont montré que les complexes formés entre ces deux types de collecteurs pouvaient globalement augmenter l'activité de surface (diminution de la tension superficielle à l'interface eau/air) et améliorer le rendement d'extraction final. Il peut donc exister un pareil phénomène de synergie entre les molécules de SDS et celles de matière organique à l'interface eau/air.

IV.5. Interaction MO/CTAB

IV.5.1. Etude préalable du polluant « CTAB »

IV.5.1.1. UV/Visible

Le spectre d'absorption UV/Visible du CTAB est présenté sur la Figure IV.5(1).

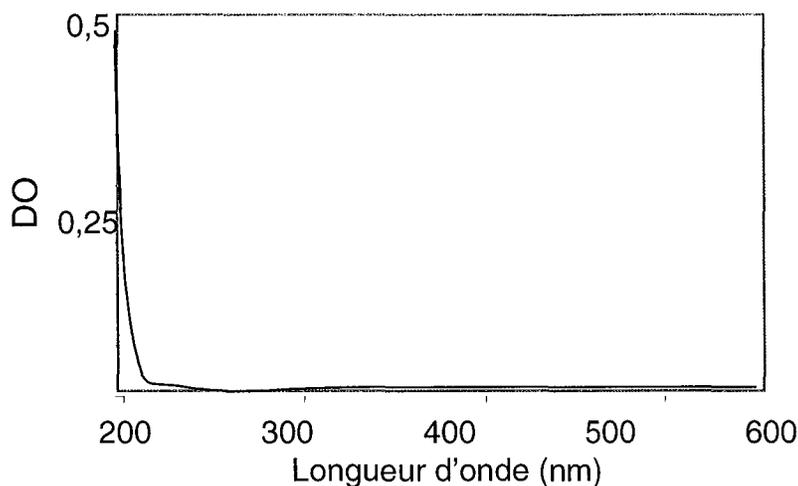


Figure IV.5(1)
Spectre UV/Visible du CTAB.

IV.5.1.2. Fluorescence

Le CTAB ne présente aucun signal en émission de fluorescence quelle que soit la longueur d'onde d'excitation considérée.

IV.5.2. Etude des solutions « MO + CTAB »

IV.5.2.1. UV/Visible

Les spectres d'absorption UV/Visible obtenus pour les solutions de MO en présence de CTAB ainsi que les évolutions des densités optiques des 3 principaux chromophores sont données respectivement dans les Figures IV.5(2) et IV.5(3).

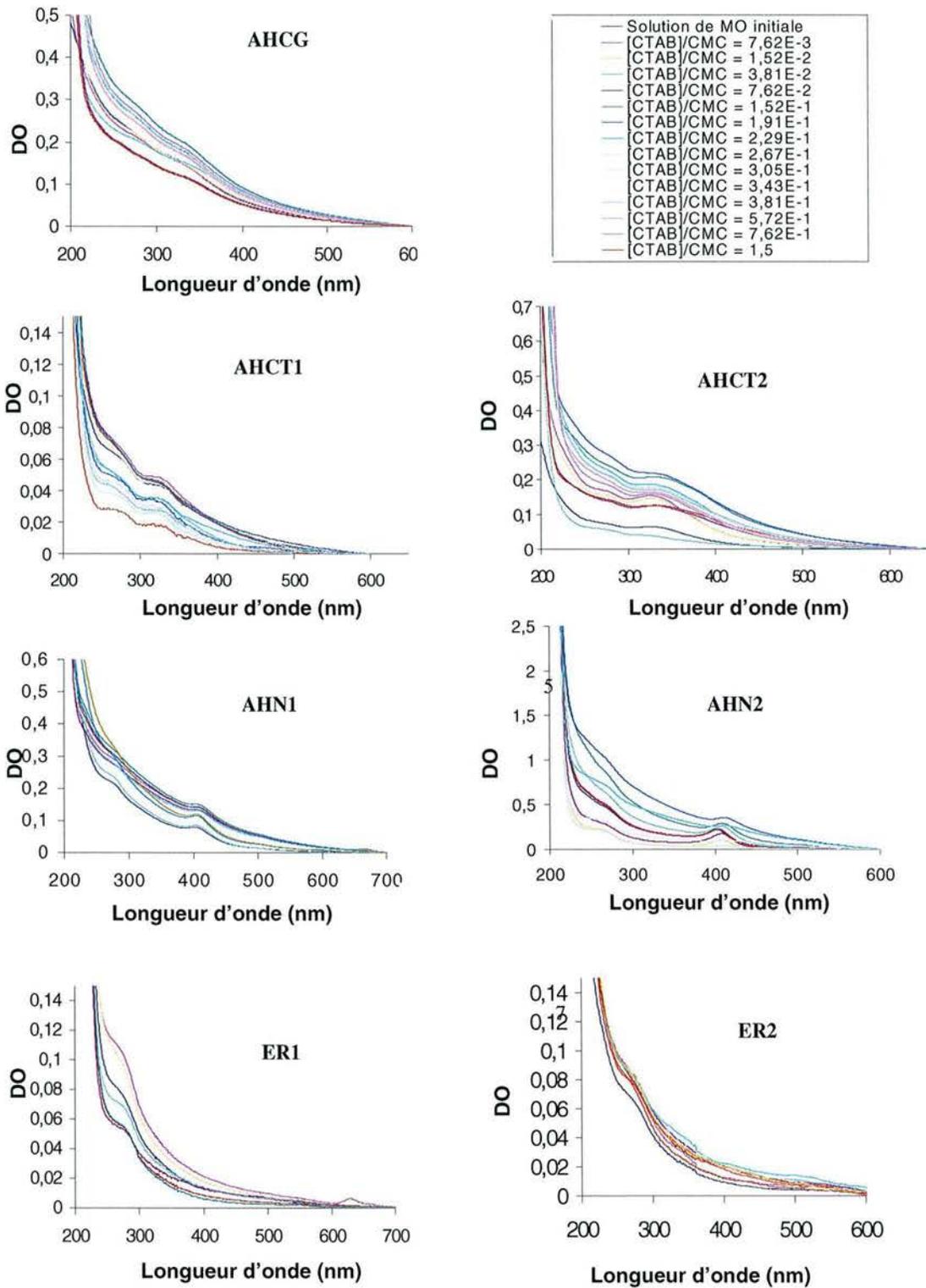


Figure IV.5(2)
Variations des spectres UV/Visible des solutions de MO en présence de CTAB.

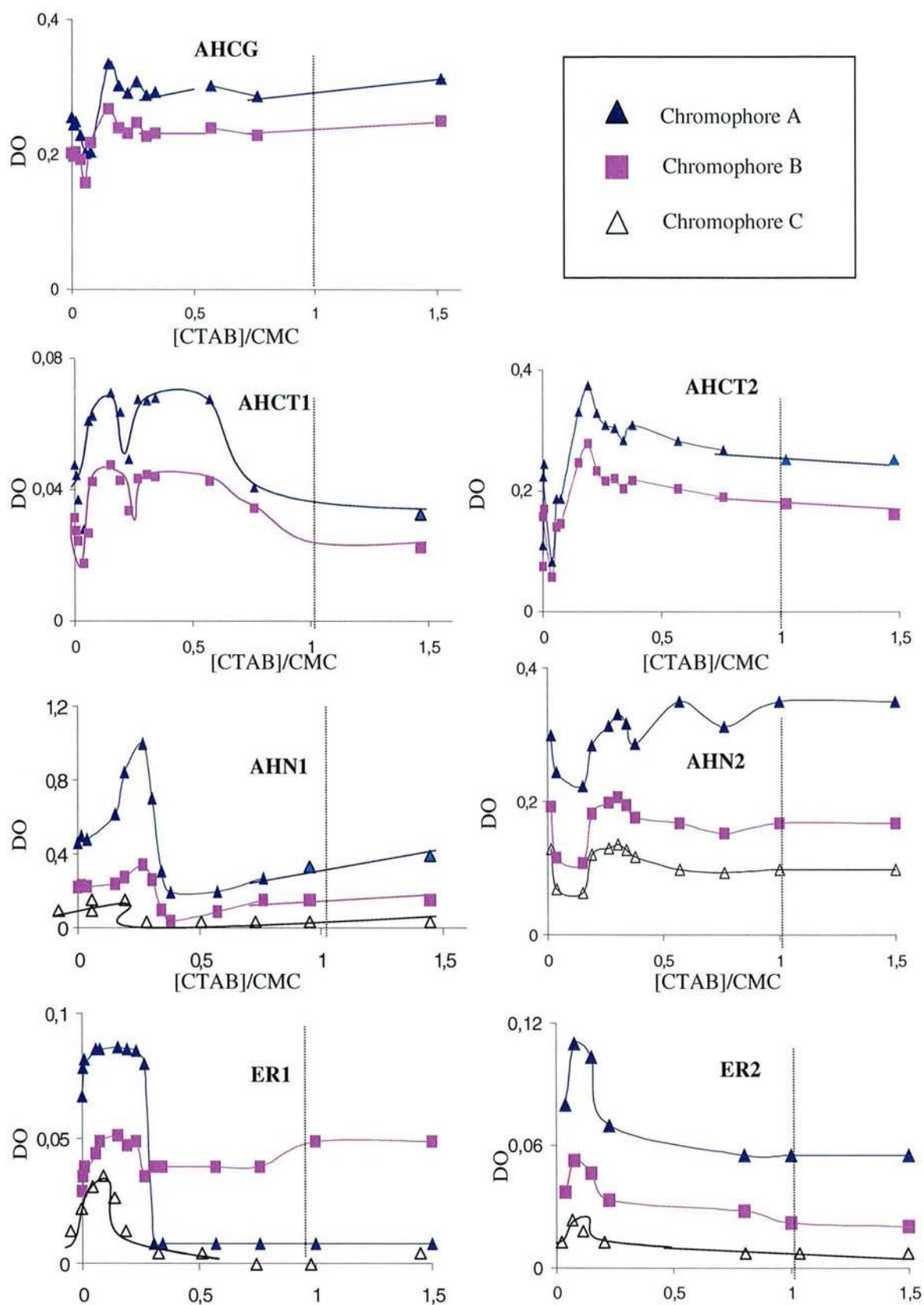


Figure IV.5(3)
Variations des densités optiques pour les 3 chromophores A (270-290 nm), B (330-350 nm) et C (400 nm) des solutions de MO en présence de CTAB.

L'analyse est la suivante :

1. Pour toutes les fractions de matière organique, d'origine synthétique ou naturelle, plusieurs paliers peuvent être systématiquement identifiés. L'absorption des 2 chromophores A et B semble évoluer en 3 étapes successives (particulièrement bien prononcées pour la plus petite fraction en taille moléculaire issue de la synthèse catéchol/triglycine, *i.e.*, AHCT1 et aussi pour AHN2) en fonction de la concentration en CTAB dans le milieu : de 0 à 0,1 [CTAB]/CMC, puis de 0,2 à 0,3 [CTAB]/CMC environ suivant la fraction considérée et enfin au-delà de 0,4 [CTAB]/CMC.
2. Chaque étape correspond à une diminution suivie d'une augmentation plus ou moins bien marquée de la DO. Ces étapes pourraient correspondre à la formation et restructuration successive des molécules organiques sous l'influence du tensio-actif, chaque modification étant plus ou moins stable ou plus ou moins marquée suivant la nature chimique des interactions propres à chaque type de molécule organique.

IV.5.2.2. Inhibition de fluorescence

Les spectres d'inhibition de fluorescence de la MO en présence de CTAB sont présentés sur la Figure IV.5(4) et la Figure IV.5(5).

Les évolutions globales des spectres de fluorescence sont données par les représentations tridimensionnelles sous forme de matrices EEM pour 2 échantillons présentant des mécanismes d'interaction en fluorescence très différents avec le CTAB, à savoir AHCT2 (Figure IV.5(6)) et ER1 (Figure IV.5(7)).

Les analyses de Stern-Volmer correspondantes sont représentées à la Figure IV.5(8).

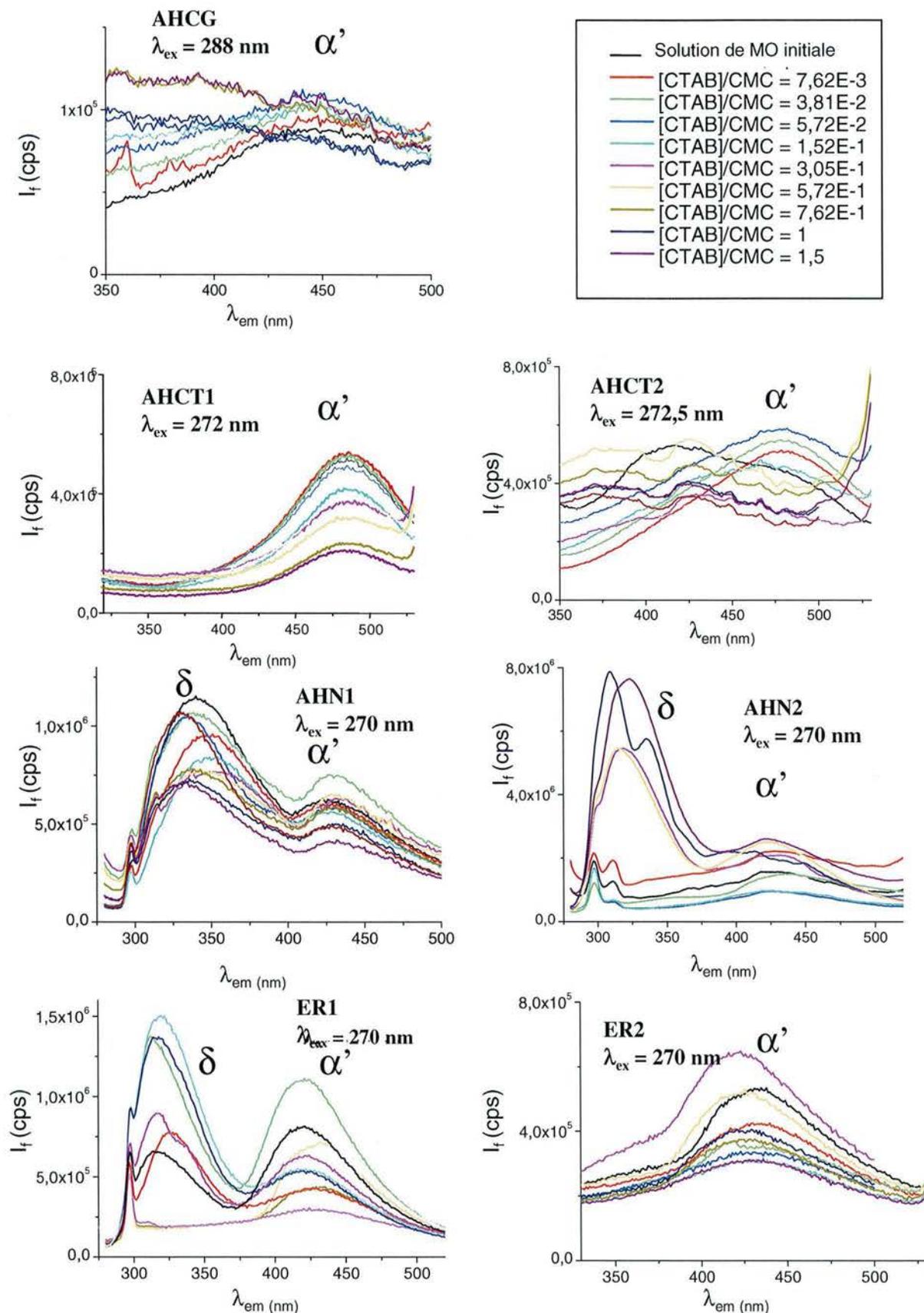


Figure IV.5(4)

Inhibition de fluorescence (fluorophores α' et δ) des solutions de MO en présence de CTAB.

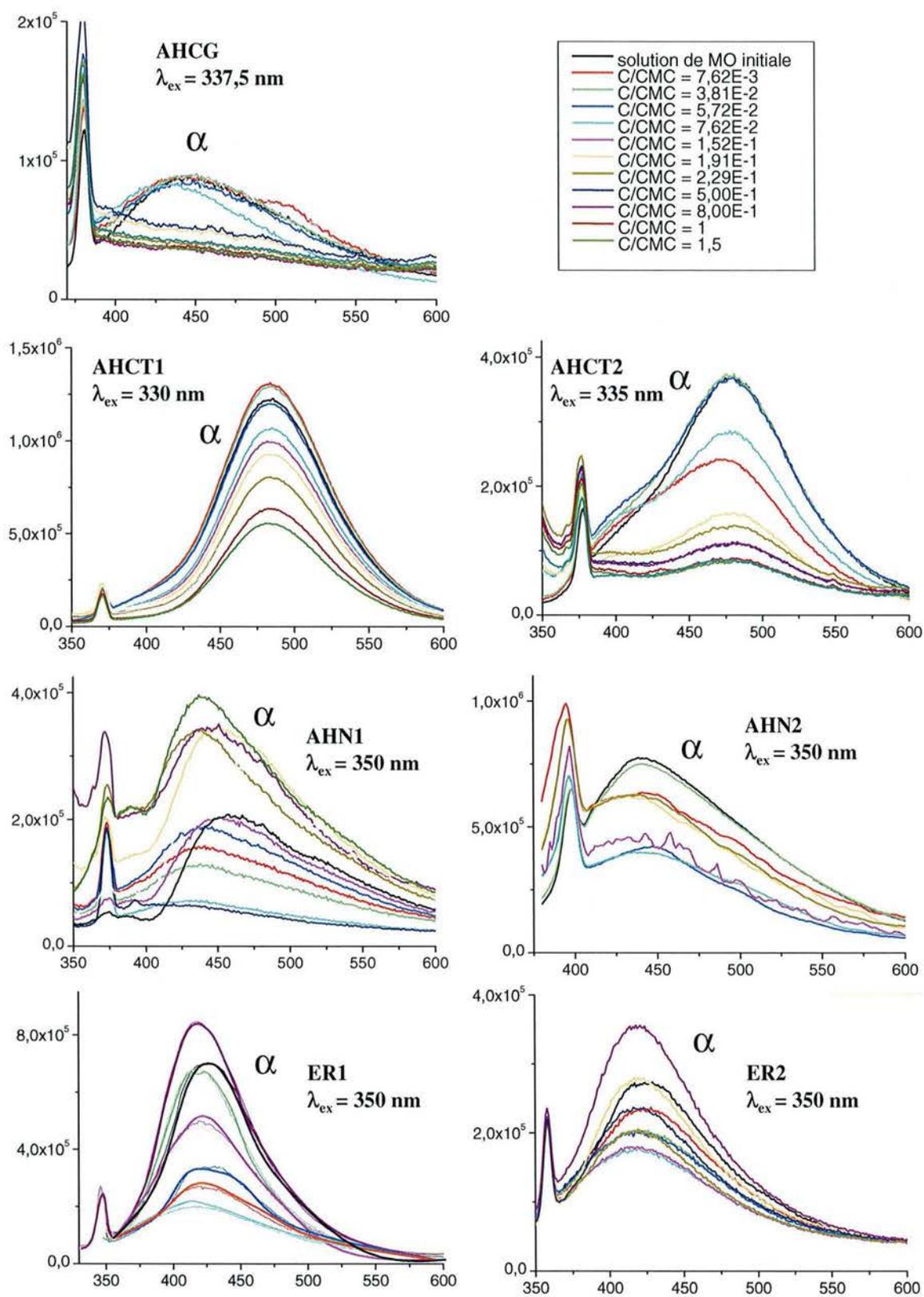


Figure IV.5(5)

Inhibition de fluorescence (fluorophore α) des solutions de MO en présence de CTAB.

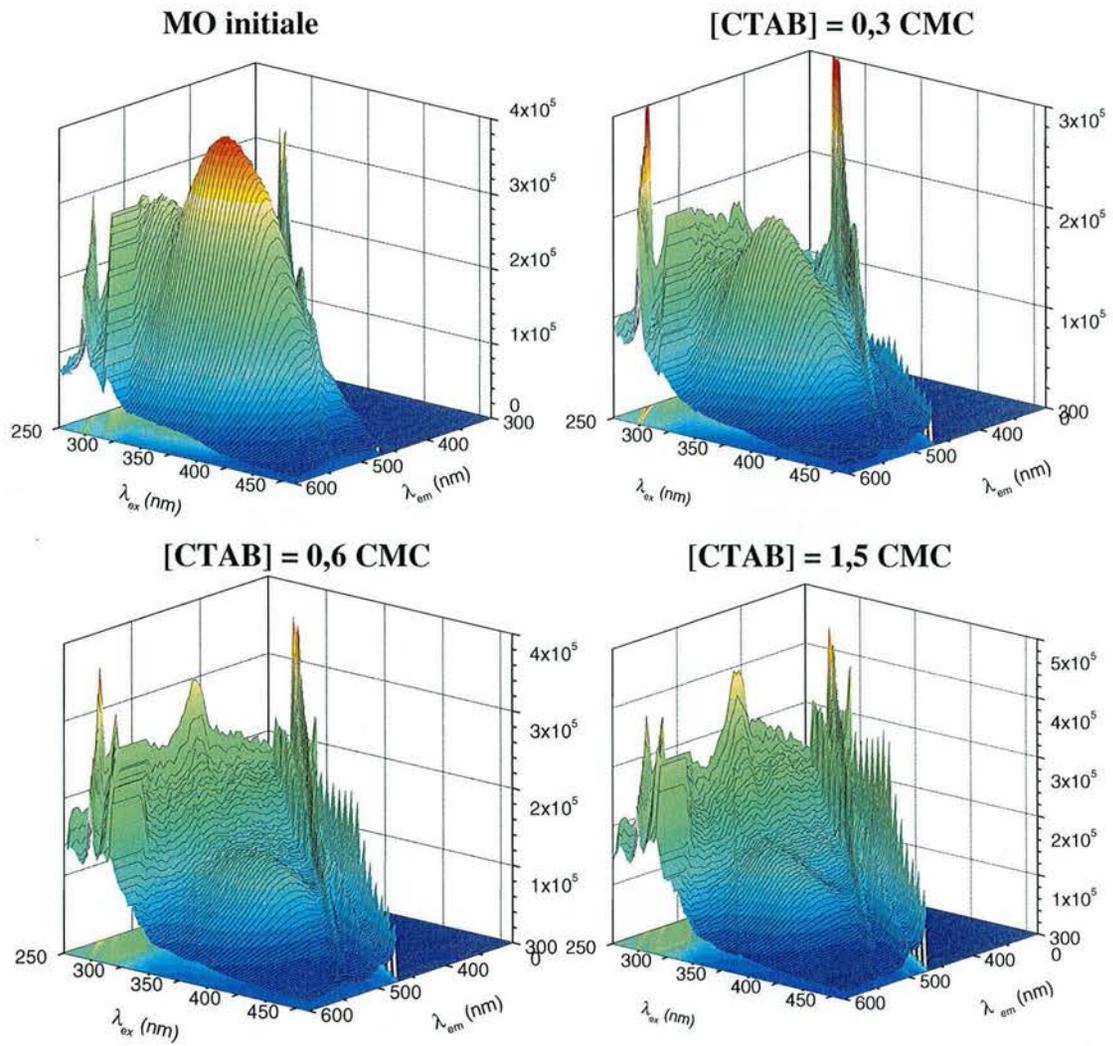


Figure IV.5(6)
Matrices EEM (Excitation-Emission) de AHCT2 en présence de CTAB.

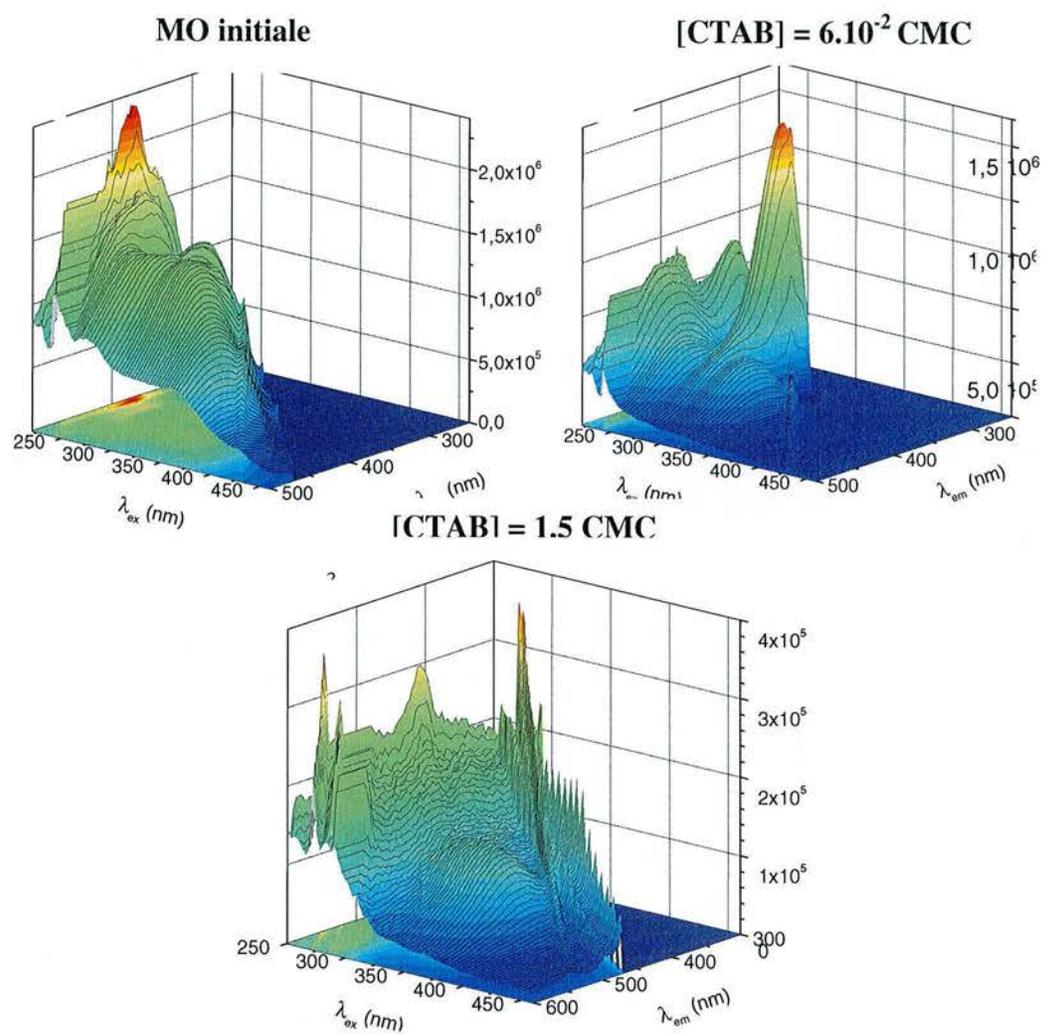


Figure IV.5(7)
Matrices EEM (Excitation-Emission) de ER1 en présence de CTAB.

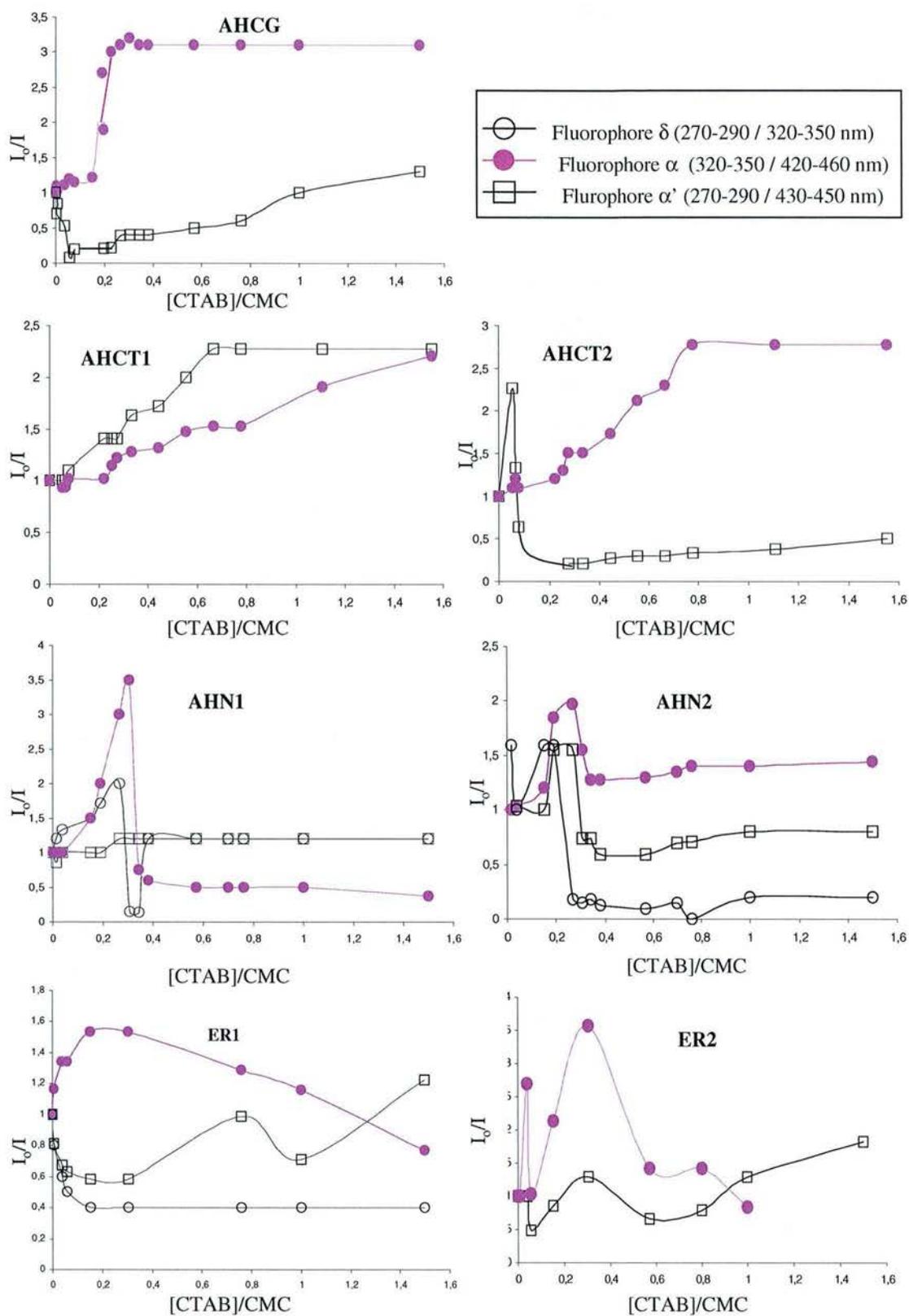


Figure IV.5(8)
Analyses de Stern-Volmer pour les solutions de MO en présence de CTAB.

L'analyse des mesures de fluorescence est la suivante :

1. Concernant les mesures quantitatives d'inhibition de fluorescence, les résultats issus des expériences réalisées avec les différents types de matière organique présentent des tendances similaires (Figure IV.5(7)).
2. Les différents domaines de concentration en CTAB, pouvant correspondre à différentes étapes d'interaction, sont comparables à ceux déterminés en absorption UV/Visible.
3. Les courbes de Stern-Volmer pour le fluorophore α présentent une variation en au moins 3 étapes : après une phase de quasi stabilité du système (jusqu'à 0,1 CMC), le rapport augmente par « à coups » (de 0,1 à 0,7 CMC suivant les fractions), se déstabilise sur un domaine étroit de concentration (diminution de I_0/I) puis se stabilise enfin aux concentrations les plus élevées en CTAB ($> 0,8$ [CTAB]/CMC). Les évolutions de ces rapports pour les eaux de rivière (ER1 et ER2) présentent un décalage de ces variations au niveau des domaines de concentration.
4. Afin de déterminer les constantes de Stern-Volmer K_{SV} (α) traduisant l'association entre le fluorophore α de la MO et le CTAB, nous avons linéarisé les portions de courbes correspondant à la 2^{ème} étape pour toutes les fractions considérées. La pente des droites nous a permis de calculer ces constantes qui seront données dans le paragraphe IV.6.
5. Le fluorophore α' suit une évolution pratiquement opposée et symétrique ⁴⁸.
6. Pour le fluorophore δ , il semble exister, comme dans le cas du SDS, plusieurs étapes dans le mécanisme d'interaction avec le CTAB, allant jusqu'à entraîner une modification des niveaux d'énergie électroniques des molécules de MO ou la formation de nouvelles espèces fluorescentes. Ces phénomènes sont observables dans le cas de AHN1, AHN2 et ER1. Pour ces fractions, des déplacements de 20 nm des maxima d'émission de fluorescence sont enregistrés. Ce phénomène est particulièrement bien observable sur les représentations tridimensionnelles des matrices EE (Excitation-Emission) tracées à cet effet (Figure IV.5(6) et Figure IV.5(7)). Pour AHN2, l'association semble être toutefois d'une autre nature que celle obtenue avec AHN1 et ER1. En effet, au-delà de la CMC du CTAB, une augmentation

⁴⁸ Exception faite de la fraction AHCG.

Nous pouvons noter le déplacement du maximum d'émission de fluorescence de 60 nm vers les plus grandes longueurs d'onde pour la fraction AHCT2, avant toute inhibition du signal. Ce phénomène est difficilement interprétable pour cette fraction seulement. Il peut correspondre à une modification transitoire des espèces fluorescentes en solution et/ou des états excités des fluorophores de la MO en présence de CTAB.

de fluorescence pour AHN2 est observée, contrairement au cas de AHN1 et de ER1 pour lesquelles une inhibition de fluorescence se produit pour ces concentrations en polluant.

IV.5.2.3. Rendements quantiques de fluorescence

Les courbes des rapports des rendements quantiques de fluorescence ϕ_f/ϕ_0 (Figure IV.5(9)) permettent de renforcer nos hypothèses d'organisation en 3 étapes.

Si l'on fait un comparatif entre les évolutions des rapports des rendements quantiques et des courbes classiques de jar-tests réalisées lors de la coagulation de la MO par le fer (voir par exemple IV.3.), on peut ainsi définir des optima de concentration en CTAB pour lesquels l'inhibition de la fluorescence est maximale (*i.e.*, I_0/I maximal) pour un système photochimique stable (*i.e.*, rendement quantique constant). Ces valeurs seront détaillées et comparées aux valeurs de K_{SV} (α) dans le Tableau IV.6(1).

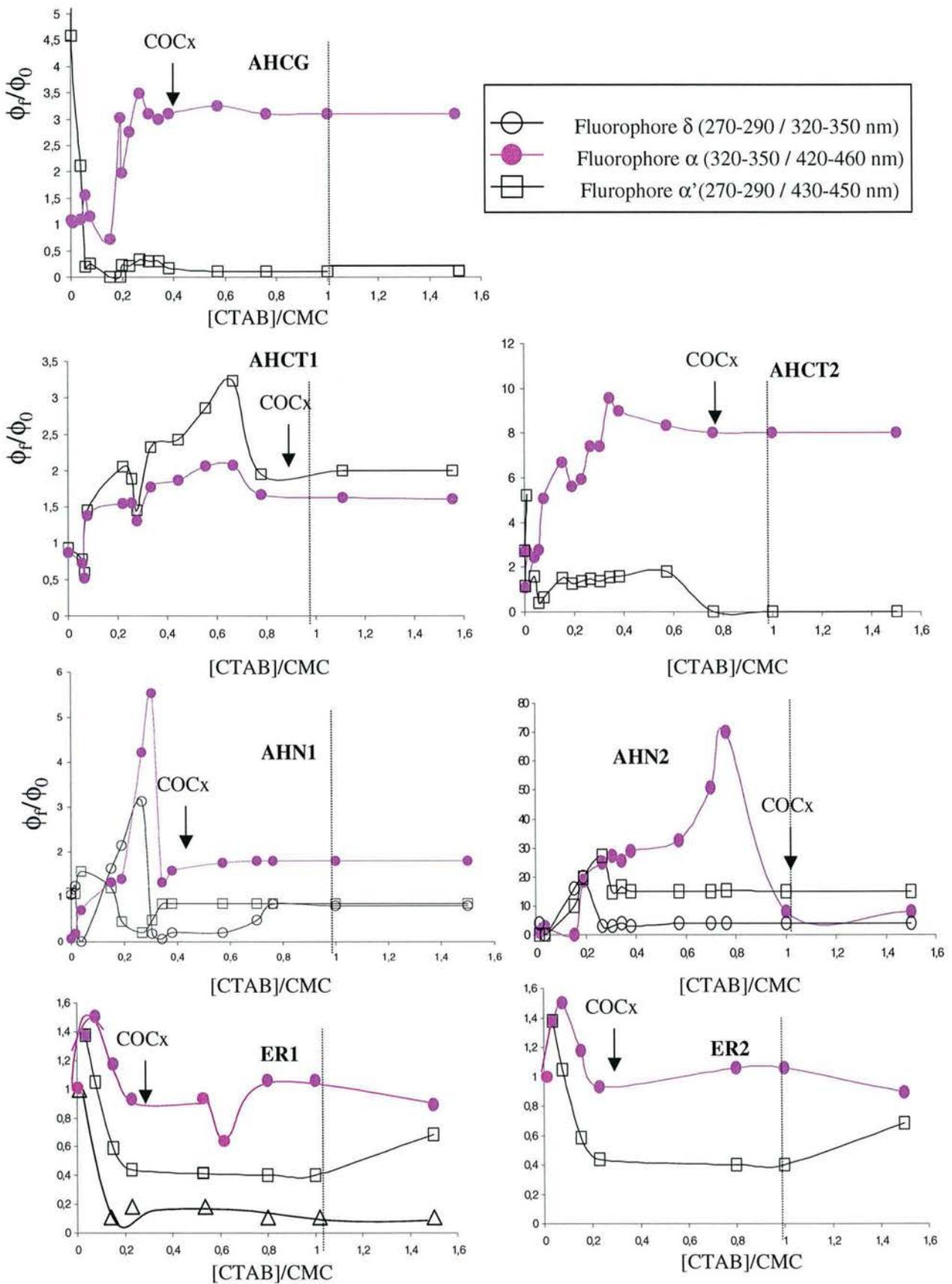


Figure IV.5(9)

Rapports des rendements quantiques ϕ_f/ϕ_0 pour les solutions de MO avec le CTAB.

IV.5.2.4. Conductivité

Les évolutions globales de conductivité sont données sur la Figure IV.5(10). Suivant les valeurs obtenues pour ces mesures, on peut séparer les fractions selon leur origine : les substances humiques synthétiques ont une conductivité moyenne 100 fois plus basse que celle des substances humiques naturelles en présence de CTAB. On peut donc penser que l'interaction entre le CTAB et les substances synthétiques est favorisée par comparaison à celle avec les substances naturelles. Par les mesures de tension de surface, nous avons vu qu'à des concentrations proches de la CMC, seules les eaux de rivière et l'acide AHN2 continuent de structurer leur interface. Ce phénomène est justifié par l'augmentation de la conductivité en solution pour ces 2 fractions.

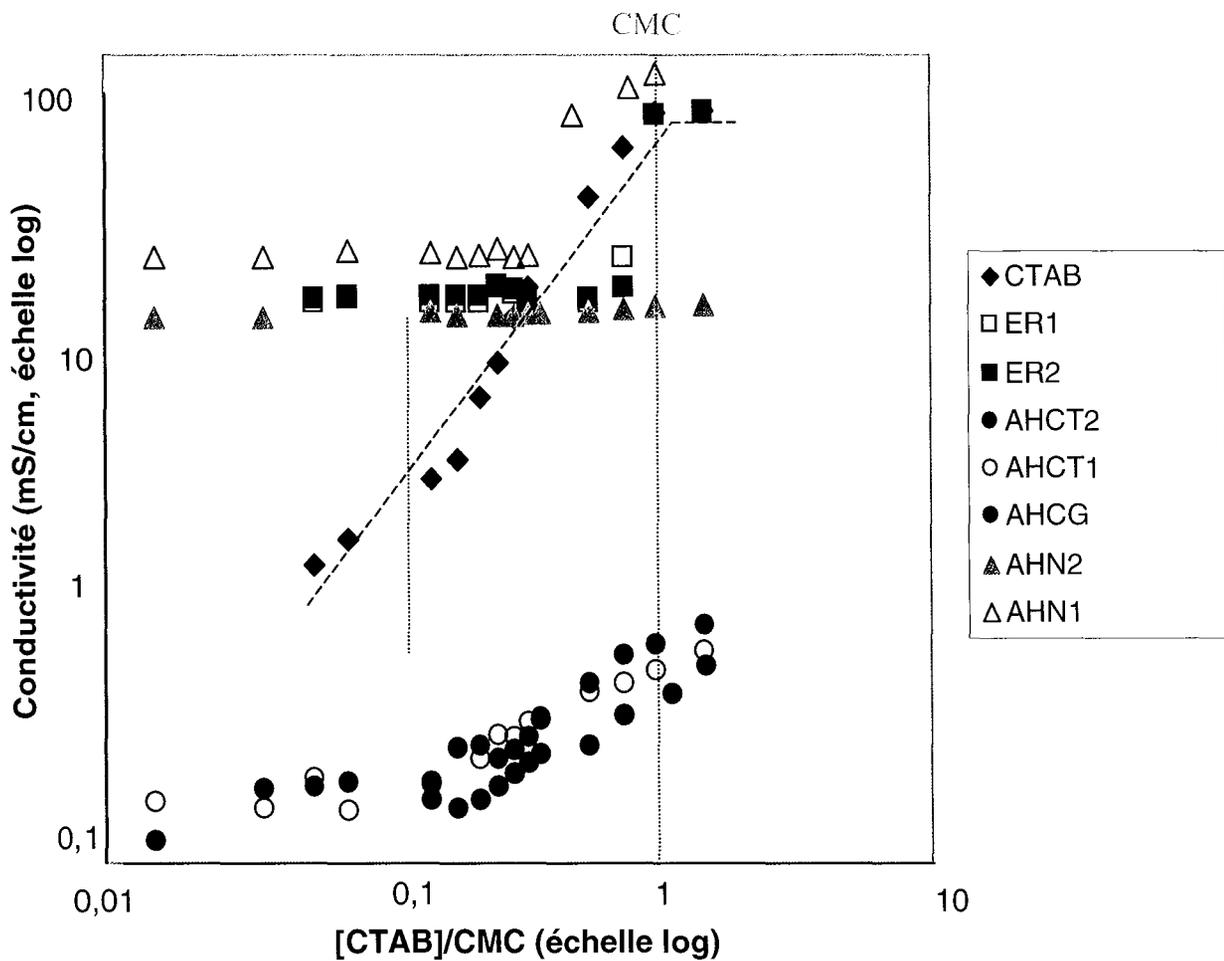


Figure IV.5(10)
Evolution de la conductivité des solutions de MO avec le CTAB.

IV.5.2.5. Turbidité

Le suivi de la turbidité des solutions « MO + CTAB » confirme nos observations : un précipité solide en suspension se forme pour toutes les fractions considérées entre 0,1 et 0,2 pour le rapport [CTAB]/CMC comme l'atteste le pic de turbidité (Figure IV.5(11)). Il s'ensuit plusieurs fluctuations dans les courbes de turbidité, comme si le système subissait plusieurs étapes de complexation et réorganisation successives, et nécessitait des concentrations en CTAB d'au moins 0,5 CMC dans le milieu pour permettre la saturation des différentes fractions de matière organique par le CTAB.

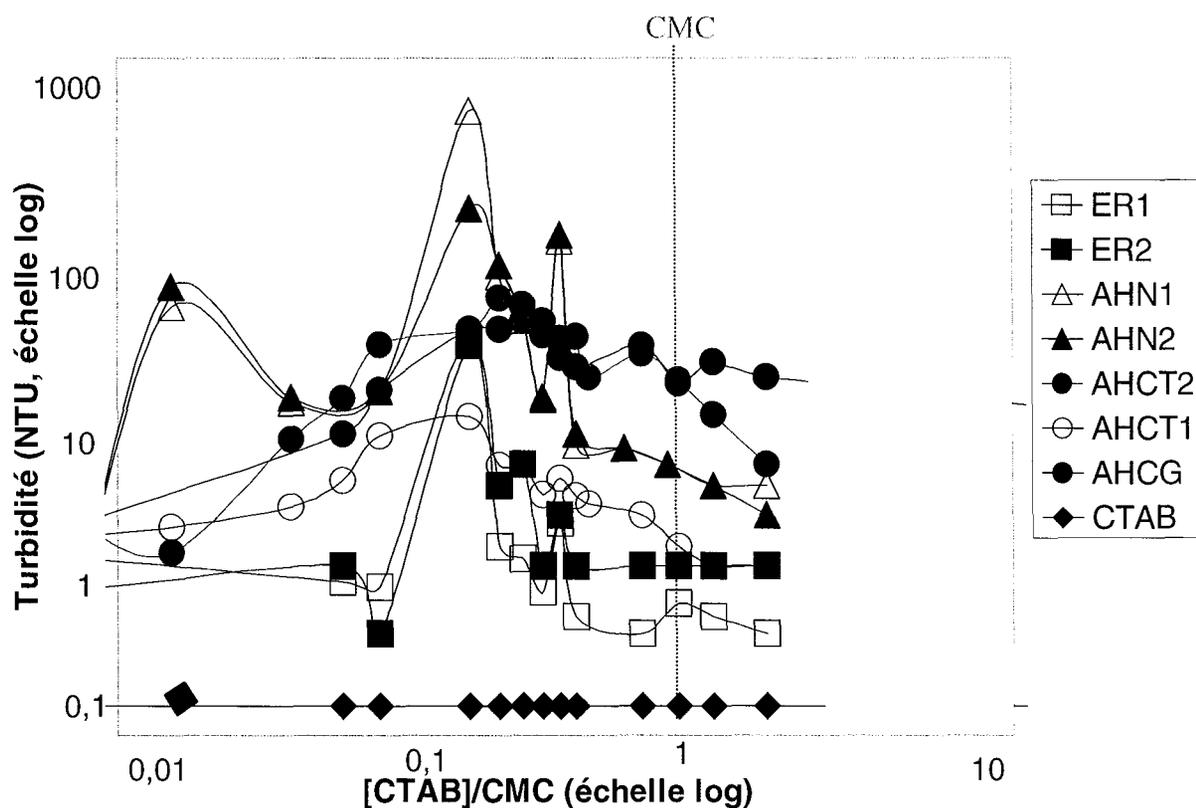


Figure IV.5(11)
Evolution de la turbidité des solutions de MO lors des ajouts de CTAB.

IV.5.2.6. pH

Une diminution systématique du pH en solution est constatée lors des ajouts de CTAB pour toutes les fractions de MO comme le montre la Figure IV.5(12).

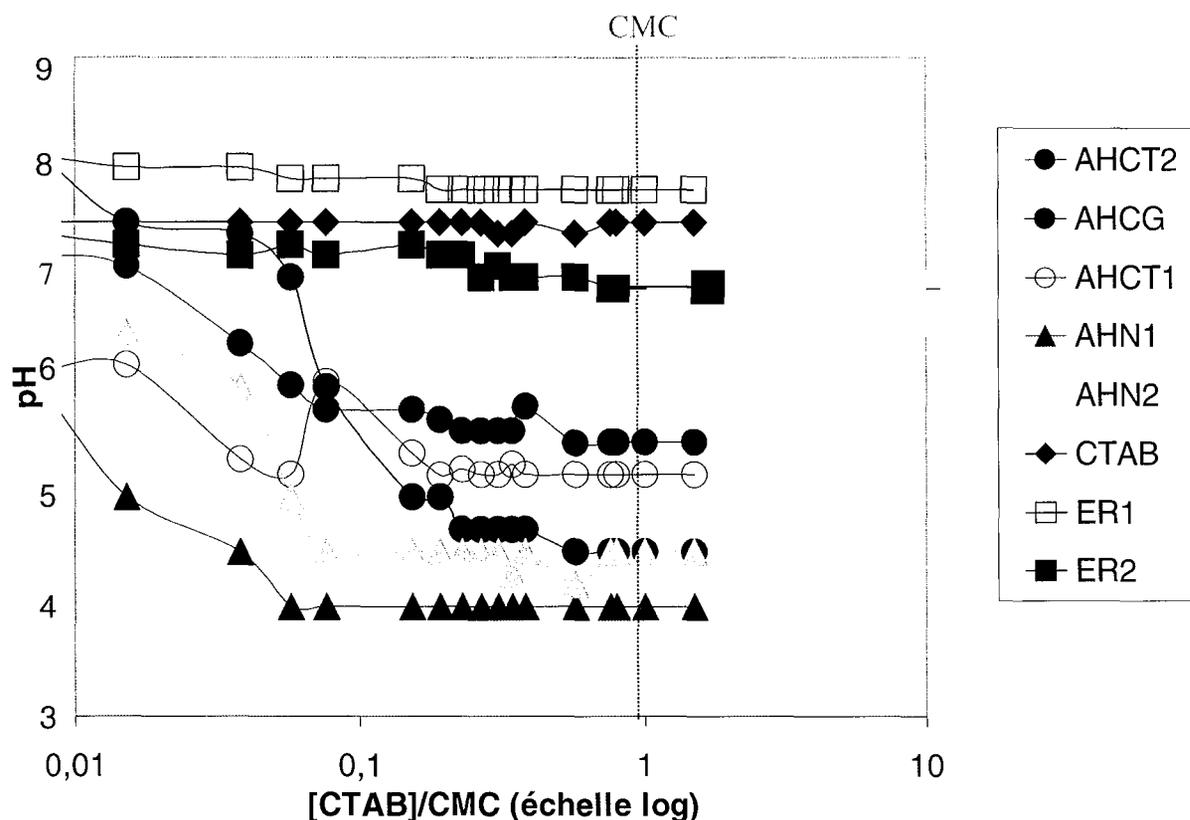


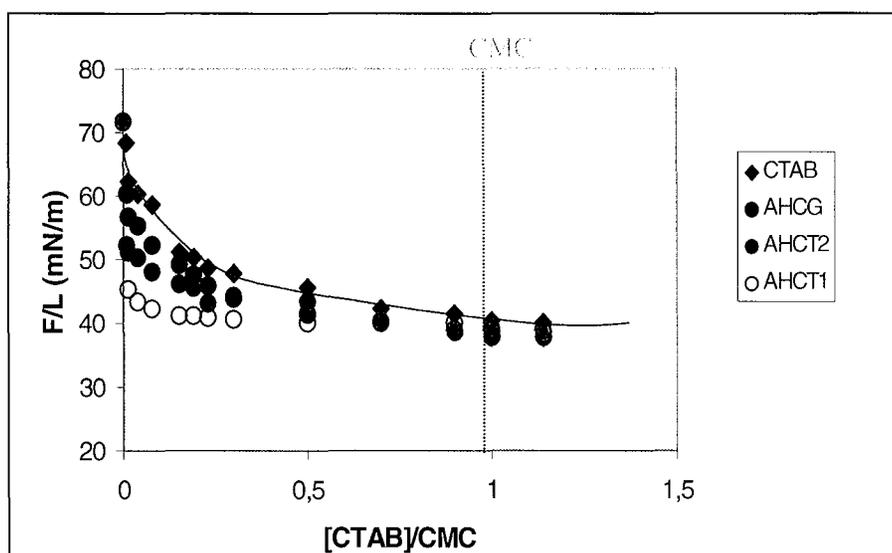
Figure IV.5(12)
Mesures de la variation de pH pour les ajouts dosés de CTAB dans les solutions de matière organique.

La réaction de complexation entre la MO et la partie chargée cationique du CTAB, libérant des protons, va laisser l'anion bromure (provenant du CTAB) « orphelin » en solution, d'où l'abaissement du pH.

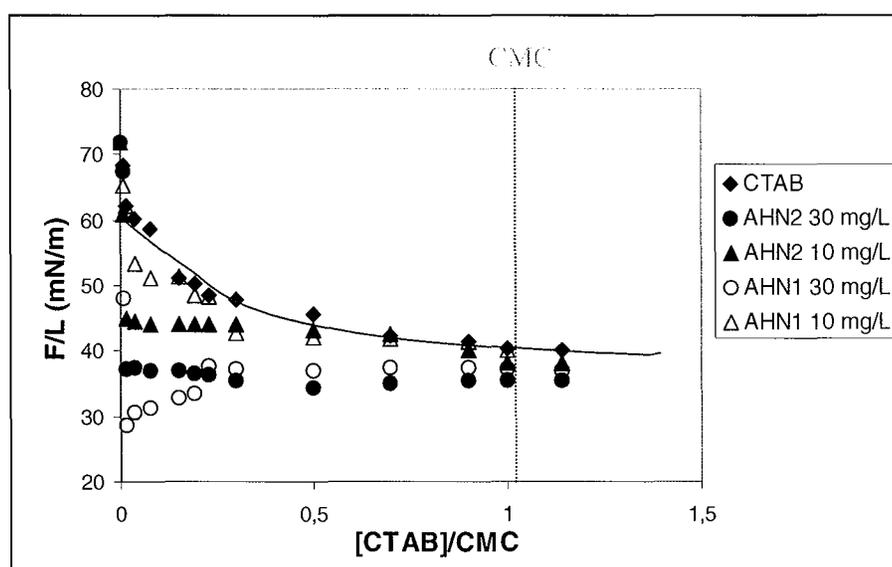
IV.5.2.7. Tension de surface

La courbe obtenue pour le CTAB (Figure IV.5(13)) seul permet de donner une valeur de sa CMC proche de la valeur théorique reportée dans la littérature (Bunton et Savelli, 1986) : $CMC_{CTAB} = 9 \cdot 10^{-4}$ M.

1



2



3

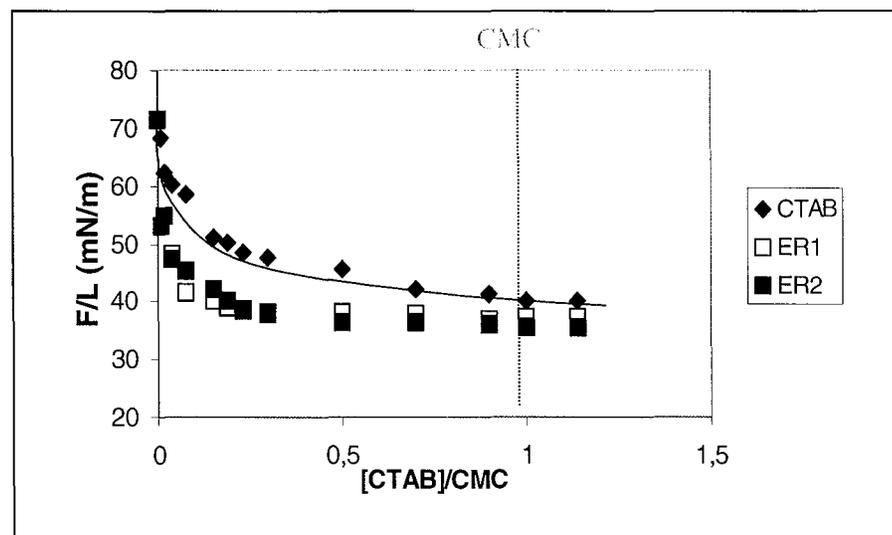


Figure IV.5(13)

Tension de surface pour les ajouts dosés de CTAB dans les solutions de matière organique (1 : substances synthétiques / 2 : substances naturelles / 3 : eaux de rivière).

Nous constatons que le phénomène d'agrégation observé n'empêche pas la prédominance d'effets tensio-actifs à caractère de plus en plus hydrophobes à l'interface avec l'augmentation de la concentration en CTAB dans la solution. Par comparaison des variations des courbes de tension de surface pour les différentes fractions de MO, un ordre de complexation avec le CTAB peut être établi de la façon suivante :

$$\text{AHN1 10 mg/L} < \text{AHCG} \ll \text{AHCT2} < \text{AHN2 10 mg/L} < \text{AHCT1 et ER1, ER2} \\ < \text{AHN2 30 mg/L} < \text{AHN1 30 mg/L}$$

Ainsi, à des concentrations plus élevées, les acides humiques naturels complexent d'autant plus facilement le CTAB. Pour AHN1, il doit exister également un effet de reconformation secondaire, comme l'atteste l'augmentation de l'hydrophilie à l'interface après l'étape de complexation (augmentation lente et progressive des valeurs de tensions superficielles au-delà de 0,1 pour [CTAB]/CMC).

IV.6. Bilan des études d'interactions MO/polluant : interprétations des résultats

Pyrène

Nous avons en effet constaté (cf. ARTICLE II) qu'une inhibition de son signal en présence de quantité variable de MO était indépendante des variations de polarité enregistrée (par le suivi I_1/I_3 en fonction de la concentration en pyrène). Une interaction photophysique intervient donc dans le mécanisme de complexation entre la MO et le pyrène de façon indépendante de la reformation des macromolécules en microdomaines hydrophobes susceptibles de retenir le polluant. Cependant, la méthode d'inhibition appliquée en changeant les rôles des 2 molécules l'une par rapport à l'autre (c'est-à-dire en prenant le pyrène comme inhibiteur de fluorescence de la MO) semble montrer une absence de quenching. Nous pouvons invoquer le problème de la méthode d'inhibition utilisée en mentionnant notamment les travaux de Fang et al., 1998. En effet, ces auteurs avaient déjà obtenu des résultats similaires aux nôtres lors de leur étude de la complexation de molécules fluorescentes de carbamates avec un acide humique commercial (échantillon Aldrich). Le quenching, utilisant le carbamate comme inhibiteur de fluorescence n'avait pas permis de réaliser une analyse de Stern-Volmer quantitative. La raison donnée était l'insuffisance de fluorescence de la matière organique. Dans le cas du pyrène, étant donné le rapport entre le signal d'émission de fluorescence du pyrène et celui de la matière organique (facteur 10 environ au profit du pyrène), nous pouvons suspecter que ce problème existe dans notre étude avec le pyrène. Par ailleurs, le pyrène a un spectre d'émission de fluorescence composé de bandes fines. Le spectre d'émission de fluorescence de la matière organique est quant à lui très large. L'utilisation de la fluorescence en résolution dans le temps (possible en utilisant un mode d'excitation par impulsion laser) ou l'application d'une autre méthode permettant de discriminer les fluorophores de la MO dans le mécanisme impliqué pourraient nous donner des informations complémentaires (travail à basse température par exemple). Ces méthodes pourraient être envisagées dans le futur.

Atrazine et sulcotrione

L'absence de formation de complexe en absorption UV/Visible et d'inhibition de fluorescence de la MO en présence des herbicides atrazine et sulcotrione nous laisse conclure à l'absence d'interaction entre ces polluants et la MON aquatique dissoute. Bertin, 1989, avait étudié l'adsorption de l'atrazine pour des gammes de concentration de 2 à 20 mg/L en

polluant par dépôt sur des polymères synthétiques de catéchol et de catéchol/glycine (à des concentrations de 20 g/L), ainsi que sur des polymères naturels extraits de sol par des mesures de radioactivité.

Il avait montré l'existence de plusieurs types de liaisons s'établissant préférentiellement au niveau des nucléus phénoliques des macromolécules humiques, tandis que les chaînes latérales polypeptidiques des macromolécules (comportant des groupements fonctionnels moins réactifs) semblaient réduire l'adsorption en rendant certains sites inaccessibles. Le comportement d'un acide synthétique AHCG (sous forme calcique) était d'ailleurs considérée comme très proche d'un acide humique naturel extrait de sol (rendzine). Au vu de la sensibilité de la technique de spectrofluorimétrie utilisée, si les parties phénoliques de nos substances humiques avaient présenté des interactions de ce type avec l'atrazine, nous aurions constaté une modification du spectre de fluorescence de la matière organique. Avec la MO et les concentrations (de MO et d'herbicides) considérées pour notre étude, nous pouvons donc conclure en l'absence d'interaction de ces substances avec l'atrazine et la sulcotrione en milieu aqueux. Ce résultat ne résout pas le problème des interactions en amont, c'est-à-dire les phénomènes d'adsorption entre ces molécules et les acides humiques du sol pouvant arriver sous forme complexés dans les rivières. Schiavon et al., 1977, et Schiavon, 1980, avançaient l'hypothèse de l'emprisonnement de l'atrazine au sein du réseau tridimensionnel des macromolécules humiques. C'était également l'hypothèse exprimée par Khan, 1982, qui pensait qu'en plus des liaisons chimiques, les pesticides ou leurs métabolites pouvaient être retenus à l'intérieur des lacunes observées dans la structure des polymères humiques. Schiavon, 1980, a ensuite montré que l'atrazine et l'ensemble de ses métabolites chlorés et hydroxylés étaient susceptibles de se lier avec les constituants du sol de façon irréversible. Cherrier et al., 2004, ont tout récemment étudié la dégradation de la sulcotrione dans un sol amendé par différents apports organiques. A l'aide d'un marquage au ^{14}C , ces auteurs ont comparé les taux de minéralisation des sols (dosages des résidus extractibles) soumis à l'apport de sulcotrione et démontré la formation d'un dérivé de type acide 2-chloro-4-méthylsulfonylbenzoïque (CMBA) dont la toxicité reste encore à étudier. Pour les sols présentant des amendements organiques, la transformation de la sulcotrione était favorisée. L'apport de fumier pouvait activer jusqu'à 10% supplémentaire du taux de minéralisation des résidus.

Certes, nous devons aussi poser certaines limites par rapport à nos résultats. Comme nous l'avons noté dans le cas du pyrène, les résultats de spectrofluorimétrie ne donnent qu'une première approche de phénomènes d'interaction photophysiques complexes en

solution, pouvant être ou non couplés à des interactions de nature plus « classique » (formations de liaisons plus ou moins rigides, interactions hydrophobe / hydrophobe, modifications de la balance hydrophobe/hydrophile, etc.). Par ailleurs, les résultats obtenus en absorption UV/Visible peuvent également masquer l'interaction éventuelle entre les polluants, étant donné la faible résolution des spectres d'absorption des AH. Les résultats obtenus pour cette étude devront donc être confirmés dans le futur par d'autres méthodologies restant pour l'heure à définir et à mettre au point.

SDS

L'interaction obtenue avec le SDS en spectrofluorimétrie est certainement la moins bien explicable sur le plan de la formation de liaisons chimiques uniquement. Nous pensons à un effet de structure tridimensionnelle des molécules d'acide humique (ou de la MON d'eau de rivière). Ces molécules pourraient donc modifier leur conformation en présence de SDS.

Nous basons cette hypothèse sur plusieurs observations. D'une part, les mesures de tension de surface nous ont clairement montré des interactions (de nature hydrophobe/hydrophobe) entre les molécules d'acide humique et celles du SDS au niveau de l'interface. Nous pouvons donc penser qu'en solution, tout se passe comme si la solubilité et les propriétés de micellisation du SDS (taille, nature et nombre des micelles formées) étaient modifiées dans une « phase acide humique » par rapport à une phase « aqueuse ». Ces pseudo-domaines micellaires formés entre le SDS et l'AH pourraient quant à eux suffire à modifier la fluorescence en solution de la MO en révélant plus ou moins les fluorophores initialement présents dans la structure. Nous pouvons rappeler les nombreux travaux cités dans notre bibliographie (I.3.2) utilisant l'anisotropie de fluorescence de molécules sondes permettant la détermination de la taille des domaines micellaires de systèmes tensio-actifs. D'autre part, il est intéressant de noter que la composante δ de fluorescence (phénolique ou amino-phénolique d'après les données de la littérature) est celle principalement affectée dans ce phénomène (inhibition ou exaltation du signal de fluorescence). Le suivi cinétique de la synthèse des acides humiques AHCG et AHCT (ARTICLE I, Chapitre I) nous avait révélé un phénomène similaire qu'il est ici pertinent de rappeler. En effet, une de nos observations avait été l'enregistrement du seul signal de fluorescence du catéchol (et de ses dérivés quinoniques se formant dans la première étape d'oxydation) au cours des 48 premières heures de réaction environ. Au 3^{ème} jour apparaît seulement la composante principale α des substances humiques. Or la polymérisation (comprenant l'incorporation des acides aminés) s'effectue dès

les premières heures de réaction comme nous l'ont attesté les spectres en IRTF. Nous avons ainsi conclu en la nécessité d'une organisation structurale suffisante en solution pour faire apparaître ou disparaître certains massifs de macromolécules comme les substances humiques. En assignant le fluorophore δ aux parties phénoliques de la MO (provenant de contributions de composés protéiques), nous pourrions donc envisager que le SDS va plus ou moins permettre la réorganisation des molécules de MO dans le milieu, permettant la révélation des parties phénoliques des molécules organiques. Nous rappelons en effet que les groupements électrodonneurs tels les -OH et les -NH- vont exalter le signal de fluorescence de la MO, alors que les groupements électroaccepteurs tels les -COOH vont limiter la résonance électronique des cycles aromatiques voisins (puisqu'ils attirent les électrons à eux) et donc inhiber la fluorescence. Comme aucun groupement de ce type n'est apporté de « l'extérieur » lors des ajouts de SDS, ces groupes sont donc présents dans la MO, mais sont plus ou moins révélés par fluorescence selon leur degré de liberté qui joue un rôle sur l'efficacité de l'émission de fluorescence (à savoir leur possibilité d'entrer en résonance).

Enfin, les résultats obtenus entre nos 2 prélèvements naturels (eau et AHN) sont très différents. Nous rappelons la richesse évoquée en substances protéiques d'origine microbienne ou bactérienne pour AHN1 (cf. ARTICLE I) qui pourrait être ici corrélée avec la composante δ associée aux substances fluorescentes de ce type. Nous sommes intimement convaincus que le comportement de cet extrait d'acide humique naturel est à rapprocher de celui des protéines, connues pour se dénaturer et former des complexes avec le SDS (Mukherjee et al., 2003 ; van Aken, 2003). Il semblerait que les acides humiques suffisamment riches en groupements peptidiques mis en présence de SDS, pourraient subir des changements importants de leurs conformations (rappelant les structures primaires, secondaires, tertiaires ou quaternaires des protéines) modifiant les interactions entre leurs propres chromophores.

CTAB

L'interaction entre les fractions humiques et le CTAB, expliquée par la même organisation structurale des acides humiques permettrait également d'avoir une approche des phénomènes en présence. Comme dans le cas du SDS, plusieurs domaines de concentrations en CTAB peuvent être distingués dans le phénomène de complexation. Pour les concentrations en CTAB $< 0,1$ CMC, les systèmes sont relativement instables comme l'atteste toutes les mesures qui présentent des variations assez aléatoires dans cette zone, quelle que

soit la fraction considérée. Un premier complexe supposé par liaisons ioniques (cf. plus avant pour le mécanisme total) se forme entre 0,1 et 0,2 [CTAB]/CMC. Il se traduit par la formation d'un précipité restant en suspension. Au-delà, des évolutions assez chaotiques laissent penser à des reconformations successives transitoires des macromolécules en présence de matière organique. La stabilité du système à l'échelle de l'interface est finalement atteinte pour des concentrations supérieures à 0,4 CMC. Par contre, à l'échelle moléculaire, comme le montre l'étude spectroscopique, l'existence de phénomène de réarrangement pourraient encore exister à ces concentrations.

Les résultats obtenus par Thieme et Niemeyer, 1998, en microscopie X permettent de confirmer l'interaction. En effet, ces auteurs avaient constaté la formation de particules sphériques (de l'ordre du micron) organisées lors de l'ajout de CTAB dans des suspensions d'acide humique. La taille des agrégats et du réseau structural formés était également fonction de la concentration en tensio-actif ajouté au milieu.

La nature des liaisons mises en jeu reste plus ou moins hypothétique : la formation de liaisons hydrogène et ioniques (suivant la concentration en CTAB) apparaît cependant probable. Afin d'expliquer les différentes observations et mesures de notre étude, nous proposons à la Figure IV.6(1) un mécanisme d'interaction pouvant s'établir entre le CTAB et les molécules organiques.

Nous avons considéré un mécanisme réactionnel faisant intervenir d'une part les groupements carboxyliques (essentiellement dissociés à notre pH de travail (pH 8)), et d'autre part les structures phénoliques présentes initialement dans les macromolécules d'AH.

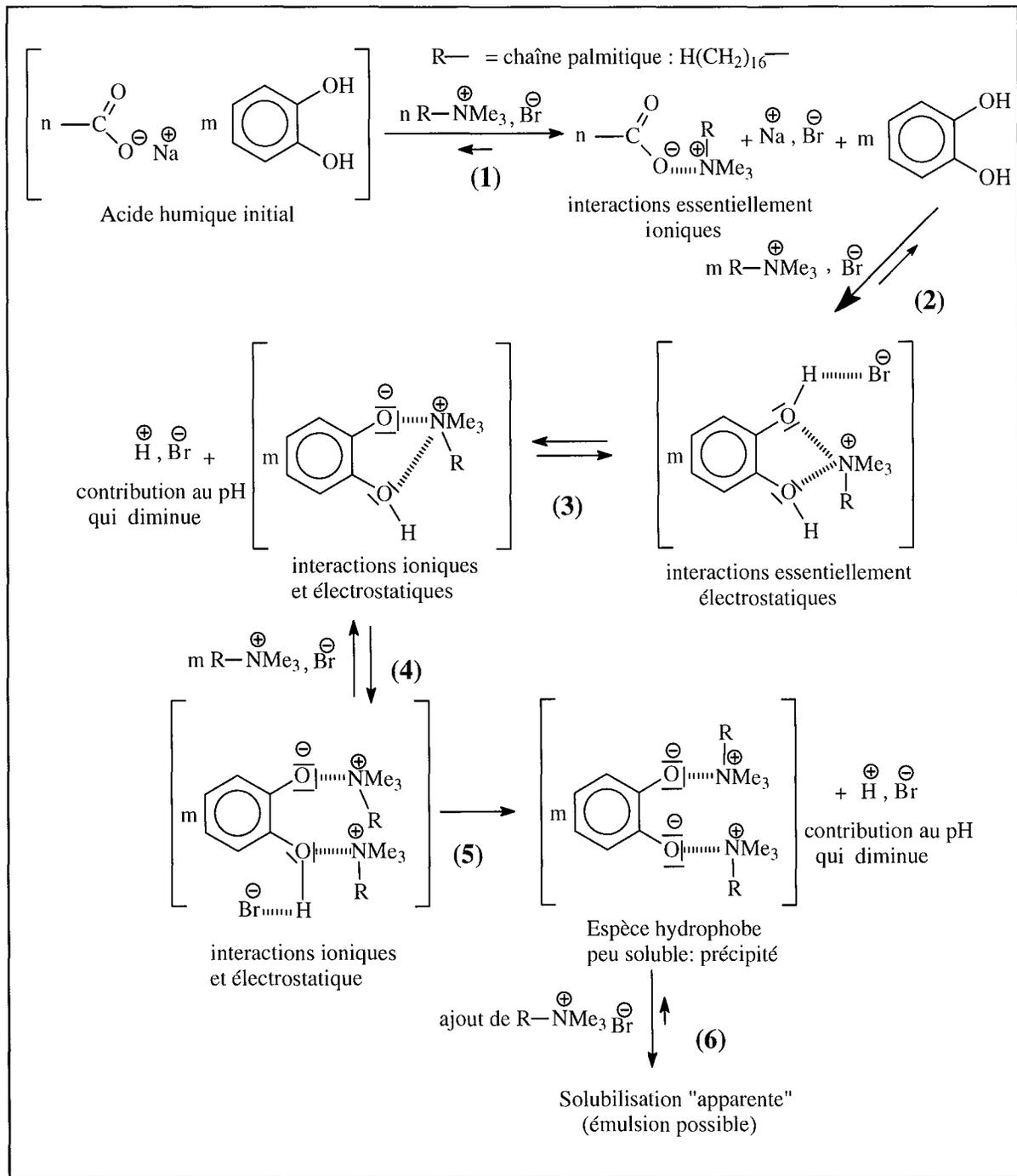


Figure IV.6(1)

Représentation schématique des équilibres pouvant s'établir en solution aqueuse entre les groupements *n*-carboxyliques et *m*-phénoliques des AH et le CTAB (*n* et *m* désignent l'ensemble des substituants organiques présents dans les structures des AH).

L'analyse est la suivante :

1. En premier lieu, nous pouvons penser qu'une interaction de nature essentiellement ionique va s'établir entre les groupements carboxyliques, chargés négativement à notre pH de travail, et les têtes « ammonium quaternaires » du tensio-actif CTAB (1).
2. Des interactions électrostatiques par liaisons hydrogène (2) puis également ioniques (3) peuvent ensuite s'établir entre les formes phénoliques de l'AH, initialement « libres » en solution, et qui vont s'associer progressivement avec le CTAB (4). Ces équilibres expliqueraient la libération de protons dans le milieu et donc la diminution de pH. L'acide bromhydrique se forme probablement en solution, l'ion bromure pouvant également subir des réactions secondaires d'hydrolyse en solution. D'autre part, étant donné que la disparition de groupements électrodonneurs de type « phénols libres » peut expliquer l'inhibition de fluorescence constatée dans ce domaine de concentration en CTAB, nous pouvons faire l'hypothèse que les équilibres 3 et 4 sont ceux gouvernant majoritairement les réponses obtenues en fluorescence. Etant donné la différence de comportement observé entre les substances humiques synthétiques et les échantillons naturels, on peut envisager que les équilibre 3 et 4 sont complètement déplacés dans le sens de l'équilibre 5, alors que les substances naturelles, possédant quantitativement plus de groupements phénoliques (cf. ARTICLE 1 Table 1) et de nature chromophorique différente par rapport aux molécules humiques synthétiques, nous comprenons que les formes « liées » entre les groupements phénoliques et le CTAB ont plus de mal à s'établir en solution. Des ruptures d'équilibre sont donc probables en solution (retour à des formes phénoliques libres), ce qui explique les états de fluorescence plus transitoires et l'exaltation de fluorescence enregistrée pour l'ERI notamment (Figure IV.5(6)).
3. Ces équilibres sont par la suite fortement déplacés (5) vers la formation d'une forme tellement hydrophobe qu'elle devient précipitable si la concentration en CTAB continue d'augmenter dans le milieu. Cette réaction explique les variations de turbidité mesurées.
4. Etant donné la disparition visuelle du précipité formé (et le retour de la turbidité à des valeurs initialement mesurées dans le milieu), nous pouvons penser que l'ajout de CTAB au-delà d'une concentration critique peut donner lieu à un phénomène de solubilisation « apparente », à savoir la formation d'une phase de type « émulsion » entre les AH et les tensio-actifs. En effet, un retour vers les équilibres antérieurs à la

réaction (5) paraît improbable, du fait de la stabilité mesurée pour l'acidité totale en solution aux plus fortes concentrations en CTAB. Il y a donc plutôt solubilisation du complexe neutre précipitable en solution.

Afin de comparer les résultats de manière plus quantitative pour ce phénomène d'association entre le CTAB et nos différentes fractions d'acide humique, nous avons linéarisé les courbes de Stern-Volmer (suivant les étapes précédemment mises en évidence) afin de calculer les constantes de Stern-Volmer.

Nous sommes néanmoins conscients que cette méthodologie est ici assez critiquable pour les raisons suivantes :

- D'une part, comme nous l'avons mentionné précédemment, les chromophores évoluent en nature (*i.e.*, leurs maxima d'absorption et de fluorescence varient) suivant la concentration en CTAB ajoutée. Nous n'avons pas tenu compte de cet effet pour quantifier l'interaction ; nous nous sommes placés à une longueur d'onde d'absorption et d'émission de fluorescence constantes en fonction des ajouts : les constantes sont donc calculées comme si les chromophores A et B restaient les mêmes en nature au cours des ajouts.
- D'autre part, l'importante turbidité enregistrée avec le CTAB laisse penser à une forte interférence du signal de fluorescence enregistré due à des phénomènes de diffusion parasites que nous ne savons pas à l'heure actuelle intégrer à nos résultats.

Les valeurs de K_{SV} données dans le Tableau IV.6(1) ne sont donc que très approximatives !

Comme nous l'avons proposé au paragraphe IV.2.5.2.c, nous avons également reporté dans ce Tableau IV.6(1) les valeurs des concentrations optimales de complexation (COCx) en fluorescence (déterminées à l'aide des courbes des rapports ϕ/ϕ_0 des rendements quantiques).

Tableau IV.6(1)
Constantes de Stern-Volmer et Concentrations Optimales de Complexation (COCx)
relatives aux fractions d'acide humique avec le CTAB.

Fraction de MO	$K_{SV} (\alpha)$	COCx / CMC
AHCG	$1,1 \cdot 10^5$ mL/g	0,3
AHCT1	$2,0 \cdot 10^4$ mL/g	0,8
AHCT2	$5,0 \cdot 10^4$ mL/g	0,7
AHN1	$1,2 \cdot 10^5$ mL/g	0,4
AHN2	$1,2 \cdot 10^5$ mL/g	1
ER1	$5,5 \cdot 10^4$ mL/g	0,3
ER2	$1,1 \cdot 10^5$ mL/g	0,3

Nous pouvons tout d'abord remarquer que les constantes d'association pour les acides AHCG, AHN et AHN2, ainsi que ER2 ont un ordre de grandeur 10 fois plus élevées que les constantes d'association déterminées par la même méthode d'inhibition de fluorescence utilisant le pyrène (Tableau 2 ARTICLE II).

Pour les autres fractions, les constantes déterminées sont de l'ordre de grandeur des plus grandes valeurs déterminées pour la MO en présence de pyrène. Notons que peu d'études ont permis ce calcul de constantes d'association entre la MO et des polluants autres que le pyrène par la technique du quenching de fluorescence. Fang et al., 1998, ont cependant déterminé des constantes d'association entre le carbofuran⁴⁹ et différentes fractions de MO de diverses origines (différents horizons de sols sur lesquels des conifères étaient plantés), ces constantes d'association déterminées variaient de 0,9 à $1,8 \cdot 10^4$ mL/g suivant la nature de l'horizon considéré. Ces ordres de grandeur sont ceux déterminés dans notre étude avec le pyrène. L'association entre le carbofuran et la MO étant majoritairement de type hydrophobe/hydrophobe⁵⁰, nous voyons que ces constantes de Stern-Volmer peuvent également dans ce cas indiquer le type d'interaction (en première approximation, cela restant à confirmer par des études sur d'autres molécules).

Nous constatons la corrélation existant entre les constantes d'association calculées par l'analyse de Stern-Volmer et les concentrations optimales de complexation déterminées à partir des évolutions des rendements quantiques. En effet, plus le CTAB s'associe quantitativement avec la fraction humique considérée, moins la concentration en CTAB à ajouter pour avoir la formation d'un complexe stable en solution est importante.

⁴⁹ Pesticide appartenant à la famille des carbamates.

⁵⁰ Le carbamate possède en effet une structure avec un cycle benzénique lui conférant les propriétés de fluorescence (utilisées par Fang et al., 1998).

En outre, ces résultats montrent les contributions à la fois de charge et de structure des molécules humiques dans le mécanisme de complexation avec le CTAB. En effet, les constantes de Stern-Volmer les plus élevées sont obtenues pour les fractions humiques ayant les sites chargés négativement (groupes carboxyliques) les plus accessibles dans leur structure supposée⁵¹. Ces interprétations ne sont cependant pas applicables dans le cas de ER2. Au vu des fluctuations importantes obtenues pour les courbes de rendement quantique de ER2 aux plus faibles concentrations en CTAB, les divergences de résultats pour cet échantillon sont donc explicables de cette façon.

Les mesures de tension de surface donnent également une représentation des interactions précédemment mises en évidence, à une échelle plus macroscopique, mais d'intérêt tout aussi notoire pour la compréhension des mécanismes en présence. Les résultats obtenus par cette technique sont donc complémentaires à ceux présentés en spectroscopie de fluorescence. Le caractère tensio-actif global des matières organiques en présence des polluants est bien fonction de la nature et des propriétés physico-chimiques mises en évidence à l'échelle moléculaire. Pour l'ensemble des valeurs obtenues, même si certaines interactions semblent privilégiées (supposées majoritairement ioniques dans le cas du CTAB), nous devons garder à l'esprit que nous sommes très probablement confrontés à l'ensemble des contributions des différentes forces classiquement rencontrées en solution aqueuse, à savoir les forces de Van der Waals (dispersions dipolaires d'induction ou d'orientation), les liaisons hydrogène et les interactions ioniques. Les résultats obtenus sont donc la somme de ces contributions.

Nous pouvons encore à ce niveau citer les résultats de travaux de Gunning et al., 2004, qui ont étudié l'effet de plusieurs surfactants sur les déplacements des protéines à l'interface air/solution par la technique de Langmuir-Blodgett couplée à l'imagerie de microscopie à force atomique. Ils ont montré que les pressions de surface mesurées pour les protéines β -lactoglobuline et β -caséine en présence de tensio-actifs non ioniques (Tween 20 et Tween 60) étaient imposées par les domaines de croissance du surfactant à l'interface. Les ruptures de pentes observées dans les courbes de Langmuir-Blodgett⁵² intervenaient à des tensions plus élevées pour les tensio-actifs ioniques (SDS, anionique et CTAB, cationique) que pour les non ioniques, mais la valeur de la pression imposée pour avoir rupture du réseau formé par

⁵¹ Dans la conception d'Andreux, 1978.

Voir notamment l'explication donnée dans l'ARTICLE I pour AHCG possédant les « bras » aliphatiques les plus labiles riches en fonctions carboxyliques.

la protéine à l'interface était la même quelle que soit la charge du tensio-actif. Ces résultats ont été interprétés comme la possibilité d'interactions électrostatiques supplémentaires entre les protéines et les tensio-actifs chargés, fonction de la taille des domaines formés par ces tensio-actifs. Ces domaines chargés en solution vont régir les forces intermoléculaires d'interaction globales en solution. Ces auteurs pensaient que les tensio-actifs non-ioniques pouvaient se lier aux protéines sans aller jusqu'à changer leurs propriétés mécaniques, alors que les tensio-actifs ioniques allaient changer leurs structures et ainsi leurs propriétés mécaniques.

Dans tous les cas (SDS et CTAB), une organisation en 3 étapes semble exister à l'échelle de l'interface air/solution :

1. Une première étape permet une association des molécules de tensio-actif avec les molécules organiques en solution, la nature de cette interaction étant différente suivant la nature anionique ou cationique du tensio-actif.
2. Une migration partielle des complexes « tensio-actif/MO » vers l'interface s'effectue par équilibre en solution.
3. Une reconformation éventuelle peut se produire par la modification de la balance hydrophile/hydrophobe finale mesurée, cette dernière étape semblant majoritairement dépendante des possibilités de reconformation de la MO à l'interface.

⁵² % d'aire occupée par les protéines en fonction de la pression de surface imposée au milieu.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DES ETUDES DES INTERACTIONS MATIERE ORGANIQUE / POLLUANTS

Classification des polluants en 3 groupes

Si l'on résume les résultats obtenus dans ce Chapitre IV, nous pouvons classer les polluants considérés en 3 groupes de composés, suivant leur réactivité avec la MO :

1. *Les polluants n'interagissant pas avec les fractions de matière organique étudiées*

Il s'agit des deux herbicides d'étude, l'atrazine et la sulcotrione, ainsi que du tensio-actif non ionique NPE. Comme nous l'avons précédemment mentionné, des techniques complémentaires d'étude en solution aqueuse devront certainement être mises au point dans le futur afin de compléter notre étude. Cependant, nous pouvons affirmer que la molécule de sulcotrione, encore à l'étude actuellement, présente des propriétés semblables à sa molécule de remplacement (atrazine) vis-à-vis des molécules organiques. Comme l'a par ailleurs montré Cherrier, 2004, si la sulcotrione devait être utilisée avec la même ampleur que l'atrazine par le passé, les mêmes difficultés environnementales seraient rencontrées.

Nous pouvons aisément comprendre l'enjeu de la maîtrise des propriétés de cette nouvelle molécule, étant donné les rappels récents concernant la toxicité éventuelle de telles substances pour la santé humaine. Par ailleurs, des études cinétiques visant notamment à déterminer les temps de demi-vie de cette famille de composés dans l'environnement aquatique s'avèrent indispensables pour le contrôle des flux de pollution et pour les aspects environnementaux de biodégradation.

2. *Les polluants présentant une interaction de type hydrophobe / hydrophobe et de type liaisons faibles (hydrogène)*

Le pyrène et le SDS appartiennent à cette famille de composés. La mise en évidence des interactions de ces polluants avec la MO est très délicate et nécessite de grandes précautions analytiques. Les forces d'interaction mises en œuvre vont dépendre de la nature physico-chimique des molécules organiques. Plusieurs mécanismes intervenant dans la rétention de ces polluants peuvent être fortement suspectés, chacun pouvant faire intervenir plusieurs voies d'interaction (photophysiques notamment), successives ou parallèles. La

superposition de l'ensemble de ces forces d'interaction rend les effets physiques ou chimiques difficilement individualisables et interprétables pour le moment.

3. *Les polluants formant majoritairement des liaisons ioniques avec la MO (en plus des autres effets précédemment mentionnés)*

Comme nous l'avons précédemment montré, il s'agit du CTAB, polluant pour lequel la formation de liaisons avec la MO apparaît quelle que soit la nature de celle-ci. Il serait intéressant de comparer les résultats obtenus avec des dérivés de sels d'ammonium de composition chimique contrôlée et variable afin de préciser peut-être ici le mécanisme de liaisons.

Commentaires sur les méthodes analytiques

Quelques conclusions peuvent également être tirées vis-à-vis des méthodes analytiques mises en œuvre.

En effet, nous avons tout d'abord pu constater les limites de l'application de la méthode d'inhibition de fluorescence en mode statique pour des composés présentant les caractéristiques spectrales des matières organiques naturelles. Malgré sa haute sensibilité et sa rapidité de mise en œuvre en solution aqueuse, la méthode de fluorescence appliquée doit être choisie en fonction des propriétés photophysiques intrinsèques des composés que l'on souhaite analyser. Ainsi, dans le cas des composés humiques ou naturels, une approche par résolution temporelle permettrait d'avoir accès aux informations complémentaires dans une meilleure compréhension du mécanisme de complexation des polluants.

D'une manière générale, les résultats obtenus avec les tensio-actifs sont sans doute ceux ouvrant le plus de perspectives scientifiques : pour le SDS et le CTAB, nous avons pu observer la présence d'au moins 3 étapes successives dans les mécanismes de complexation avec la matière organique, correspondant de façon étonnante aux mêmes concentrations équivalentes (par rapport à la CMC). Ce dernier résultat pourrait également confirmer une structure pour les substances humiques comparable à celle des protéines, puisque le mécanisme d'interaction ne semble pas strictement gouverné par des interactions purement chimiques, mais également par les effets de conformation et d'organisation des macromolécules en solution.

Plusieurs polluants potentiels sont donc susceptibles d'interagir et d'être transportés par la matière organique naturelle. Il nous reste à nous poser la question du devenir de ces complexes MO / polluants lors des opérations de traitement de l'eau, en prenant l'exemple de la coagulation.

La coagulation a en effet pour objectif d'éliminer les matières en suspension et par conséquent, toute molécule associée avec celle-ci. Cependant, à cause de modifications de conformation supposées pour les substances humiques en solution (cf. ARTICLE II), il est nécessaire de s'assurer que les polluants ne sont pas relargués dans le milieu lors du traitement de l'eau.

Dans le chapitre V suivant, nous avons choisi d'étudier l'évolution du statut de la matière organique (ARTICLE III) et du fer utilisé comme coagulant (ARTICLE IV) lors du traitement de l'eau. Cette étude a été réalisée par des techniques innovantes de microscopie électronique à transmission, utilisant notamment la perte d'énergie aux seuils K du carbone et L du fer. Par ailleurs, au paragraphe V.3, nous avons étudié l'évolution du complexe entre la matière organique et le polluant pyrène, lors du traitement de coagulation par un sel de fer, à partir de prélèvements effectués dans le milieu naturel d'une part (eau de rivière et acides humiques naturels associés aux matières en suspension), et des substances modèles d'autre part.

Chapitre V

La coagulation de la MO naturelle et
synthétique par le nitrate ferrique,
investigation par les techniques de
Microscopie Electronique
à Transmission (MET)

ARTICLE 3 Version préliminaire

**Removal of natural organic matter (NOM) and humic substances
by coagulation with a ferric salt:
a Carbon Electron Energy Loss Spectroscopy (EELS) and
Pyrolysis /Gas-Chromatography Mass-Spectrometry investigation**

Jung A.-V.^{1*}, Chanudet V.², Ghanbaja J.³, Lartiges B.S.¹, Bersillon J.-L.¹

¹*Laboratoire Environnement et Minéralurgie (LEM),
UMR 7569 CNRS-INPL-ENSG, 15 avenue du Charmois, BP 40, 54501 Vandœuvre, France*

²*Analytical and Biophysical Environmental Chemistry Group,
Department of Inorganic, Analytical & Applied Chemistry, University of Geneva, Sciences II, 30 quai Ansermet,
CH-1211 Geneva 4, Switzerland*

³*Service commun d'analyses (MET), Université Nancy I, BP 239, 54 506 Vandoeuvre, France*

* corresponding author: av1jung@hotmail.com

Abstract

Removal of natural organic matter (NOM) appears as an issue in water treatment process. Coagulation using ferric salts is one of the most important part of the purification of water. The optimisation of the coagulation step requires an adequate knowledge about the interactions between the coagulant species and NOM, including the speciation of possible complexes formed with organic molecules. A physical chemical investigation on coagulant-organic matter complexes involving transmission electron microscopy (TEM) coupled with electron energy loss spectroscopy (EELS) at carbon edge and Pyrolysis/Gas Chromatography-Mass Spectrometry (Py/GC-MS) was carried out. NOM present in natural water from the Moselle river (France), natural humic substances extracts as well as a synthesized humic-like compounds were chosen as representing the organic compounds. Removal of NOM and humic molecules was studied using the jar-tests procedure, using ferric nitrate solution in natural (pH 7.4), acidic (pH 6) and alkaline (pH 8) conditions. From C K-edge EEL spectra for organic aggregates containing iron, synthetic humic molecules appeared as partially representative of coagulated NOM. Observations of NOM particles help to set up a typology for organic matter species removed during coagulation. All take part in the coagulation process and contribute to the formation of the coagulant- mineral- organic matrix. The nature of complexing groups is one of the determining parameters in organic removal efficiency. EDXS results show the exchange of calcium with the coagulant species involved in the treatment process. The existence of a cationic exchange (Ca/Na-Fe) process leading to a charge neutralisation of the chemical coagulant with the carboxylic groups of the NOM was pointed out.

Key-words: NOM coagulation • synthetic and natural humic compounds • iron • TEM • EELS • EDXS.

Introduction

Natural organic matter (NOM), defined as the complex matrix of organic material present in natural waters, significantly affects many aspects of water treatment, including the performance of treatment unit processes (*i.e.* oxidation, coagulation, and adsorption), the application of disinfectant, and the biological stability. NOM acts upon drinking water quality by contributing to disinfection by-products (DBP) formation, biological regrowth in the distribution systems, colour, taste, and odour (Owen *et al.*, 1995). Various treatment processes, such as coagulation by aluminium or iron salts, remove aquatic organic matter from raw water, depending on their operational conditions and on NOM's specific characteristics, such as its molecular weight distribution (MWD), carboxylic acidity, and humic substance content (Collins *et al.*, 1985). Four distinct mechanisms of coagulation are generally recognized (O'Melia, 1972 ; Johnson and Amirtharajah, 1983): (1) compression of the diffuse layer (DLVO theory), (2) adsorption to produce charge neutralization, (3) enmeshment in a precipitate, and (4) adsorption to allow interparticle bridging. The influence of pH, coagulant dose, initial dissolved organic concentration (DOC) in NOM removal efficiency have been discussed for years (Stumm and O'Melia, 1968 ; Semmens and Field, 1980 ; Lefebvre and Legube, 1990). Many chemical processes have been suggested: complexation with monomers or low molecular weight polycations (at "low pH"), adsorption on to "fully" hydrolysed metal surfaces (Dempsey *et al.*, 1984).

In the resulting aggregates, carbon and metal speciation are less well known for flocs formed with Fe salts and NOM than those formed with Al salts. Lefebvre and Legube (1993) proposed two possible pathways for the coagulation of simple aromatic and aliphatic acids with iron chloride: the first consists of a ligand-exchange at the FeOOH surface, and the second is a complexation or a ligand exchange between soluble Fe monomers or oligomers and the organic matter leading to a precipitate.

Although previous experiments favored adsorption mechanisms (Packham, 1965 ; Rakotonarivo *et al.*, 1988, 1989), unambiguous answers can only be given by a local-scale study of the flocs precipitated from natural materials at various pH values and coagulant concentrations. While bulk analysis leading to the determination of overall chemical properties of NOM are frequent, only few techniques allow the direct measurement of the properties of individual macromolecules or macromolecular aggregates. Electron energy loss spectroscopy (EELS) began to be used by biochemists to analyse light elements such as carbon and nitrogen at the ultrastructural scale in order to describe *in situ* natural materials

degradation (Villemin *et al.*, 1995 ; Watteau *et al.*, 1996). EELS, based on the measure of the energy distribution of electrons through a thin specimen (Egerton, 1996), presents a second advantage since it is used as a structural scale spectroscopy technique for organic chemical bonds identification in polymeric systems (Varlot *et al.*, 1998).

The purpose of this work is to explore combined data from TEM techniques to understand the nanometric scale coagulation mechanisms involved in the interaction of ferric salts with NOM thanks to a comparison with well-defined humic-like polymers.

Experimental section

Chemicals

Fe(NO₃)₃, 9 H₂O (95% pure) and NaHCO₃ (99% purity analytical grade) salts were purchased from Sigma-Aldrich (Lyon, France). Bovine serum albumin (> 99% purity electrophoresis grade) and a polysaccharide (M_w = 100 000) gel permeation chromatography standard were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). An exopolymer extracted from sludges collected at the Maxéville wastewater treatment plant (Nancy Urban Community, France) according to Frøhlund *et al.* (1996) was characterized by Garnier (2004) and consists of a mixture of proteins and polysaccharide compounds.

For all samples preparation and dilutions, Milli-Q® ultra-pure water from Millipore (Billerica, MA, US) was used. Organic matter suspensions were dispersed in absolute ethanol (99.5% spectroscopy grade) from Carbo Erba (Orono, ME, USA) before TEM analysis.

Origin of NOM and extraction of humic substances

Three sources of organic matter were selected for this study. A synthetic humic-like substance (SHS) was prepared by polymerisation of catechol with glycine (Andreux *et al.*, 1980). After dialysis with a 8 kDa molecular weight cut-off Spectra/Por® 7 membrane purchased from Roth Sochiel (Lauterbourg, France), the synthetic material in a sodium form was freeze-dried and stored at 4°C in the dark. Extensive characterization of SHS and relevance to natural humic substances have been discussed in a previous work (Jung, 2004) Potentiometric titration showed three acidities at pK_A = 4.6 (2.3 meq/g), 5.1 (0.8 meq/g) and 7.2 (0.6 meq/g). Elemental analysis gave a nitrogen to carbon ratio (N/C) of 0.89 (%C w/w = 40.7). A natural aquagenic humic substance, hereafter referred to as NHS, was extracted from the Moselle river suspended matter. The sampling site was located at Richardménil (France) in the vicinity of the pumping facility supplying Grand Nancy Urban

Community drinking water treatment plant in surface water. Approximately 12 m³ of river water were pumped (1 m³/h) into a flow-through centrifuge operating at 17 000 rpm. The humic substances contained in the suspended material were then extracted following the procedure of Thurman and Malcolm (1981) adapted to yield the natural extract in a sodium form. NHS was also purified by dialysis (8 kDa) and freeze-dried. pK acidities and N/C determined for these natural humic substances were respectively 3.2 (2.7 meq/g), 8.5 (0.3 meq/g), 9.5 (15 meq/g) and 1.77 (%C w/w = 40.7). Grab samples of the Moselle river water (9.3 mg/L Total Organic Carbon content) were also taken at the sampling site thus providing a raw water with unfractionated NOM.

Coagulation procedure

Synthetic waters were prepared by dissolving 30 mg of humic material (either SHS or NHS) in 1 L of Milli-Q® ultra-pure water. NaHCO₃ (336 mg) was also added to the suspension to provide a carbonated alkalinity similar to that of natural river waters. Prior to coagulant injection, the pH of synthetic waters was adjusted to pH 6 or 8 with dropwise addition of 0.1 M HCl. The surface water was used as collected (natural pH = 7.4). Jar- tests were performed in 1 L baffled reactors of known power dissipation characteristics (Lartiges *et al.*, 1997). Suspension were stirred at 100 rpm which corresponds to a mean velocity gradient of 135 s⁻¹. The coagulant, a 0.1 M ferric nitrate solution prepared from crystallised Fe(NO₃)₃·9 H₂O (95% pure) was injected under agitation using a 5 000 µL micro-pipette (Eppendorf, Hamburg, Germany), and mixing was continued for 20 min. After 24 h of quiescent settling in graduated Imhoff cones, the residual turbidity of the supernatant was measured on a Ratio XR turbidimeter (HACH, Lovelo, CO, USA). The settled volume was recorded and the sediment was collected then freeze-dried (48 hours) to perform Py/CG-MS measurements, TEM observations, EDXS and EELS analysis.

Pyrolysis/Gas Chromatography- Mass Spectrometry (Py/GC-MS)

0.4 mg of coagulated humic substances (pH 8) or NOM (pH 7.4) powder was used. Each sample quartz holder was then inserted into a filament pyrolyser Pyroprobe 2000 from CDS (Oxford, PA, USA) and then heated to 720°C at a rate of 20°C/ms. The final temperature inside the quartz tube was controlled with a type-K thermocouple minithermometer and was found to equal 625 +/- 5°C. After pyrolysis, the fragments were separated on a 30 m DB WAX fused silica capillary column from Agilent (Palo Alto, CA, USA), programmed from 30 to 220°C at a rate of 3°C/min. Fragments identification of

coagulated organic materials (sediments) was performed on a mass spectrometer operated at 70 eV and scanned from 30 to 350 amu at 1 scan/s. Bruchet *et al.* (1990) quantitative method of characterisation was used to assist sample comparison: each pyrolysed fragment was assigned to one of the following four types of organic compound families: carbohydrates, protein materials, amino-sugars or polyhydroxy-aromatic polymers.

Transmission electron microscopy

The freeze-dried sediment was re-suspended in ethanol under ?sonication, and a drop of suspension was evaporated on a mesh carbon-coated copper grid purchased from Euromedex (Mundolsheim, France).

Electron microscopy observations were performed with a CM20 Philips (Amsterdam, the Netherlands) transmission electronic microscope (TEM) using a 200 kV accelerating voltage with an unsaturated LaB₆ cathod and connected to a Macintosh Iicx microcomputer controlled by the GATAN (Pleasanton, CA, USA) EL/P 2.1 software. The electron microscope is coupled with an energy dispersive X-ray spectrometer (EDXS), and with a GATAN 666 electron energy loss spectrometer (EELS). EDX spectra were recorded with a 20 nm spot size and a 20 s counting time. EELS spectra were collected in the 250-450 eV region with an analysed area of 20 nm (probe diameter). The spectrometer entrance aperture, the half-angle of collection and the dispersion were respectively 2 mm, 10 mrad and 0.2 eV/channel. The energy resolution, measured at the full width at half maximum of the zero-loss peak is 1.4 eV. The time acquisition for low energy region was 2.5 seconds and 8 seconds for C K-edge regions. All data processing was carried out with GATAN software. The relative thickness (ratio of sample thickness to the free electronic inelastic diffusion pathway), directly given by the software, was 0.5 (mean for all samples). Samples of relative thickness exceeding 0.7 were not considered in the data treatment. The corresponding electron dose, calculated with the Egerton relationship (Egerton, 1996) is about 101.9 C/m² which is beyond the critical value determined by Varlot *et al.* (1998) to have beam degradations in organic polymer.

- *EELS chemical organic bonds typology method*

So far, no works have investigated the carbon status (*i.e.* the chemical nature of carbon bonds) by EELS in natural systems. Only works on synthetic polymeric substances have been performed (Varlot *et al.*, 1998). In order to validate the conclusions presented here, the few qualitative data found in the literature were first correlated with the data of this study.

Calcium was also considered as an internal reference, so that all spectra were calibrated in energy at 346.4 eV (Ca L_{2,3}-edge) before analysis. This leads to a 401.6 eV nitrogen (N K-) edge energy consistent with usual attributions (Watteau *et al.*, 1996). When calcium was absent of our samples, the energy position of nitrogen was used instead. The second derivative spectra presented in Figure 1 are also shown in order to emphasise the fine-structure difference between our samples and standard compounds. The energy resonances for –C=O and –C-N chemical bonds were attributed thanks to albumin EEL spectrum (*i.e.* protein standard). The proposed assignments for –C-O and –C-C chemical bonds (Table 1) were obtained by comparison between the polysaccharide standard spectrum and the exopolymer (*i.e.* carbohydrate and amino-sugar standards). The C=C π^* resonance energy was attributed as in benzene (*i.e.* aromatic standard), according to Hitchcock *et al.* (1992). The others CC chemical bonds were attributed by deduction. The proposed assignment is in agreement with Varlot *et al.* (1998) and XANES data (Kikuma and Tonner, 1996).

• *Quantitative chemical analysis method*

For each sample and each added iron concentration, 15 EELS spectra were recorded, first corrected for dark current, gain variations, and double excitation by applying a Fourier-ratio deconvolution with weak loss energy spectra. Background fitting was performed with a power law in order to extract the core-excitation peaks for each element. All EELS spectra were normalized in intensity to allow comparative representations. Quantitative elemental analysis was obtained by integrating a surface area of 50 nm² after having defined the lower-limit in energy for each element here considered, that is respectively 283.8, 346.4 and 401.6 eV for carbon (C K-), calcium (Ca L_{2,3}-) and nitrogen (N K-) edges. Integration results are given by the software in atomic concentration/nm². The calcium and nitrogen atomic concentration were calculated compared with the carbon atomic concentration and expressed as Ca/C and N/C ratios. Thanks to the Ca/C EELS ratio determination, we have taken into account the EDXS multi-elemental quantification to determine the other atomic ratios presented in our studies (*i.e.* Na/C and Fe/C). All these ratios were calculated on the calcium EDXS quantification basis. For coagulation experiments performed at pH 6, no calcium was quantitatively detectable on CEEL spectra. For these results, we have also compared the carbon quantification between the same sample series at pH 8 to calculate Na/C and Fe/C ratios, carbon being the predominant element in all analysed materials.

Fourier-Transformed Infra-Red transmission spectroscopy (FTIR)

FTIR spectra of 1 mg of HS compound in 100 mg KBr pellets were determined on a IFS 55 Bruker spectrometer (Billerica, MA, USA) with a deuterated triglycerine sulfate detector to confirm or deny the presence of organic matter in supernatants or sediment samples.

Results

Jar-test results

Figure 2 presents the results obtained from jar-tests performed on the synthetic humic substances (SHS), natural humic substances (NHS) both at pH 6 and 8, and river water (NOM) at natural pH (7.4). At low ferric concentration, for both pH and all organic materials, the supernatant turbidity steadily increases with coagulant dosage to reach a maximum, and then steeply decreases upon further addition of ferric salt. The point where the extrapolated steep portion of the turbidity curve intersects the x-axis was chosen as the optimum coagulant concentration OCC (Kazpard, 2001) and is indicated with an arrow. OCC results (Table 2) are expressed in molar and in reduced concentration (weight concentration of iron divided by organic carbon content). Further application of coagulant above the OCC induces the restabilisation of the suspensions, except for SHS at pH 8: the residual turbidity strongly increases and exceeds the initial untreated water turbidity value. Reverse patterns are observed for sediment volumes: when turbidity increases at low coagulant dosage, it remains null since no destabilisation is observed, then it rapidly builds up when turbidity decreases, however more slowly around the OCC. When the suspension is stabilised (above OCC for SHS and NHS at pH 6), the sediment volume gradually decreases. Alphabetically listed points correspond to those analysed by TEM and remain referenced this way all along the present work.

Py/GC-MS results

Py/CG-MS quantitative results for coagulated organic materials (sediments) are given in Table 3. SHS and NOM coagulated matters present similar results in fragment quantification: protein material is found to be the more abundant for iron coagulant dosage near the OCC, whereas polyhydroxyaromatics compounds reach their lower percentage rate at this stage of the coagulation process. NHS Py/CG-MS quantitative dosages present the nearly opposite evolution. Lower amounts of protein materials are recorded from lower iron

concentrations to OCC, then higher amounts are found above the OCC. For NHS, polyhydroxyaromatics counterparts higher amounts are found near the OCC.

Morphology and nature of humic substances and NOM (TEM observations)

Coagulated OM drops deposit on carbon-coated grids helps to provide an appropriate spread of the suspensions. Solids secondary agglomeration effects occurring on solvent removal (ethanol evaporation) is also limited. Freeze-drying is also known to affect the morphology of structures in TEM observations (Stevenson and Schnitzer, 1982). Here freeze-drying time and conditions remained the same for all samples preparation, which allow comparative morphological observations on organic coagulated materials (Figure 3). For each organic sample, no effect of humic concentration was noticed on the morphology of coagulated structures. For SHS and NHS at pH 6 and 8, two major types of structures were observed: aggregates formed by coalescence of individual spheroids structures (2 to 20-30 nm) common to both humic materials (Figure 3 (a) to (d)) and filament-like structures (1 to 5 nm length) only observed for NHS pH 6 preparations (Figure 3 (d)). Individual spheroid aggregates are forming homogeneous sheet-like structures. SHS coagulated under alkaline conditions (Figure 3 (a)) present structures in which particles shapes are less discernible than those formed at acidic pH (Figure 3 (b)). Individual coagulated aggregates formed at alkaline pH are less defined and more overlapping than those formed under acidic conditions (Figure 3 (b)).

Figure 4 presents the different kinds of NOM aggregates found in the present study. TEM photograph in Figure 4 (a) presents OM embedded in mineral silica based matrices. Spherical particles (60 to 80 nm) of atypical discernable morphology (Figure 4 (b)) constituted another class of organic material found among NOM aggregated particles. Same individual spheroid aggregates previously described for SHS and NHS samples were also observed (B Figure 4(c)), with additional ellipsoidal structures (50 nm width/100 nm length) embedded in humic matrices (A Figure 4(c)). Since the probe diameter is of the same size range as iron-OM aggregates, TEM analysis are also representative of OM's size and functional properties, regarding its complexation behaviour with iron.

EELS and EDX results for SHS, NHS and NOM

EEL spectra for coagulation monitoring of SHS, NHS at pH 6 and 8 are represented in Figure 5. EEL recordings were homogeneous and reproducible for each of the iron concentration.

For *SHS* coagulation at *pH* 8, the 288-289 eV binding energy peak is strongly affected by iron addition. Its intensity slowly decreases from (a) to (b) iron concentration, then drastically decreases from (b) to (c) and then remains unaffected by further addition of ferric salt ((c) to (f)). However, the EELS spectra globally widen in the 283-300 eV region. The SHS behaviour is very different at *pH* 6, since right from the lowest iron concentration added (g), the spectrum shape is similar to the higher iron concentration one obtained at *pH* 8 (f). The EELS supernatants spectra (inserts) show also different results according to the initial *pH* working conditions. At *pH* 8, the lowest iron concentration (a), only one “humic-like” kind of EEL spectrum (“H kind”) with a 288-289 eV well resolved peak was recorded. A mixture of “H kind” with a “IH” one (with “inhibited” peak at 288-289 eV) was recorded from (b) to (e) iron concentrations. At (f), only “IH” species were found in the sample. At *pH* 6, “IH” and “H” kinds of materials are present for low iron concentration (g). For higher coagulant dosage, only the “IH” kind is detected by EELS. Elemental atomic ratios calculated from combined EDXS and EELS results are presented in Figure 6. N/C ratio remains constant during the SHS coagulation process at both *pH* and is consistent with an elemental ratio determined elsewhere (Jung, 2004) for humic substances characterisation. Ca/C decreases right from the lowest added iron concentration, then remains constant above $7 \cdot 10^{-4}$ M for SHS at *pH* 8. An opposite evolution is observed for Na/C. Fe/C ratio decreases from 3 to near 1 (at OCC), then slightly increases for higher coagulant dosage. At *pH* 6, no calcium was detected in the sediments, however, EELS measurements (insert in Figure 5) show that this element is present in the analysed supernatant particles. Fe/C gradually increases whereas Na/C decreases from lower to higher iron concentrations.

For *NHS* at *pH* 8, the 288-289 eV EELS shoulder is well defined for the low iron concentration (k). As observed for SHS, the global spectrum gradually widens for higher iron concentrations ((l) to (o)). At *pH* 6, EEL spectra obtained for different iron concentration ((p) to (r)) may be superimposed and look like the final EEL spectrum shape obtained at *pH* 8 for higher iron concentrations. EEL spectra recorded for NHS supernatants (two *pH*) were found as mixtures of sodium and calcium carbonates by FTIR spectroscopy measurements and EDXS analysis (not presented here). The same quantitative elemental atomic ratio analysis could be performed for NHS and SHS. All atomic general trends are similar. Only slight quantitative differences between natural and synthetic substances are noticed.

Concerning *NOM*'s carbon status evolution during coagulation, a great heterogeneity was observed in EELS. To distinguish between the natural organic matter in C-K EELS evolution during coagulation, a specific typology has been performed (Figure 4). This

classification takes into account TEM observations, EELS N/C elemental ratio, -C=O bonds reactivity (*i.e.* the peak intensity evolution during the coagulation process) and global atomic composition calculated by EDXS. The first family considered, referenced as “*protein-like*” group (B Figure 4 (c)), has a N/C ratio in the 0.02 to 0.05 range, consistent with measurements performed on brown pigments of degrading leaves (Villemain *et al.*, 1995). The “*humic-like*” family (A Figure 4 (c)), was distinguished on the basis of the similarity of the -C=O evolution compared to SHS one. EEL spectra evolution during coagulation is presented in Figure 7 for this group. This kind of material presents the same functional complexation reactivity as humic substances. The third group is constituted of organic matter associated with large amount of “*silicated mineral derivatives*” (Figure 4 (a)). Silicium atomic ratio goes from at least 10% to 20%. Quartz, illite and kaolinite were found by EDX quantitative analysis. A “*polysaccharide-like*” family, was detected (Figure 4 (b)). The CEEL spectra only present the typical -C-C, -C-O and -C=O “sugar backbone” chemical bonds. The -C=C peak could be explained by a polymerisation reaction occurring for such compounds under the X-Ray beam. These compounds were indeed found bubbling and compacting during the recording. EDX spectra clearly show that no iron is associated with these particles. Not enough “family-different” particles were counted to calculate quantitative elemental atomic evolutions for each one. Future works could however improve the results obtained here to establish coagulated organic matters types-dependant diagrams.

When considering mean elemental atomic ratio of all organic species taken into account, Ca/C and Fe/C ratios present similar evolutions of those previously described for humic substances (natural and synthetic) at acidic pH (Figure 6): the calcium content decreases up to OCC, then just after increases to decrease again for still higher iron concentration. Fe/C gradually increases all long the coagulation process. Interestingly, two steps are clearly discerned as far as N/C ratio evolution is concerned, since it drastically increases at OCC, then remains high (0.06 for the final value).

Discussion

All these results help to discuss OM removal, that is to specify the nature of organic and inorganic structures implied in the coagulation system and to quantify the cationic (Ca, Na) charge exchanges of coagulant with organic complexing groups implied in the coagulation mechanism.

Removal of humic substances as a function of pH: role of the carboxylic moieties

Humic substances characteristics and properties are responsible for different OM removal mechanisms according to pH. For synthetic humic substances in *alkaline coagulation conditions*, the coagulant dosage demand corresponding to an optimum organic matter removal is higher than for NHS. Considering acidity titration, according to previous study (Jung, 2004), 3 deprotonated sites (respectively “pure” carboxylics, carboxylic groups derived from partly cleaved catechol monomers and phenolic groups) are available for association with the coagulant species. This represents a charge of 3.7 meq/g whereas it is only 2.7 meq/g for natural humic substances, mainly composed of phenolic derived aromatic groups. According to EELS analysis, the carbonyl function (288-289 eV) was the first bond identified, engaged in the complexation process. This is consistent with an ion exchange reaction, mainly occurring at pH 8 for both substances. Higher coagulant demand for higher content of carboxylic groups within organic molecules was mentioned by others studies (Randtke, 1993 ; Lefebvre and Legube, 1990 ; Specht *et al.*, 2000). *Acidic pH* is found to be the most adequate for OM removal, since OCC values are lower at pH 6 than at pH 8 for both SHS and NHS. This is consistent with the 5-7 optimum coagulation pH range found for NOM removal by iron (III)-based coagulants (Vilgé-Ritter *et al.*, 1999; Lefebvre and Legube, 1990; Randtke, 1993). At pH 6, right from the lower coagulant dosages, all carboxylic functions are complexed. Fewer “IH” species (*i.e.* the non-reacting ones) also remain in the supernatants at this pH than at alkaline pH.

NOM removal: speciation among natural organic species

NOM removal is viewed as a stepwise process, depending on organic materials content. Among those, “humic-like” structures fully take part in the process and are functionally complexed by iron coagulant species like the synthetic model substances, obviously due to a neutralisation mechanism of the carboxylic groups. The evolution of the N/C ratio shows that at least two kinds of organic compounds are successively removed. Above OCC, due to N/C increase and to the typology of organic compounds presented here, “protein- like” materials are removed (*i.e.* precipitated) in the second step of the coagulation process. These findings are consistent with Collins *et al.* (1986) and Bose and Reckow (1998) results: the hydrophobic fraction is generally more easily destabilised than hydrophilic compounds (like protein compounds) in natural waters. It agrees with Vilgé-Ritter *et al.* (1999) who pointed out that polyhydroxyaromatics were easier to remove by ferric chloride

than polysaccharides. Py/CG-MS results confirm these findings. To discuss the differences observed between NOM and synthetic substances quantitative Py/CG-MS evolution on the one hand, and on natural substances extracted from associated suspended river matter on the other, some assumptions could be proposed, as referenced in Jung (2004). Differential conformational change due to “peptid-like” assemblies found in NHS structures account for different charge densities and colloidal structural association with the ferric coagulant. Due to higher amount of phenolic OH groups in natural substances, even partial deprotonation of these organic moieties may result in electrostatic repulsion leading to conformational modifications of the macromolecules, and thus to less dense structures, as observed by TEM. The conformational changes previously mentioned could affect the shape (bond angles, coordination sites) of the coagulant species, as mentioned by Vilgé-Ritter *et al.* (1999). Thus, different organic ligands (mono- or multidentate) and different coagulant species (mono- or multidentate) induce different subunits aggregate sizes.

Fe/C, Ca/C and Na/C elemental ratios: coagulation mechanisms and pH-dependant cationic exchange

The hydrolysis kinetics for the formation of coagulant polycations especially depends on the pH conditions (acidic or alkaline). This leads to different structures, sizes and nature of colloids (Rose *et al.*, 1998). Highly positively charged hydrolysed coagulant species first neutralise the negatively charged organic sites, up to a saturation concentration limit determined by the size of coagulant species (Vilgé-Ritter *et al.*, 1999). In this study, Fe/C helps to elucidate the coagulation mechanism steps for organic aggregates containing iron.

For SHS and NHS samples *at alkaline pH*, each carbon atom needs three iron atoms to form aggregates species in the first step of the coagulation mechanism (below OCC). Bernhardt *et al.* (1985) found a Fe/TOC constant weight-ratio of about 3 (equivalent 0.6 elemental atomic ratio) by coagulation of allogenetic matter with ferric chloride at pH 6.4-6.6. This is in agreement with the mean Fe/C atomic elemental ratio found in the present work and with previous results on iron-containing natural colloids. This suggests that the complexation of Fe by organic matter hinders the hydrolysis to an oligomeric stage (Rose *et al.*, 1998). Thanks to Fe K-edge XANES measurements, Vilgé-Ritter *et al.* (1999) showed that each Fe atom within flocs issued from the coagulation of NOM by iron chloride forms on average two or three (3 Fe-O-C) bonds, thus blocking the growth sites on iron octahedral environment. The EXAFS study revealed that organic matter was strongly complexed with iron (III), thus limiting Fe hydrolysis to the trimer stage, without influencing the Fe speciation. Trimeric iron

species could also act as charge neutralisation agents in the first step of OM removal. At alkaline pH, the second step of coagulation was detected by Fe/C strong decrease above OCC. Above this concentration, iron incorporation in the organic aggregates could correspond to adsorption of organic molecules onto Fe hydroxides (Johnson and Amirtharajah, 1983; Dempsey *et al.*, 1984). Ca/C, Fe/C and Na/C comparative evolutions suggest a cationic exchange on the organic matter carboxylic groups. Calcium, mostly coming with coagulant addition since no calcium is initially present in SHS, is the counter-ion which has the highest affinity for negatively charged organic species. Quantitatively, since the coagulant contains at maximum 1% Ca (w/w), an addition of 5.10^{-4} M of iron corresponds to a simultaneous addition of about 1 ppm of calcium. During coagulation, calcium ions are replaced by hydrolysed iron species. The sodium ion, smaller than calcium or iron species, is introduced with complexing groups, especially within the transition coagulant concentration range between charge neutralisation and adsorption mechanisms. This is consistent with usual size effect and electrostatic interactions rules (Atkins, 1996)

At pH 6, the Fe/C ratio value determined, close to 1 near the OCC, is consistent with Van Breemen *et al.* (1979) who found a stoichiometric relationship between fulvic acid concentration, coagulant dosage and carboxylic functions. Jeckel (1986) found an aluminium polycations/humate acids constant ratio at pH 5-5.5 too. Lefebvre and Legube (1990) demonstrated the possibility of stoichiometric reactions between polyanionic fulvate molecule and polycationic hydrolysis species of iron salt at pH 5.5 thanks to a constant Fe/TOC ratio determination. According to Van Breemen *et al.* (1979), each iron (III) atom reacts with one carboxylic group on fulvic acid. However, at pH 6, the OCC determined for SHS and NHS do not correspond to the coagulant quantity required to neutralise all the anionic groups available (3.1 meq/g for SHS and 2.7 meq/g for NHS). An additional mechanism to “pure” charge neutralisation is also responsible for NOM removal at this pH too. Gradual increase of Fe/C favoured an adsorptive incorporation of hydrolysed iron on the organic materials which explains the destabilisation and the subsequent aggregation of suspended colloids after OCC (Johnson and Amirtharajah, 1983 ; Licskó, 1997). Ion-exchange reaction is more efficient at acidic pH than in alkaline condition since hydrolysis rate is lower at pH 6. Iron based coagulant species have also less aggregated subunits and can easily enter the negatively charged groups of organic materials than at pH 8. This explains why calcium cannot react with the complexing groups of OM. Calcium cannot complex the sediment organic part and is only found in the supernatant. For the same reason, sodium is

driven out from the complexing groups by coagulant species, even at very low coagulant dosages.

Conclusion

Optimum quantitative coagulant dosage depends on the pH of coagulation and on the nature of the organic matter. Physical chemical properties of organic materials were found to play a determining role in the structuring of the aggregates at the local scale.

Natural “humic-like” structures found in natural waters samples do not account for the main organic matter removal mechanism, since other mineral and inorganic species take part in the coagulation process.

The mechanism of NOM removal by iron salt is often described as being complexation with iron for pH values around 5 and adsorption of organic molecules at a pH around 7. In our experimental conditions however, cationic exchange (Ca/Na-Fe) with positive coagulant species anchoring on negatively charged carboxylic groups appears to be the main step of OM removal, regardless of the initial pH conditions.

Acknowledgments

This work was made within the frame of the programme “Zone Atelier du bassin de la Moselle”, with grants from Region Lorraine and CNRS (Contrat de Plan Etat – Région and Programme “Environnement Vie et Société). Field-centrifuge and material sample collections provided by Agence de l’Eau Rhin-Meuse are gratefully acknowledged. The authors would like to thank T. Jacquin (Agence de l’Eau Rhin Meuse, Rozerieules, France) for providing technical assistance during field measurements, A. Bruchet and G. Filippi for Py/CG-MS analysis (CIRSEE – Ondeo Service, Le Pecq, France), O. Barrès and P. Dedonato for FTIR spectroscopy measurements.

References

Andreux, F., Golebiowska, D., Metche, M., 1980. Oxydative polymerisation of O-diphenols in presence or absence of amino-acids. Topics on (catechol-glycocolle) and (catechol-diglycylglycine). General Assembly of Polyphenols Group Report, Logrono, Spain, Bulletin 9, 178-188.

Atkins, P.W., 1996. The Elements of Physical Chemistry 2nd Ed., Oxford University Press.

- Bernhardt, H., Hoyer, O., Schell, H., Lusse, B., 1985. Reaction mechanisms involved in the influence of algogenic matter on flocculation. *Z. Wass.- Abwass.- Forsch.*, 18, 18-30.
- Bose, P., Reckhow, D.A., 1998. Adsorption of natural organic matter on preformed aluminium hydroxide flocs. *J. Env. Eng.*, 803-810.
- Bruchet, A., Rousseau, C., Mallevalle, J., 1990. Pyrolysis-GC-MS for Investigating High-Molecular-Weight THM Precursors and Other Refractory Organics. *J. AWWA* 71, 66-74.
- Collins, M.R., Amy, G.L., King, P.H., 1985. Removal of organic matter in water treatment. *J. Environ. Eng.* 11, 850-854.
- Collins, M.R., Amy, G.L., Steelink, C. Molecular weight distribution, carboxylic acidity and humic substances content of aquatic organic matter: implications for removal during water treatment. *Environ. Sci. Technol.* 20, 1028-1032.
- Dempsey, B.A., Ganho, R.N., O'Melia C.R., 1984. The coagulation of humic substances by means of aluminium salts. *J. AWWA* 74, 141-150.
- Egerton, R.F., 1996. *Electron Energy-Loss Spectroscopy in the Electron Microscope*, 2nd Edition, Plenum Press, New York.
- Frøhlund, B., Palmgren, R., Keiding, K., Nielsen, P.H., 1996. Extraction of extracellular sludge using cation exchange resin. *Wat. Res.* 33, 1749-1758.
- Garnier, C., 2004. Séparation et identification par chromatographie d'exclusion stérique et micro spectrométrie infrarouge d'exopolymères de boues actives. PhD thesis, *in press*.
- Hitchcock, A.P., Urquhardt, S.G., Rightor, E.G., 1992. Inner-shell spectroscopy of benzaldehyde, terephthalaldehyde, ethylbenzoate, terephthaloyl chlorides and phosphogen: models for core excitation of poly(ethylene) terephthalate. *J. Phys. Chem.* 96, 8736-8750.
- Jeckel, M.R., 1986. Interactions of humic acids and aluminium salts in the flocculation process. *Wat. Res.*, 20, 1535-1542.
- Johnson P.N., Amirtharajah, A., 1983. Ferric chloride and alum as single and dual coagulants. *J. AWWA*, 232-239.
- Jung, A.-V., 2004. Interactions des micropolluants anthropiques avec la matière organique naturelle et devenir lors des opérations de traitement de l'eau. PhD thesis INPL, *in press*.
- Kazpard, V., 2001. Mécanismes d'agrégation d'un acide humique synthétique : influence de la nature du coagulant et conséquences sur la siccité des gâteaux de filtration. Thèse INPL 180 pp.
- Kikuna, J., Tonner, B.P., 1996. XANES spectra of a variety of widely used organic polymers at the C K-edge. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* 82, 53-60.

- Lartiges, B.S., Bottero, J.Y., Derrenger, L.S., Humbert, B., Tekely, P., Suty, H., 1997. Flocculation of colloidal silica with hydrolysed aluminium: an ^{27}Al solid state NMR investigation. *Langmuir* 13, 147-152.
- Lefebvre, E., Legube, B., 1990. Iron (III) coagulation of humic substances extracted from surface waters: effect of pH and humic substances concentration. *Wat. Res.* 24, 5, 591-606.
- Lefebvre, E., Legube, B., 1993. Coagulation-flocculation by ferric chloride of some organic compounds in aqueous solutions. *Wat. Res.* 27, 3, 433-447.
- Licksó, I., 1997. Realistic coagulation mechanisms in the use of aluminium and iron (III) salts. *Wat. Sci. Tech.* 36, 4, 103-107.
- O'Melia, C.R., 1972. Coagulation and flocculation. Physicochemical Processes for Water Quality Control., Weber, W. Jr. Ed. Wiley Interscience, New York.
- Owen, D.M., Amy, G.L., Chowdhury, Z.K., Paode, R., McCoy, G., Viscosil, K., 1995. NOM characterization and treatability. *J. AWWA* 87, 46-63.
- Packam, R.F., 1965. Some studies of the coagulation of dispersed clays with hydrolysing salts. *J. Colloid Sci.* 20, 81-92.
- Rakotonarivo, E., Bottero, J.Y., Thomas, F., Poirier, J.E., Cases, J.M., 1988. Electrochemical modelling of freshly precipitated aluminium-hydroxide electrolyte interface. *Colloids Surf.* 33, 191-207.
- Rakotonarivo, E., Tondre C., Bottero, J.Y., Malleval, 1989. Polymerized and hydrolysed aluminium (III) complexation by salicylate ions. Kinetic and thermodynamic study. *Wat. Res.* 23, 1137-1145.
- Randtke, S.J., 1993. Coagulation of NOM : An Overview of the science and U.S. Practice. NOM in drinking water, origin, characterization and removal, Workshop Proceedings of AWWA about Natural Organic Matter in Drinking water, AWWA Research Foundation Ed. 155-163.
- Rose, J., Vilgé A., Lauquet-Olivie, G., Masion, A., Frechou C., Bottero, J.Y., 1998. Iron speciation in natural organic matter colloids. *Colloids Surf., A. Physiochem. Eng. Aspect* 136, 11-19.
- Semmens, M.L., Field, T.K., 1980. Coagulation: experiences in organics removal. *J. AWWA* 72, 476-483.
- Specht, C., Kumke, M., Frimmel, F., 2000. Characterization of NOM adsorption to clay minerals by size exclusion chromatography. *Wat. Res.* 34, 16, 4063-4069.
- Stevenson, I.L., Schnitzer, M., 1982. Transmission electron microscopy of extracted fulvic and humic acids. *Soil Science* 133, 3, 179-185.
- Stumm, W., O'Melia, C.R., 1968. Stoichiometry of coagulation. *J. AWWA* 60, 514-539.

Thurman, E.M., Malcolm, R.L., 1981. Preparative isolation of aquatic humic substances. *Env. Sci. and Technol.* 15, 463-466.

Van Breemen, A.N., Nieuwstad, T.J., Van der MeentOlieman, 1979. The fate of fulvic acids during water treatment. *Wat. Res.* 13, 771-780.

Varlot, K., Martin, J.M., Quett, C., 1998. Physical and chemical changes in polystyrene during electron irradiation using EELS in the TEM: contribution of the dielectric function. *J. Microscopy* 191, 187-194.

Vilgé-Ritter, A., Rose, J., Masion, A., Bottero, J.-Y., Lainé, J.-M., 1999. Chemistry and structure of aggregates formed with Fe-salts and natural organic matters. *Coll. and Surf.* 147, 297-308.

Villemin, G., Mansot, J.L., Watteau, F., Ghanbaja, J., Toutain F., 1995. Etude de la biodégradation de la matière organique végétale du sol par la spectroscopie des pertes d'énergie d'électrons transmis (EELS: Electron Energy Loss Spectroscopy): répartition du carbone, de l'azote et évaluation du rapport C-to-N au niveau ultrastructural *in situ*. C.R. Académie des Science Paris 321 IIa, 861-868.

Watteau, F., Villemin, G., Mansot, J.L., Ghanbaja, J., Toutain, F., 1996. Localization and characterization by electron energy loss spectroscopy (EELS) of the brown cellular substances of beech roots. *Soil Biol. Biochem.* 28, 10/11, 1327-1332.

Figures captions

Figure (1) Second derivatives EELS spectra.

Figure (2) Jar-tests results for both organic materials at pH 6 and 8.

Figure (3) TEM photos for coagulated OM.

SHS pH 8 (b) SHS pH 6 (c) NHS pH 8 (d) NHS pH 6).

Figure (4) TEM coupled techniques (C-K EELS, TEM photos and EDXS) for NOM's speciation.

“Organo-mineral” species

“Polysaccharid-like” substances

“Humic-“ and “protein-like” materials

Figure (5) EELS spectra for humic substances coagulation by iron.

Figure (6) Elemental N/C, Fe/C, Na/C and Ca/C atomic ratio combining EDXS and EELS results during coagulation.

Figure (7) EEL spectra for “humic-like” NOM materials coagulated by iron.

Tables

Table 1. Characteristic binding energies deduced from the second derivative calculations on C-K EELS spectra.

Table 2. Optimum Coagulant (iron) Concentrations (OCC) determined by jar-test procedures.

Table 3. Coagulated NOM, synthetic (SHS) and natural (NHS) humic-substances Py/CG-MS quantitative results for 3 critical iron concentrations.

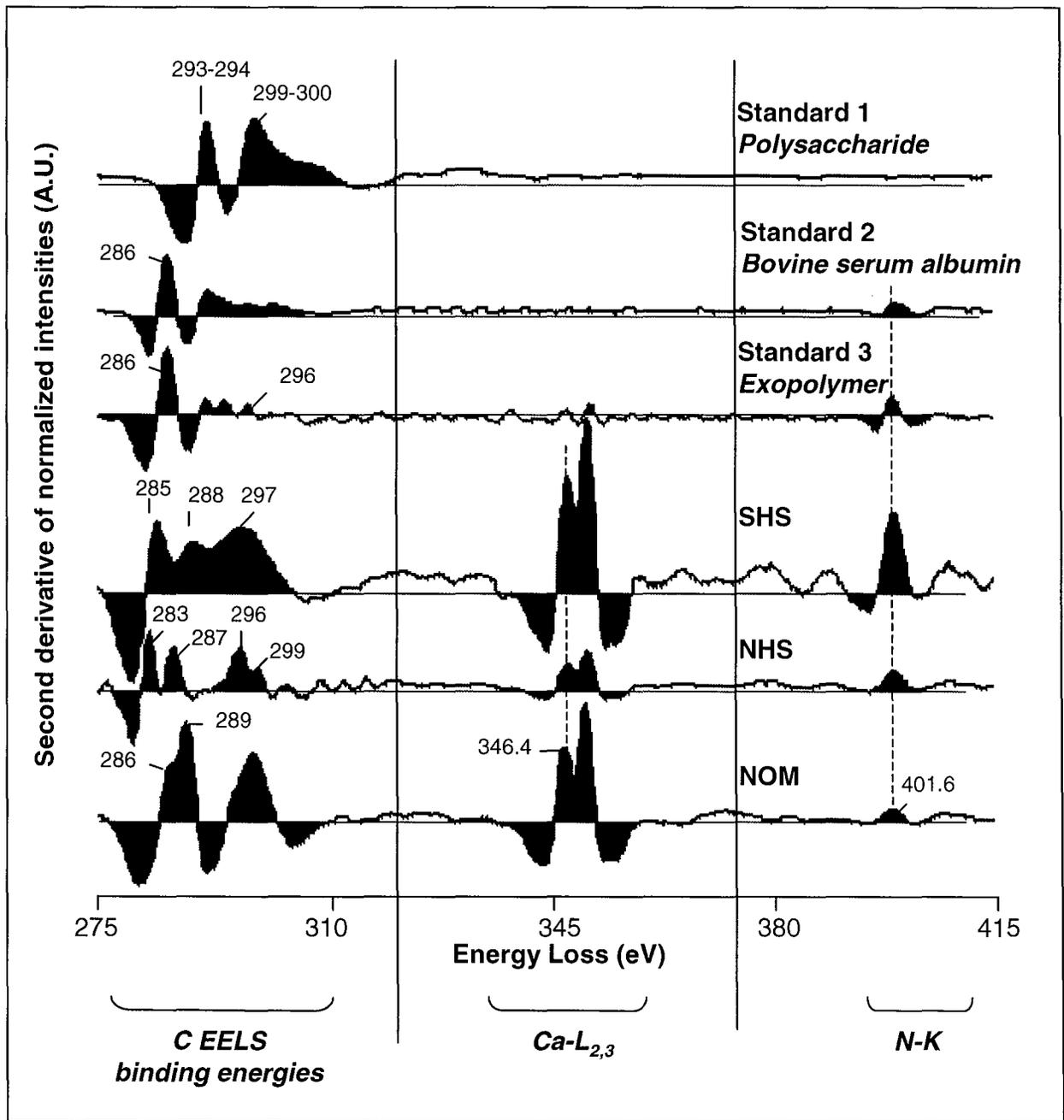


Figure (1)

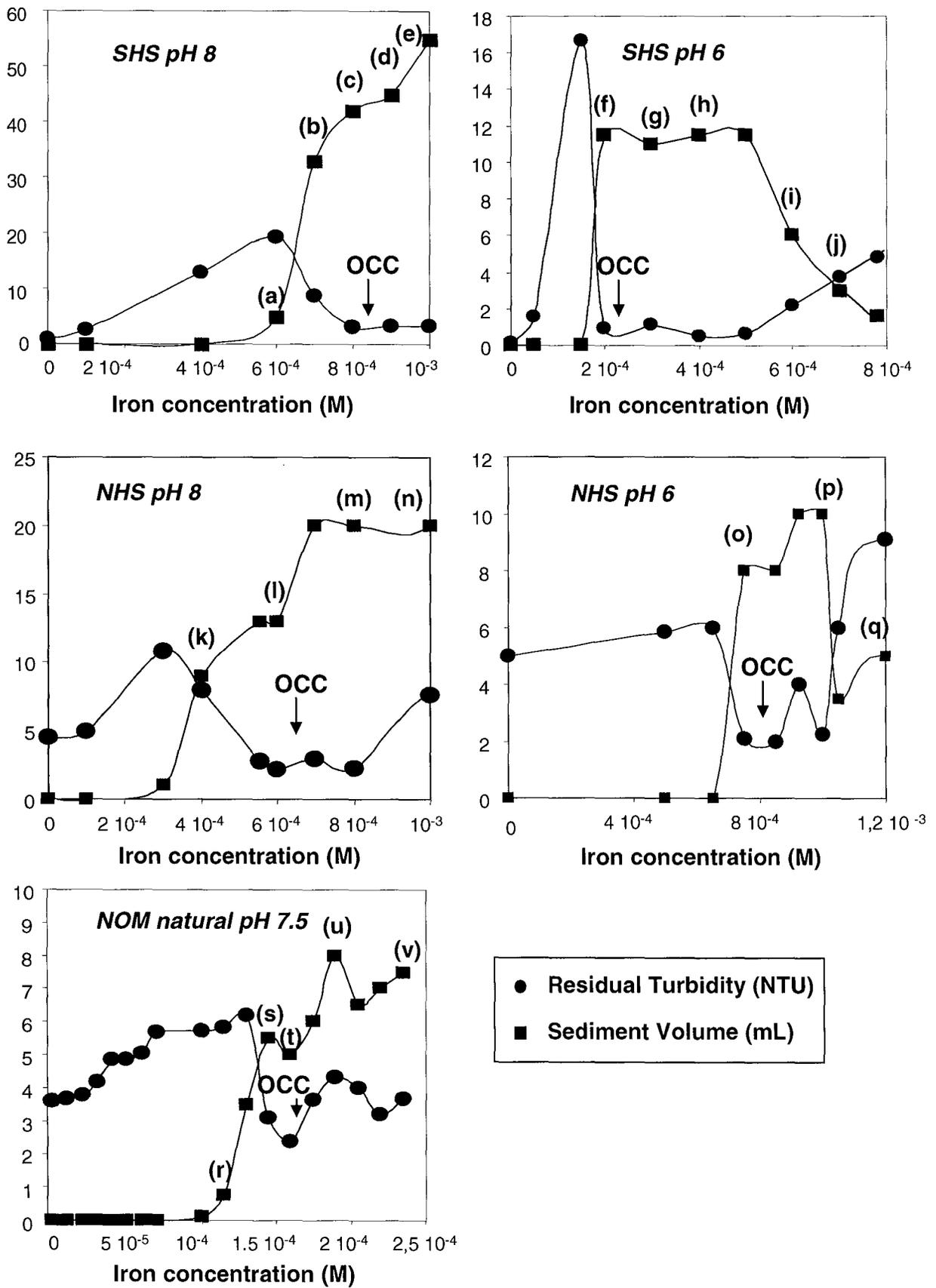


Figure (2)

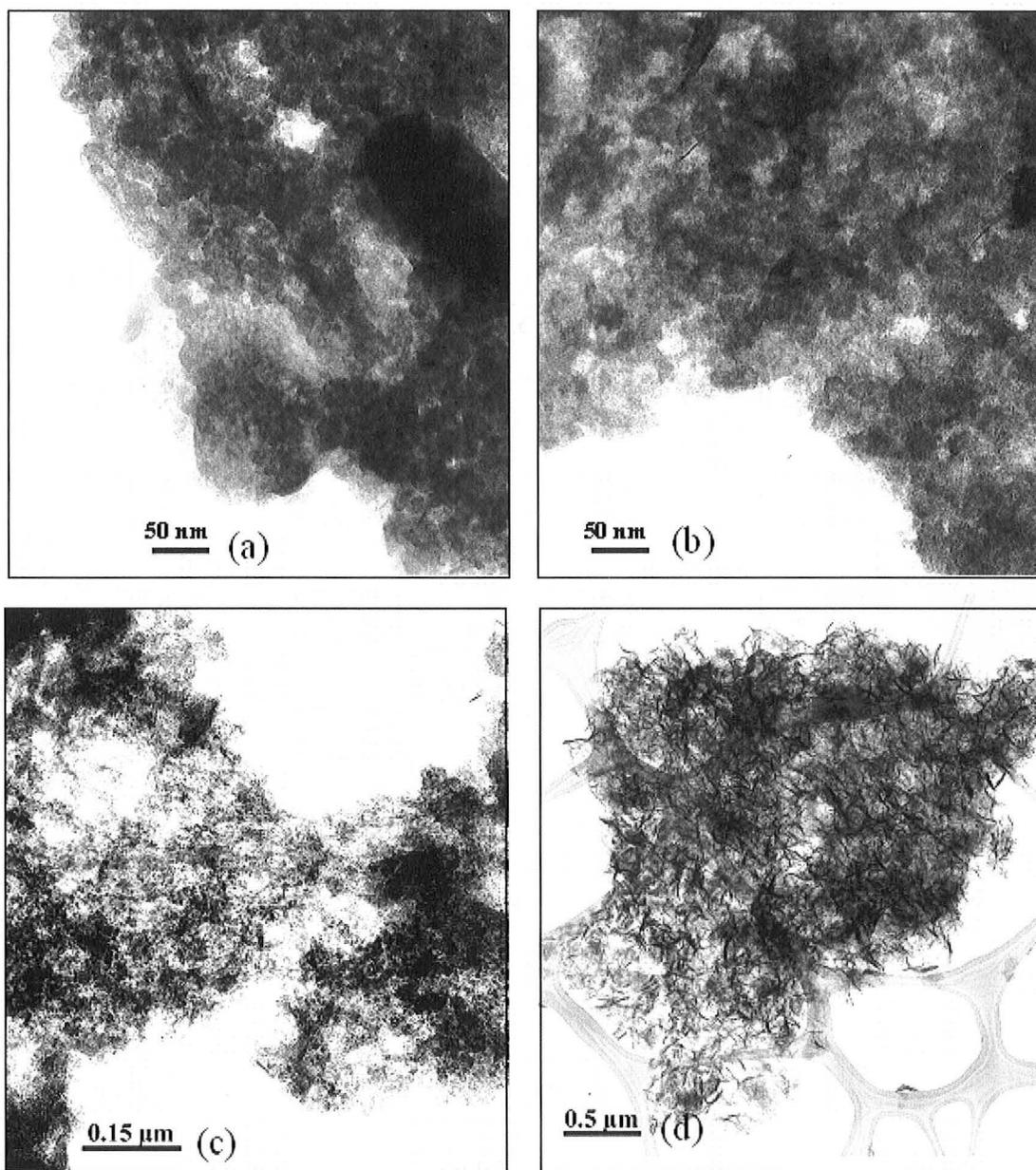


Figure (3)

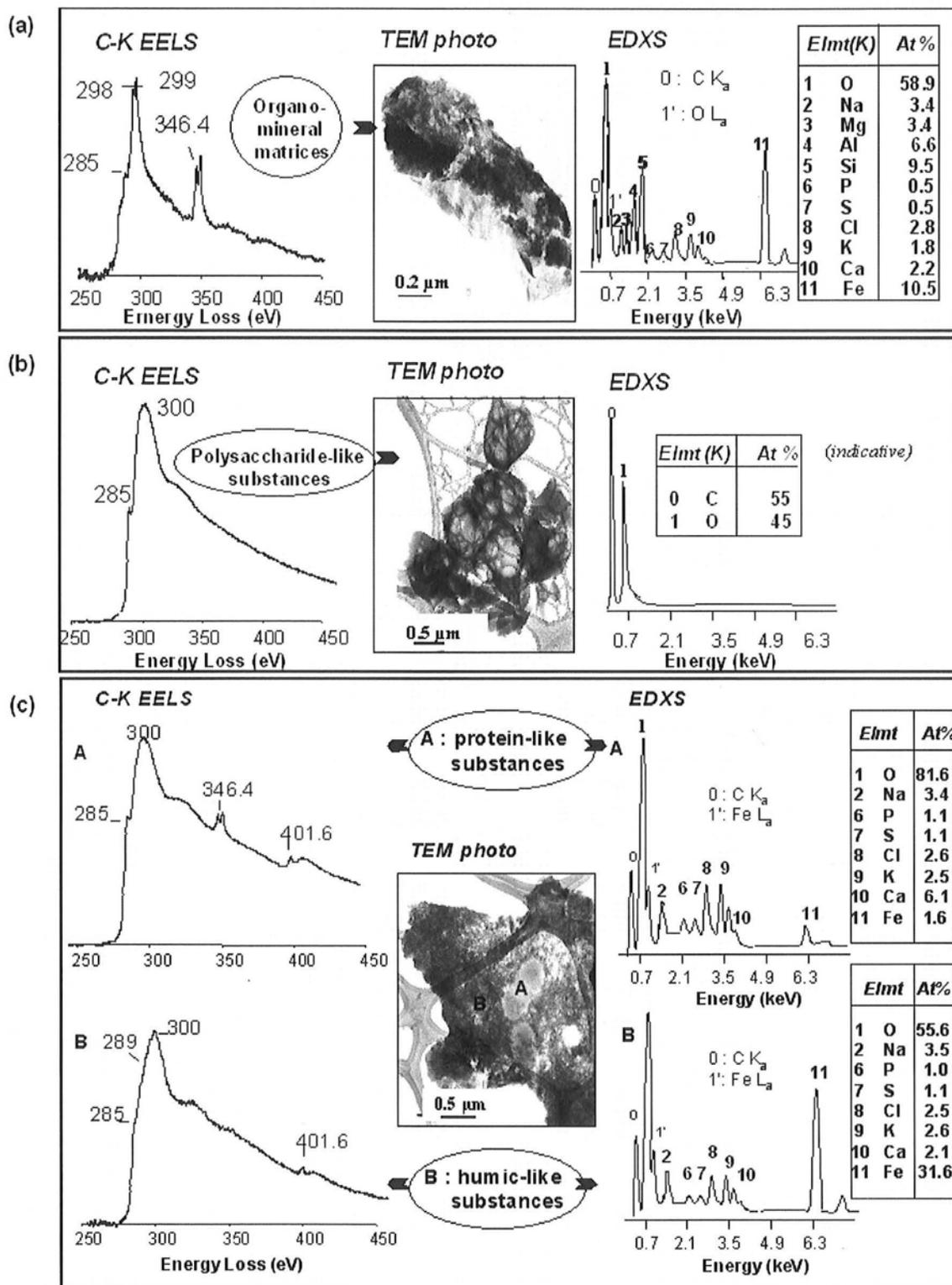


Figure (4)

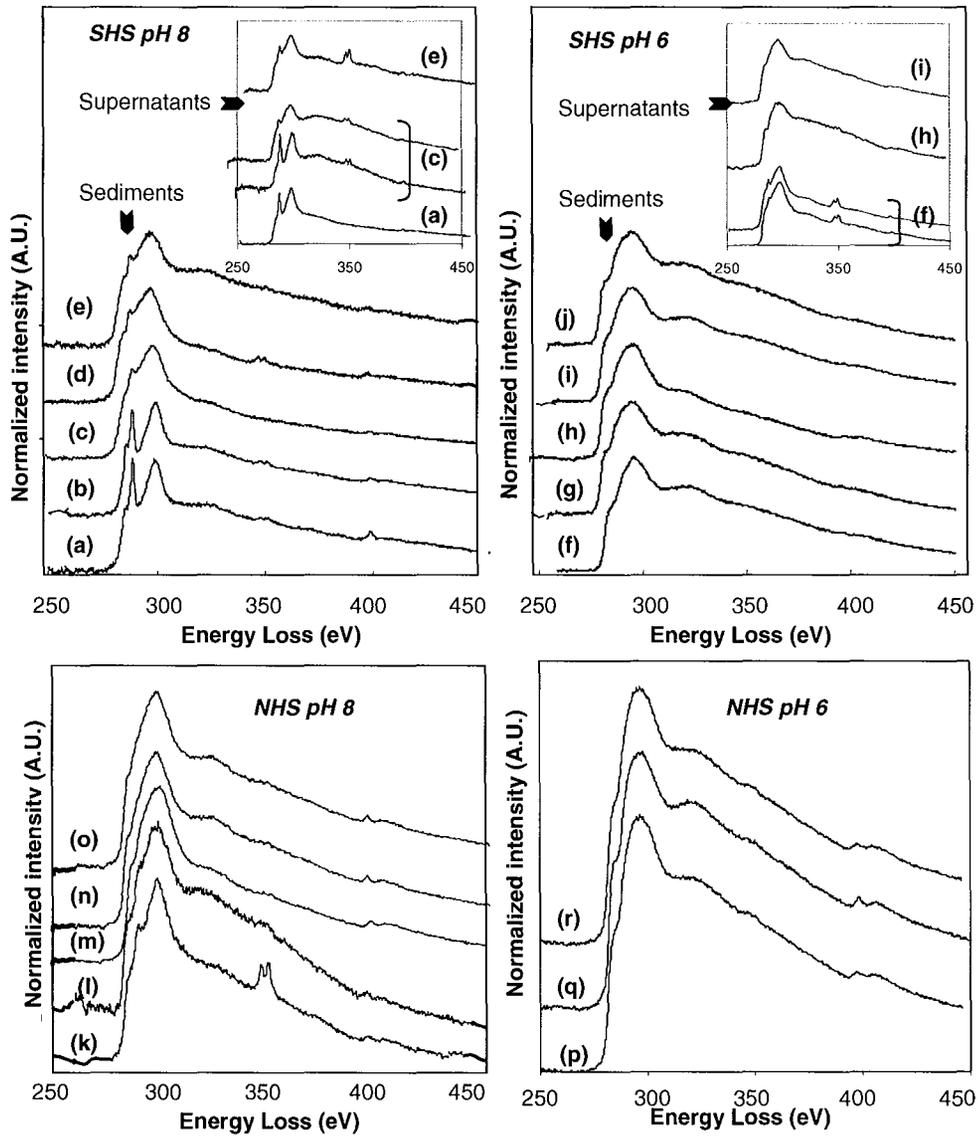


Figure (5)

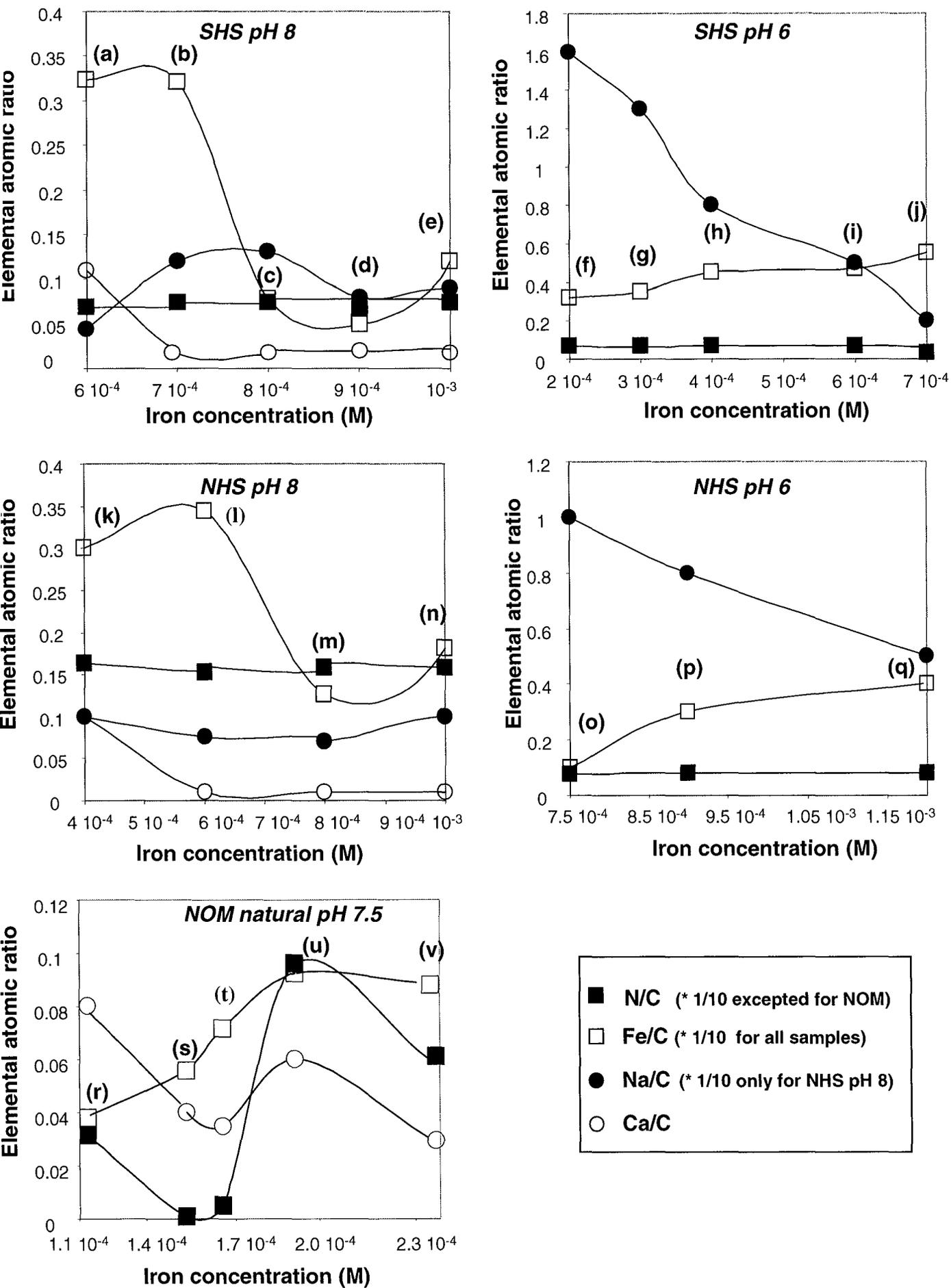


Figure (6)

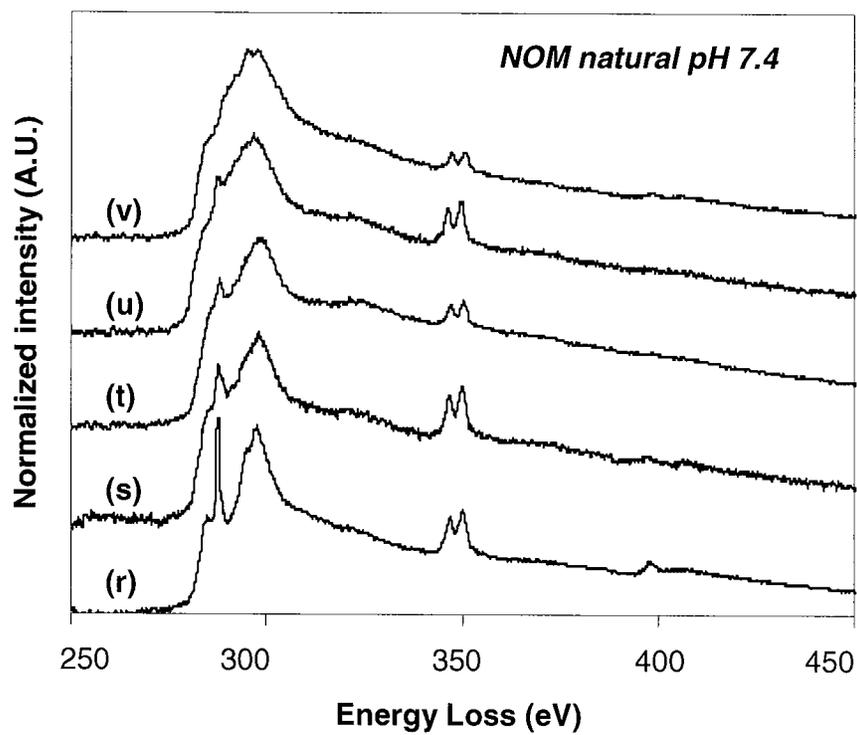


Figure (7)

Table 1.

Energy (eV)	Assignment	Representative sample
283 285	$C1s \rightarrow \pi^*$ (C=C)	NHS SHS
286	$C1s \rightarrow \sigma^*$ (C-H)	Albumin Exopolymer Coagulated NOM
287 288-289	$C1s \rightarrow \pi^*$ (C=O)	NHS Coagulated NOM, SHS
293-294	$C1s \rightarrow \sigma^*$ (C-C)	Polysaccharide
296	$C1s \rightarrow \sigma^*$ (C-N)	Expolymer, NHS
297-299	$C1s \rightarrow \sigma^*$ (ring)	NHS, SHS
299-300	$C1s \rightarrow \sigma^*$ (C-O)	Polysaccharide

Table 2.

OCC	pH 8.0		pH 6.0		pH 7.4
	SHS	NHS	SHS	NHS	NOM
Molar concentration (mol/L)	$8.3 \cdot 10^{-4}$	$6.4 \cdot 10^{-4}$	$2.2 \cdot 10^{-4}$	$8.1 \cdot 10^{-5}$	$1.7 \cdot 10^{-4}$
«Reduced» concentration (mg Fe/mg C_{org})	3.83	2.69	1.01	0.34	1.02

Table 3.

Sample	Iron concentration	Polysaccharides	Proteins	Aminosugars	Polyhydroxyaromatics
SHS	7.0 10 ⁻⁴ M (b)	1%	2%	0%	97%
	8.0 10 ⁻⁴ M (c)	13%	21%	1%	65%
	1.0 10 ⁻³ M (e)	0%	1%	0%	99%
NHS	4.0 10 ⁻⁴ M (k)	23%	37%	3%	37%
	6.0 10 ⁻⁴ M (l)	24%	22%	10%	43%
	1.0 10 ⁻³ M (n)	20%	33%	4%	43%
NOM	1.1 10 ⁻⁴ M (r)	14%	8%	2%	40%
	1.6 10 ⁻⁴ M (t)	29%	13%	2%	30%
	2.3 10 ⁻⁴ M (v)	33%	0%	0%	67%

V.2.

ARTICLE 4

Manuscrit soumis aux Comptes-Rendus de
l'Académie des Sciences de CHIMIE/nanosciences
Short review submitted to Comptes Rendus Chimie Publisher

**Iron populations evolution during organic matter coagulation
by a nitrate salt:
Electron Energy-Loss Spectroscopy (EELS) and Mössbauer investigations**

*Evolution des espèces de fer durant la coagulation de la matière organique
par un sel de nitrate:
comparaison entre les spectroscopies de perte d'énergie et Mössbauer*

A.-V. JUNG^{1*}, V. CHANUDET², J. GHANBAJA³, B.S. LARTIGES¹, M. ABDEMOULA⁴,
J.-L. BERSILLON¹

*corresponding author : phone : (0033)632464105
fax: (0033)389647787
email:av1jung@hotmail.com

¹Laboratoire Environnement et Minéralurgie (LEM), UMR 7569 CNRS-INPL-ENSG,
15 avenue du Charmois, BP 40, 54501 Vandœuvre, France

²Département de Chimie Analytique et Biophysico-chimie de l'environnement (CABE),
30 quai E. Ansermet, CH-1211 Genève, Suisse

³Service Commun de Microscopie Electronique par Transmission, Université Henry
Poincaré, BP 239, 54506 Vandoeuvre, France

⁴Laboratoire de Chimie-Physique et Microbiologie de l'Environnement (LCPME),
54 600 Villers-lès-Nancy, France

Abstract A physical-chemical investigation on coagulated organic matter sediments obtained by the jar-test procedure was carried out by Electron Energy Loss Spectroscopy (EELS) at Fe-L₃ edge and by Mössbauer spectroscopy. Raw water natural organic matter (NOM) from Moselle river (France), natural humic acids extracted from suspended matters (NHS) and a synthesized humic-like polymer (SHS) prepared in the laboratory were coagulated with iron nitrate. Fitting of the Fe-L₃ edge (EELS) after deconvolution and baseline treatment shows organic matter nature dependant evolutions as a function of coagulant dosage. This technique could also be used to discriminate iron populations in different kinds of organic material and could also be useful to distinguish between iron sites reactivities for individual nanometric particles of aggregated NOM.

Keywords: Coagulated NOM, Iron populations, EELS, fitting treatment, Mössbauer.

Résumé Des sédiments obtenus par coagulation (procédure de jar-tests) de matière organique avec le nitrate ferrique (opération principale de traitement de l'eau) ont été analysés par spectroscopie de perte d'énergie au seuil L₃ du fer et par spectroscopie Mössbauer. De la matière organique naturelle (MON) d'eau de rivière (Rivière Moselle, France), des extraits naturels de substances humiques aquatiques (NHS) issus de matière en suspension et une fraction d'un acide humique synthétique (SHS) préparée au laboratoire, ont été coagulés avec du nitrate ferrique. Un ajustement par déconvolution mathématique des spectres de perte d'énergie ont montré une évolution spécifique au type de matière organique coagulée, suivant la concentration en coagulant. Cette technique pourrait être utilisée pour différencier différentes populations d'espèces de fer hydrolysées coagulées avec la MON à l'échelle nanométrique.

Mots-clés: MON coagulée, Populations d'espèces à base de fer, Spectroscopie de perte d'énergie, Traitement par déconvolution, Spectroscopie Mössbauer.

Version française abrégée

La connaissance mécanistique de l'élimination de la MON par coagulation repose sur des résultats liés à l'utilisation de techniques globales, le plus souvent macroscopiques. Or le statut à l'échelle nanométrique de la matière organique et des espèces hydrolysées du coagulant utilisé lors des opérations de traitement de l'eau est nécessaire à la compréhension des mécanismes moléculaires (échanges ioniques, adsorption, hydrolyse...).

Cette étude, réalisée en comparant les résultats obtenus pour trois types de matériaux organiques coagulés par le fer (MON d'eau brute de rivière, extraits naturels de substances humiques (NHS) et substances humiques synthétiques (SHS)), présente une approche de mise au point expérimentale visant à comparer et à corréler les résultats obtenus par deux techniques spectroscopiques : la spectroscopie de perte d'énergie du seuil L₃ du fer ([1]-[3]), intégrant les résultats d'études précédentes ([4]) et Mössbauer ([5]). La spectroscopie de perte d'énergie, encore sous-employée actuellement, a récemment donné lieu à des perspectives intéressantes de travail dans le domaine des sciences de l'environnement ([6]).

Les substances humiques synthétiques et naturelles ont été caractérisées par ailleurs ([7]-[9]); des résultats utilisant la spectroscopie de perte d'énergie au seuil K du carbone sur l'ensemble des matériaux ici présentés ont été décrits précédemment ([7]). Le coagulant utilisé est du nitrate ferrique $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ (95% pureté) de Sigma-Aldrich (Lyon, France). Une solution à $5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ a été ajustée à pH 8 et s'est hydrolysée dans les mêmes conditions de jar-test que celles choisies en présence de matière organique. Pour la coagulation des matériaux organiques, trois concentrations en coagulant (1 : avant l'optimum ; 2 : à l'optimum et 3 : après l'optimum de concentration en coagulant) ont été choisies. Les sédiments obtenus ont été lyophilisés puis analysés après traitements mathématiques ([10],[11]) par spectroscopie de perte d'énergie (système d'acquisition 666 de GATAN (Pleasanton, CA, EU) rattaché à un microscope électronique à transmission Phillips

(CM20, Amsterdam, Pays-Bas) et de système d'exploitation Gatan EL/P 2.1 PEELS. Un algorithme de Levenberg-Marquardt (35% lorentzienne- 65% gaussienne) a été utilisé pour décomposer les bandes Fe-L₃ en trois sous-bandes L_{3a}, L_{3b}, L_{3c} d'aires respectives A_{3a}, A_{3b} et A_{3c}. Le spectromètre Mössbauer (source 50-mCi de ⁵⁷Co dans Rh) a permis l'acquisition de spectres à 298 K pour tous les échantillons et à 77 K pour les extraits de substances humiques naturelles et le coagulant.

Les résultats obtenus par spectroscopie de perte d'énergie respectivement pour les espèces de fer hydrolysées coagulées et en présence des 3 matériaux organiques sont présentées **fig. 1** et **fig. 2** et les résultats correspondant des calculs de déconvolution (aires des pics) sont respectivement donnés dans les **Tableau 1** et **2**, contenant également l'ensemble des paramètres issus de la décomposition Mössbauer. Par cette dernière spectroscopie, tous les spectres à 298K se composent de doublets (C₁ et C₂) présentés à la **fig. 3**, ne donnant lieu à aucune évolution paramétrique significative suivant la concentration en coagulant. La **fig. 4** présente les spectres Mössbauer à 77K. Pour le coagulant, aucune modification n'est enregistrée à cette température par rapport à 298K. La population en fer du coagulant seul est donc homogène et ne subit aucune variation dans ses propriétés magnétiques. Pour les échantillons de matière organique cependant, des sextets montrant des populations d'abondance variable suivant la concentration en coagulant utilisée, suggèrent la présence d'espèces ferriques présentant un ordre magnétique (configuration fer octaédrique complexe Haut Spin, [13],[14]).

Pour la MON contenue dans l'eau brute de rivière et celle d'origine synthétique (SHS), les aires A_{3a} et (A_{3b} + A_{3c}) obtenues par spectroscopie de perte d'énergie suivent respectivement l'évolution des paramètres Mössbauer C₁ et C₂ à 298 K. Pour les substances humiques naturelles, une évolution opposée est constatée. En corrélant ces résultats avec ceux obtenus par spectroscopie de perte d'énergie au seuil K du carbone (mesure de l'intensité de

la bande exprimant la fonction carbonyle impliquée dans le mécanisme de coagulation, [7]), nous constatons que l'évolution entre la MON et les SHS pour ce dernier paramètre était similaire (**fig. 5**). D'autre part, le paramètre A_{3a} décrivant par spectroscopie de perte d'énergie une population de fer présente une évolution plus discriminante de ces espèces que la paramètre Mössbauer C_1 .

Les perspectives ouvertes par ce type de recherche et le couplage de ces deux techniques pourrait aider à discriminer à l'échelle locale les différentes espèces de fer ou de sites de fer ([15]-[19]) et ainsi de comprendre le complexe matière organique-coagulant au cours de son évolution en traitement de l'eau.

Introduction

Removal of NOM by coagulation using hydrolysed iron or aluminium salts followed by filtration or activated carbon adsorption appears as an issue in water treatment process. It has been pointed out that only a few investigators have studied the iron status for Fe-NOM aggregates during coagulation water-treatment process. Indeed, while bulk analysis enabling the determination of overall chemical properties of NOM are frequent, only few techniques allow the direct measurement of the properties of individual macromolecules or macromolecular aggregates.

In the recent years, a lot of researches about 3d-transition metals have been performed by studying L-edge spectra ([1]-[3]). Spectroscopies like Extended X-Ray Absorption Fine Structure (EXAFS) or Mössbauer have also been developed on natural samples ([4]-[5]). However, they are rather time-consuming and analytically heavy to use. Electron energy-loss spectroscopy (EELS) can be used to get information on the d-states even from a small region of a specimen. Recently, EELS was used at Fe(L₃) edge to investigate and quantify the valence of iron in clays ([6]). FeO, Fe₂O₃ and Fe₃O₄ iron oxides were used as references ([7]) to establish a deconvolution fitting procedure to calculate iron valence in complex clays mixture minerals.

We have chosen to compare results between raw water NOM, natural and synthetic humic-like substances. A carbon (K) EELS investigation was performed on the same samples and was presented elsewhere ([8]). In the current work, iron speciation was obtained by EELS fitting treatment and Mössbauer spectroscopies.

1. Experimental section

1.1. Humic substances

Synthetic humic substances were prepared by oxidation of catechol with glycine ([9]). The detailed preparative synthesis procedure was described elsewhere ([8]). Natural humic acids were extracted from suspended river matters collected from the field (Moselle River, Nancy, France) according to the International Humic Substances Society (IHSS) standard procedure ([10]). Water samples from the Moselle River containing NOM were collected from the field and directly used in jar-test procedures. From the carbon K-edge measurements, the carboxyl moieties were found to be the main functional groups involved in the coagulation process, with significant different behaviours evolutions among organic matter samples ([8]).

1.2. Coagulant

Reagent grade $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ (95% pure) was purchased from Sigma-Aldrich (Lyon, France). To obtain the coagulant hydrolysed solid compound, we have prepared a $5 \cdot 10^{-4}$ M iron solution (pH 8) which was stirred to self-hydrolyse. The sediment was freeze-dried and used in the spectroscopy conditions described in one following paragraph.

1.3. Jar-test procedure

The detailed procedure of preparation of coagulated OM by ferric nitrate at pH 8 was described in [8] All the aggregates formed were left for settling after coagulation, freeze-dried and finally examined by the EELS and Mössbauer techniques. Three different concentrations were chosen (1: below the optimum coagulation concentration (OCC), 2: at the OCC and 3: above the OCC). No sufficient amount of raw water NOM and synthetic humic acid coagulated with iron were obtained to perform Mössbauer spectroscopy analysis below OCC.

1.4. Electron Energy-Loss Spectroscopy (EELS)

Freeze-dried organic matter samples coagulated with iron (III) salt were prepared for EELS investigation by ultrasonic dispersion in ethanol and deposition of one drop of the suspension on copper-coated carbon grids purchased from Euromedex (Mundolsheim, France). For each iron concentration used (1, 2 and 3), fifteen spectra on 15 distinct aggregates were obtained using a 666 GATAN (Pleasanton, CA, US) parallel electron energy-loss spectrometer attached to a Phillips (CM20, Amsterdam, the Netherlands) transmission electron microprobe operated at 200 kV with an unsaturated LaB₆ cathode. A spectrometer entrance aperture of 2 mm, a collection half angle of 10 mrad, an energy dispersion of 0.1 eV per channel were chosen as experimental conditions. The energy resolution, measured at the full width at half maximum (FWHM) of the zero-loss peak is 1.2 eV. All measurements were performed at 298 K. Spectra were analysed with a Gatan EL/P 2.1 PEELS software. The low energy-loss spectrum was used to remove the multiple- inelastic- scattering effect in the core-loss region using Fourier-ratio deconvolution method ([11]). Each spectrum was recorded by fixing the energy of the Fe-L₃ edge maximum at 711.0 eV ([12]). Background intensity extrapolated from the pre edge region is removed and baseline Gatan EL/P 2.1 PEELS software treatment was applied. The Fe-L₃ edge were fitted with three band components L_{3a}, L_{3b} and L_{3c} ([7]). Fitting of the Fe-L₃ edge and peaks areas calculus (respectively A_{3a}, A_{3b} and A_{3c} for L_{3a}, L_{3b} and L_{3c}) were performed in the range 710.0 to 725.0 eV using Opus software® Bruker (Billerica, MA, US). A Levenberg-Marquardt algorithm was applied, the band position, shape (35% Lorentzian- 65% Gaussian) and intensity were free. For all deconvolution procedures, standard errors for areas determinations were less than 1%.

1.5. Transmission Mössbauer Spectroscopy

Mössbauer spectra were collected at the LCPME laboratory (Villers-lès-Nancy, France). A ^{57}Co source embedded in an Rh matrix was used, mounted on a constant acceleration drive, with metallic $\alpha\text{-Fe}$ for calibration. The system was sealed in a cryogenic workstation (Cryo Industries of America®) at low temperature under N_2 gas to minimize re-oxidation of reduced samples. Spectra were recorded at 298 and 77K and analysed by χ^2 minimization using Lorentzian-shape lines widths to account for spectral asymmetry ([13]).

2. Results and discussion

The deconvolution fitting method is presented for the hydrolysed iron salt (*i.e.* the coagulant) in **fig. 1**. Coagulant peaks areas decomposition results are presented in **Table 1** (298 and 77K). The results obtained for the three organic matter components (synthetic humic substances, raw-river water and natural humic substances) for the 3 distinct iron concentrations (1, 2 and 3) are represented in **fig. 2** for the Fe- L_3 peak fitting analysis at 298 K and in **Table 2** for peaks areas (respectively Table 2a, 2b and 2c). The corresponding L_{3a} , L_{3b} and L_{3c} peaks positions remain constant with a good reproductibility regardless of the coagulated matter origin. After the fitting treatment applied to EELS spectra, all maxima peaks positions were respectively calculated at 710.0, 711.5 and 714.0 +/- 1 eV. The standard error was found to be lower than the Transmission Electronic Microscope resolution. Peak area at 298 K is significantly different, depending on the organic matter origin. For synthetic substance, A_{3a} was found to continuously increase with increasing iron concentration, whereas it decreased for raw-river coagulated NOM. For these two samples, opposite results were found for ($A_{3b} + A_{3c}$). Natural humic substances EELS peaks areas quantifications show a variable evolution with iron concentration.

All Mössbauer spectra at 298 K consist of two quadrupole-splitting doublets (C_1 and C_2) with evolutive areas (**fig. 3** for natural humic substances spectra ; **Table 2** for C_1 and C_2 quantitative results). All other Mössbauer parameters (Center Shift (CS), Quadrupole Splitting (QS) and half width of the corresponding peaks (w)) are summarized in **Table 2**. At 298K, neither significant center shift, nor quadrupole splitting, nor half width differences were obtained for all organic matter compounds, whatever iron concentration in the initial solution was. The three iron-coagulated natural organic matter Mössbauer spectra recorded at 77 K are presented in **fig. 4**. At low temperature (77K), one additional six-peak component (sextet S_1) has appeared for the two lower iron concentrations and four ones for the higher concentration (sextets S_1 , S_2 , S_3 , S_4). Corresponding quantitative Mössbauer deconvolution results for natural organic matter at 77K are presented in **Table 2d**. No change for coagulant Mössbauer parameters spectrum was obtained at 77K. The CS and QS doublets typical values are all consistent with paramagnetic parameters usually found for Fe^{III} octahedral coordinated high-spin complexes ([14]). The presence of the sextets at low temperature is typical for magnetically-ordered species ([14]). Moreover, the high magnetic hyperfine value (H) and the high half width of the two doublets peaks (w) determined are consistent with a poorly-crystallized species ([15]).

The non-evolution in coagulant spectrum for the two temperature Mössbauer acquisitions proves the existence of one unique iron specie. The presence of two kind of doublets suggests the existence of two sites for Fe^{III} , that is to say two different iron sites populations or a distribution of quadrupole splittings. We have chosen to take this hydrolysed specie as a reference for our comparative and quantitative study in presence of organic matter. We have also respectively attributed A_{3a} and ($A_{3b} + A_{3c}$) EELS fitting results to C_1 and C_2 Mössbauer areas parameters, according to the correlation obtained for the coagulant alone (**Table 1**). For raw-water coagulated NOM and synthetic humic substances, A_{3a} and

($A_{3b} + A_{3c}$) respectively followed C_1 and C_2 evolutions at 298 K, by increasing iron concentrations (**Table 2a** and **Table 2b**). For natural humic substances, the opposite evolution was observed with Mössbauer data obtained from 298 K measurements. However, the previous attributions could be correlated between EELS and Mössbauer results at 77K. C_1 Mössbauer area seems to be also quantitatively “over-estimated” at room temperature due to magnetically-ordered species (sextets), which are not detected at this temperature and contribute to the deconvolution analysis. On the contrary, EELS decomposition treatment could detect the different iron populations right from room-temperature measurements.

Eventually, what is interesting to debate is the differentiating Fe (EELS-Mössbauer) correlations obtained between the three organic matter samples. **Fig. 5** shows A_{3a}/C_1 and evolutions and C (K) EELS results ([8]) with increasing iron concentration (arrows) for the 3 organic materials here presented. The regions of A_{3a} and C_1 evolutions are closer between NOM and SHS than between NOM and NHS (and SHS and NHS). Moreover, by comparing the deconvolution parameters, A_{3a} , obtained by EELS, is viewed more discriminating between organic materials than the Mössbauer one (C_1). At the local scale, iron-based EELS could also be viewed as a more selective spectroscopic technique for such heterogeneous organic samples. These behaviours could be correlated here with C (K) EELS results. Indeed, as far as carbon edge was concerned, a similar coagulation mechanism (involving carboxylic organic matter groups) was proposed for synthetic humic substance and some of raw-water NOM species. Natural humic substances present a strong differentiate behaviour since their carboxylic moieties were found to be complexed with iron right from low coagulant doses. These findings were consistent with general coagulation mechanisms proposed for iron salt with NOM ([16]-[18]).

Conclusion

To get informed of iron status evolution during organic matter coagulation, results obtained from Mössbauer spectroscopy were compared with Fe-L₃ edge electron-energy spectroscopy. It has been showed that EELS could be used as a first step neither time nor sample amount-consuming technique in the investigation of iron sites population reactivities. Fe-EELS could also allow a direct, no-time consuming and microscopic view of iron environment in heterogeneous mixtures like organic matter matrices.

The main advantage of the technique remains the possibility of coupling Fe-L and C- K edges electron energy loss spectroscopies to provide ultrastructural scale overviews of Fe-OM aggregates, so informations on organic matter removal. Future works could try to confirm our findings and precise the physical-chemical meanings of these iron populations or sites in organic matrices. Mössbauer previous studies ([5], [19]-[20]) suggested that iron could be viewed to be bound to humic materials by at least two, possibly three different binding mechanisms, where Mössbauer parameters could quantify Fe^{III} adsorbed on external humic surfaces, weakly octahedrally bound or on the contrary strongly bound and protected by tetrahedral and/or octahedral coordination in coagulated NOM complexes. Similarly interpretation ways with EELS could be interesting to point out and debate in the future.

Acknowledgments

This work was made within the frame of the programme “Zone Atelier du bassin de la Moselle”, with grants from Region Lorraine and CNRS (Contrat de Plan Etat – Région and Programme “Environnement Vie et Société”).

REFERENCES

- [1] R.D. Leapman, L.A Grunes, P.L. Fejes, Study of the L23 edges in the 3d transition metals and their oxides by electron-energy-loss spectroscopy with comparisons to theory, *Phys Rev B* 26 (1982) 614-635.
- [2] O.L. Krivanek, J.H. Paterson, ELNES of 3d transition-metal oxides. I. Variations across the periodic table, *Ultramicroscopy* 32 (1990) 313–318.
- [3] P.A. van Aken, B. Liebscher, V.J. Styrsa, Quantitative determination of iron oxidation states in minerals using Fe L_{2,3}-edge electron energy-loss near-edge structure spectroscopy, *Phys Chem Minerals* 25 (1998) 323-327.
- [4] A. Vilgé-Ritter, J. Rose, A. Masion, J.-Y. Bottero, J.-M. Lainé, Chemistry and structure of aggregates formed with Fe-salts and natural organic matters, *Coll. and Surf.* 147 (1999) 297-308.
- [5] N. Senesi, S.M. Griffith, M. Schnitzer, M.G. Townsend, Binding of Fe³⁺ by humic materials, *Geochimica and Cosmochimica Acta* 41 (1977) 969-976.
- [6] P.A. van Aken, B. Liebscher, V.J. Styrsa, Quantitative determination of iron oxidation states in minerals using Fe L_{2,3} -edge electron energy-loss near-edge structure spectroscopy. *Phys Chem Minerals* 25 (1998) 323-327.
- [7] D. Guillaume, Etude expérimentale du système fer-smectite en présence de solution à 80°C et 300°C, PhD thesis Université Henri Poincaré (2002) 210 pp.
- [8] A.-V. Jung, Interactions la matière organique naturelle avec des micropolluants anthropiques et devenir lors des opérations de traitement de l'eau. PhD thesis INPL (2004) in Press.
- [9] F. Andreux, Etude des étapes initiales de la stabilisation physico-chimique et biologique d'acides humiques modèles. PhD thesis Université de Nancy I (1978) 174 pp.
- [10] E.M. Thurman, R.L. Malcolm, Preparative isolation of aquatic humic substances. *Env. Sci. Technol.* 15 (1981) 463-466.
- [11] R.F. Egerton,. *Electron Energy-Loss Spectroscopy in the Electron Microscope*, 2nd Edition, Plenum Press, New York,1996.
- [12] J.-L. Mansot, P. Leone, P. Euzen, P. Palvadeau, Valence of manganese, in a new oxybromide compound determined by means of electron energy loss spectroscopy, *Microsc Microanal Microstruct* 5 (1994) 79–90
- [13] O. Benali, M. Abdelmoula, P. Refait, J.M. Génin, Effect of orthophosphate on the oxidation products of Fe(II)-Fe(III) hydroxycarbonate: the transformation of green rust to ferrihydrite, *Geochimica Cosmochimica Acta* 65 (2001) 1715-1726

- [14] F.C. Hawthorne, Spectroscopic methods in Mineralogy and Geology, In Reviews of Mineralogy, Ribbe, P.H. (Ed.). Mineralogical Society of America, 18, Blacksburg (1988) 255-340.
- [15] B.A. Goodman, M.V. Cheshire, A Mössbauer-effect study of the effect of pH on the reaction between iron and humic acid in aqueous media, *J. Soil Sci.* 30 (1979) 85-91.
- [16] P.N. Johnson, A. Amirtharajah, Ferric chloride and alum as single and dual coagulants, *J. AWWA* (1983) 232-239.
- [17] S.J. Randtke, Coagulation of NOM : An Overview of the science and U.S. Practice. NOM in drinking water, origin, characterization and removal, Workshop Proceedings of AWWA about Natural Organic Matter in Drinking water, AWWA Research Foundation (Ed.) (1988) 155-163.
- [18] B. Gu, J. Schmitt, Z. Chen, L. Liang, F. Mc Carthy, Adsorption and Desorption of Natural Organic Matter on Iron oxide : mechanisms and models, *Environ. Sci. Technol.* 28 (1994) 38-46.
- [19] E.H. Hansen, K.H. Mosbaek, Mössbauer Studies of an Iron (III) Fulvic Acid Complex. *Acta Chem. Scand.* 8 (1970) 3983-3984.
- [20] B. Lakatos, L. Korecz, J. Meisel, Comparative Studies on the Mössbauer Parameters of Iron Humates and Polyuronates, *Geoderma* 19 (1977)149-157.

Figures captions (*Légende des figures*)

fig. 1. Three-band fitting (65% Gaussian - 35% Lorentzian) decomposition on Fe L₃ Coagulant (hydrolysed ferric nitrate) Electron-Energy Loss Spectrum

Décomposition ternaire (65% gaussienne-35% lorentzienne) de la bande Fe L₃ en spectroscopie de perte d'énergie du coagulant (sel de nitrate ferrique hydrolysé)

fig. 2. 298K Fe L₃ EELS peak fitting for organic matters (1) before (2) at and (3) after iron Optimum Coagulation Concentration

Ajustement par déconvolution de la bande Fe L₃ pour les trois types de matériaux organiques (1) avant (2) à et (3) après la concentration optimum de coagulation en fer (298K)

fig. 3. Mössbauer spectra (298 K) of natural humic substances coagulated with three critical for water treatment iron concentrations for water treatment (1: below OCC, 2: at OCC, 3: above OCC)

Spectres Mössbauer (298 K) des substances humiques naturelles coagulées avec 3 concentrations différentes en fer (1: inférieure à la COC, 2: égale à la COC, 3 : supérieure à la COC)

fig. 4. Mössbauer spectra (77 K) of natural humic substances coagulated with three critical for water treatment iron concentrations for water treatment (1: below OCC, 2: at OCC, 3: above OCC)

Spectres Mössbauer (77 K) des substances humiques naturelles coagulées avec 3 concentrations différentes en fer (1: inférieure à la COC, 2: égale à la COC, 3 : supérieure à la COC)

fig. 5. Correlation between Fe-EELS correlation (A_{3a} , % area issued from Fe L_{3a}-edge), Mössbauer decomposition (C_1 , % area issued from doublets) and C-EELS (Normalised intensity of carbonyl -C=O chemical bond implied in the mechanism). *See Jung, 2004.*

Corrélation entre le paramètre A_{3a} (calculé en % d'après la bande Fe L_{3a} en spectroscopie de perte d'énergie), le paramètre C_1 (issu de la décomposition Mössbauer, en % de l'aire totale des doublets) et l'intensité (normée) correspondant à la liaison carbonyle -C=O impliquée dans le mécanisme de coagulation déterminée par spectroscopie de perte d'énergie au seuil K du carbone (voir Jung, 2004).

Tables (Tableaux)

Table 1. Coagulant (298K and 77 K)
Coagulant (298K et 77K)

Table 2. Iron coagulated organic matter
Matière organique coagulée avec le fer
2a. *Substances humiques synthétiques (298 K)*
2b. *MON de l'eau brute de rivière(298 K)*
2c. *Substances humiques naturelles (298 K)*
2d. *Substances humiques naturelles (77 K)*

^a **1, 2, 3** : Concentrations en fer avant, à et après la concentration optimum de coagulation (Jung, 2004).
CS : déplacement chimique en mm/s ; **QS** : éclatement quadripolaire en mm/s ; **w** : largeur à mi-hauteur en mm/s ; **A_{3a}, A_{3b}, A_{3c}** : aires (exprimées en % d'aire totale) issues de la décomposition de la bande Fe-L₃ (L_{3a}, L_{3b}, L_{3c}) d'après la méthode de déconvolution EELS de Guillaume, 2002; **ε** : déplacement quadripolaire en mm/s ; **H** : champ magnétique hyperfin en kOe ; **C₁, C₂** : % aires issus du calcul de Benali et al., 2001 à partir des doublets Mössbauer; **S₁, S₂, S₃, S₄** : aires issues de la décomposition des sextets Mössbauer par déconvolution sur une base lorentzienne d'après Benali et al., 2001.

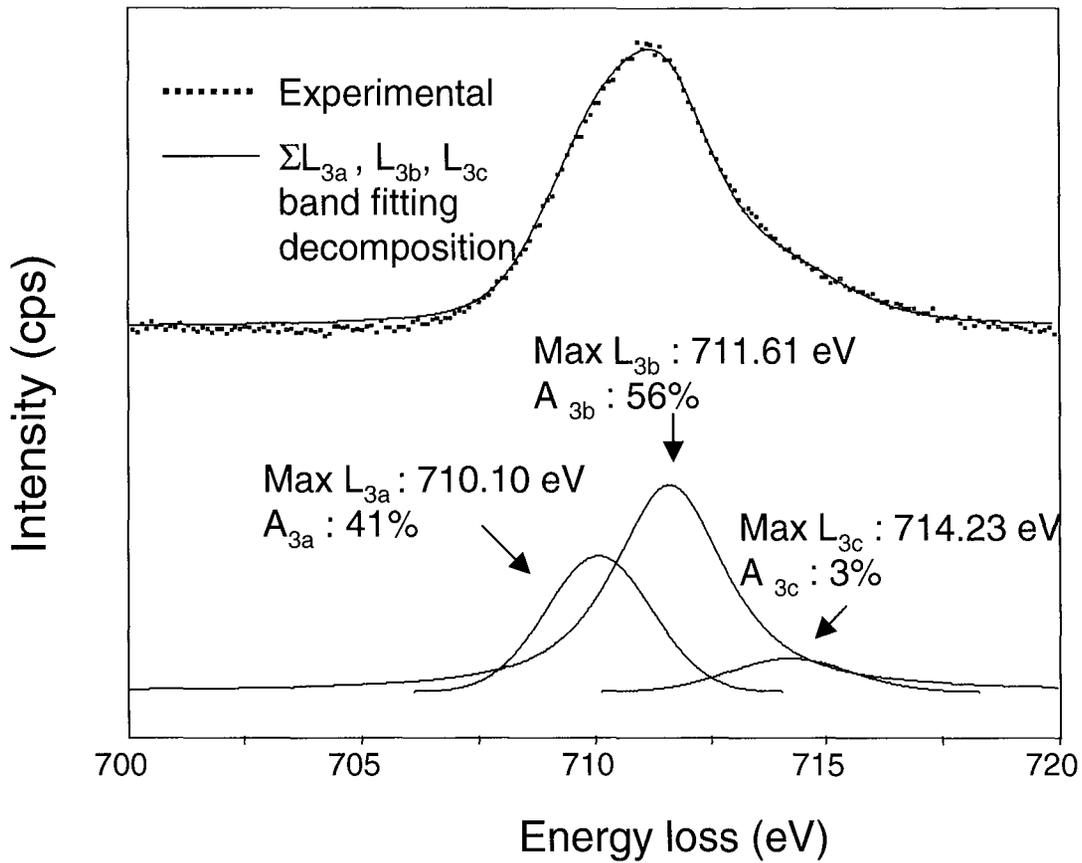
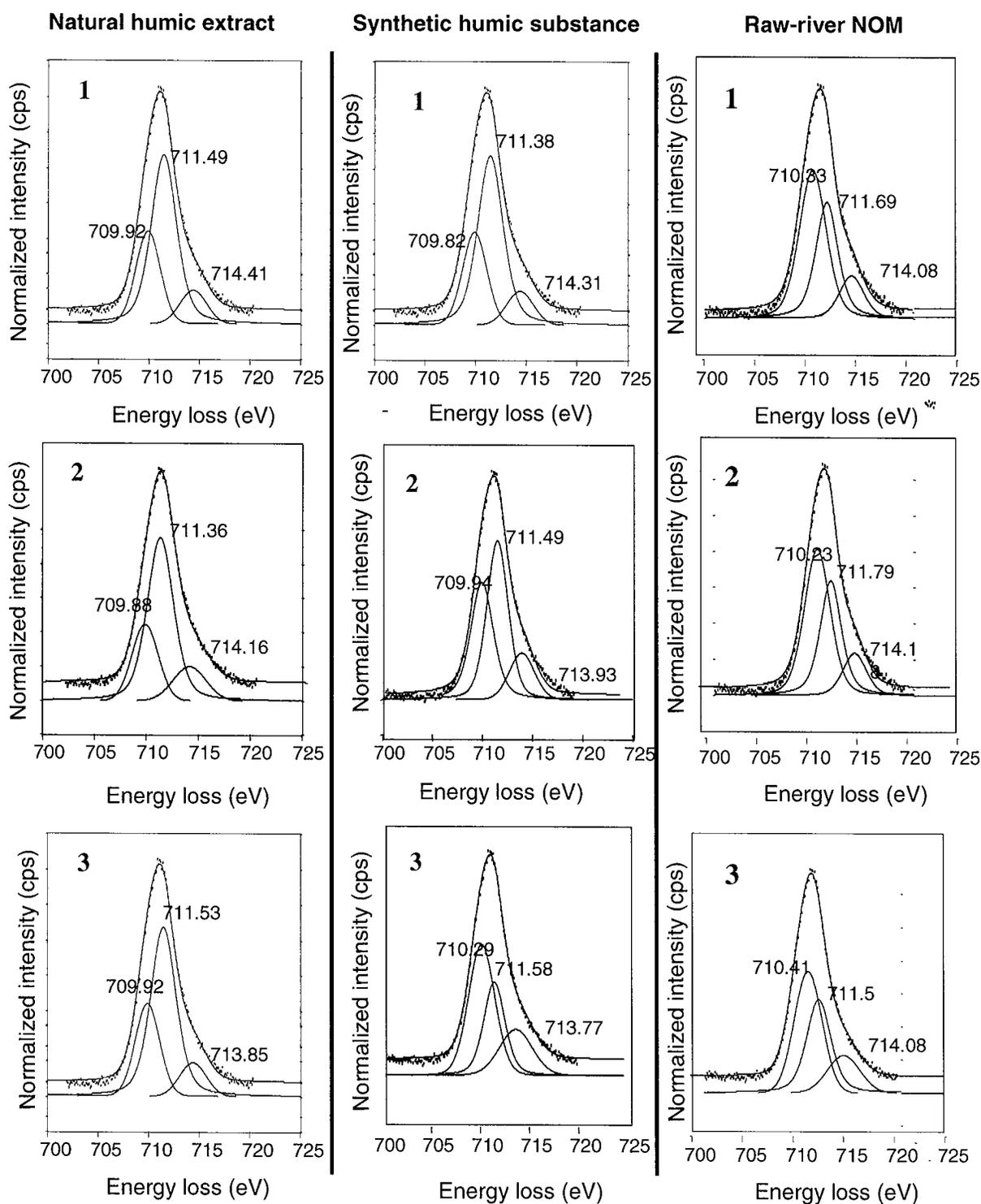


Figure 1. Three-band fitting (65% Gaussian - 35% Lorentzian) decomposition on Fe L₃ Coagulant (hydrolysed ferric nitrate) Electron-Energy Loss Spectrum

Figure 2. 298K Fe L₃ EELS peak fitting for organic matters before (1), at (2) and after (3) iron Optimum Coagulation Concentration



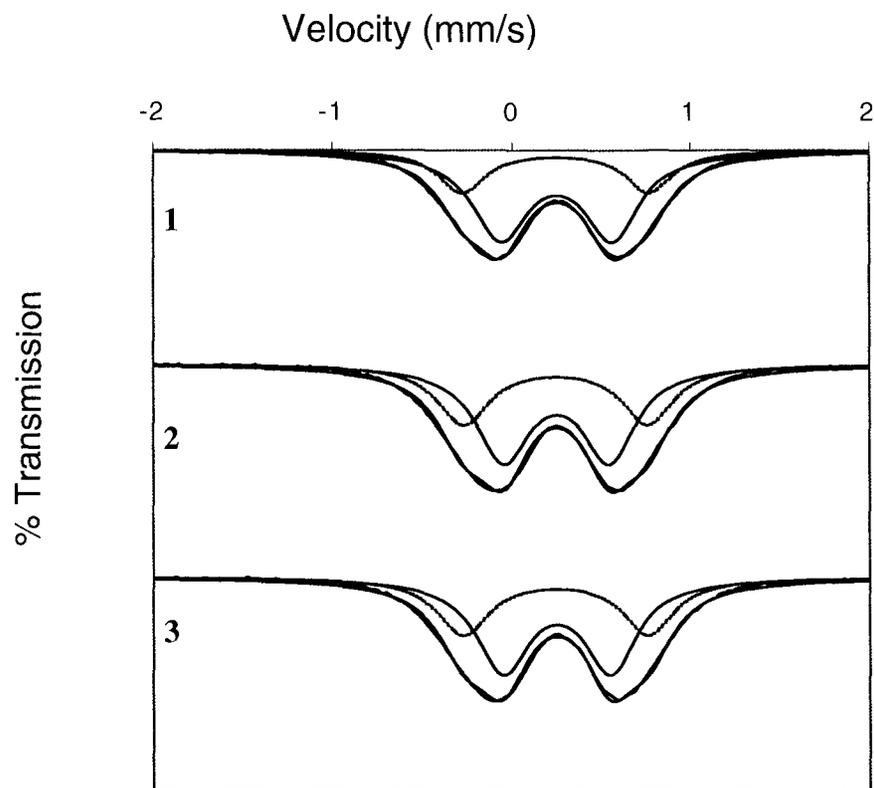


Figure 3. Mössbauer spectra (298 K) of natural humic substances coagulated with three critical for water treatment iron concentrations for water treatment (1: below OCC, 2: at OCC, 3: above OCC)

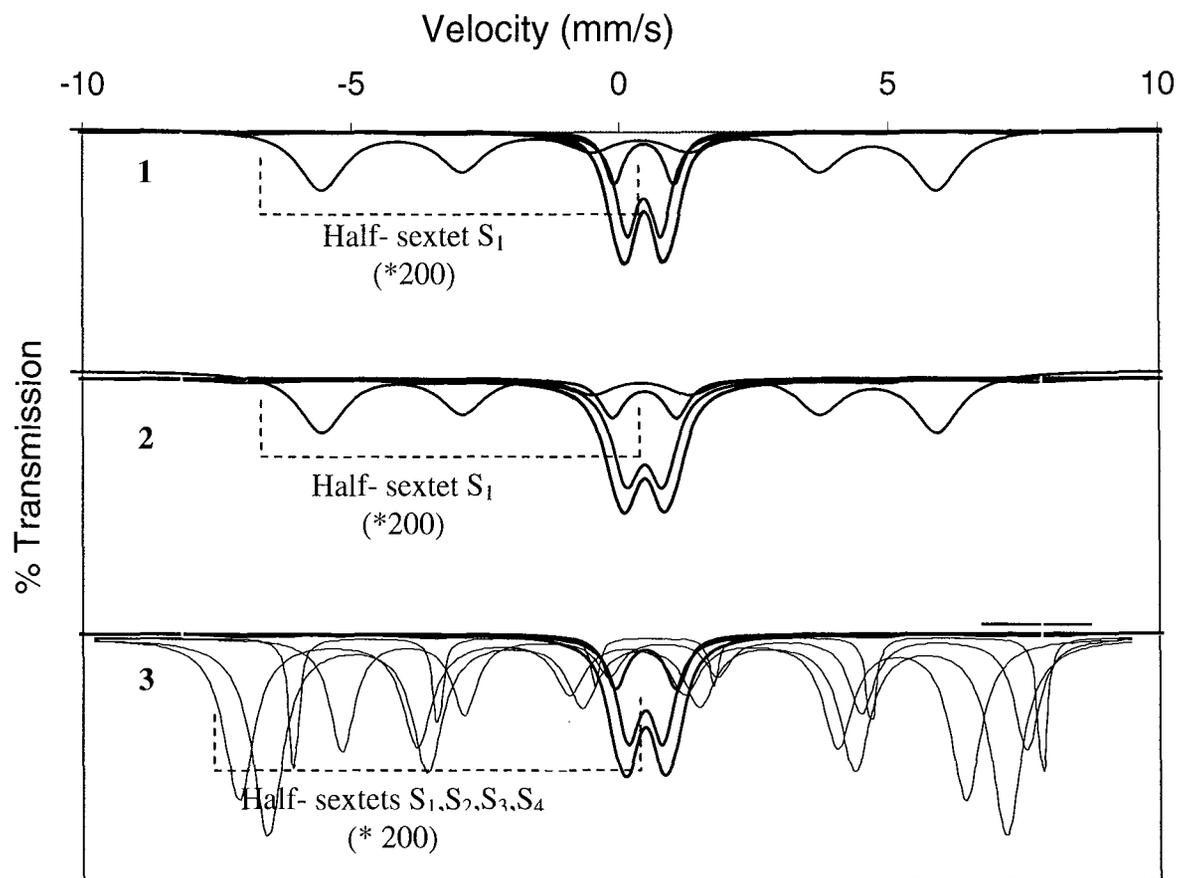


Figure 4. Mössbauer spectra (77 K) of natural humic substances coagulated with three critical for water treatment iron concentrations for water treatment (1: below OCC, 2: at OCC, 3: above OCC)

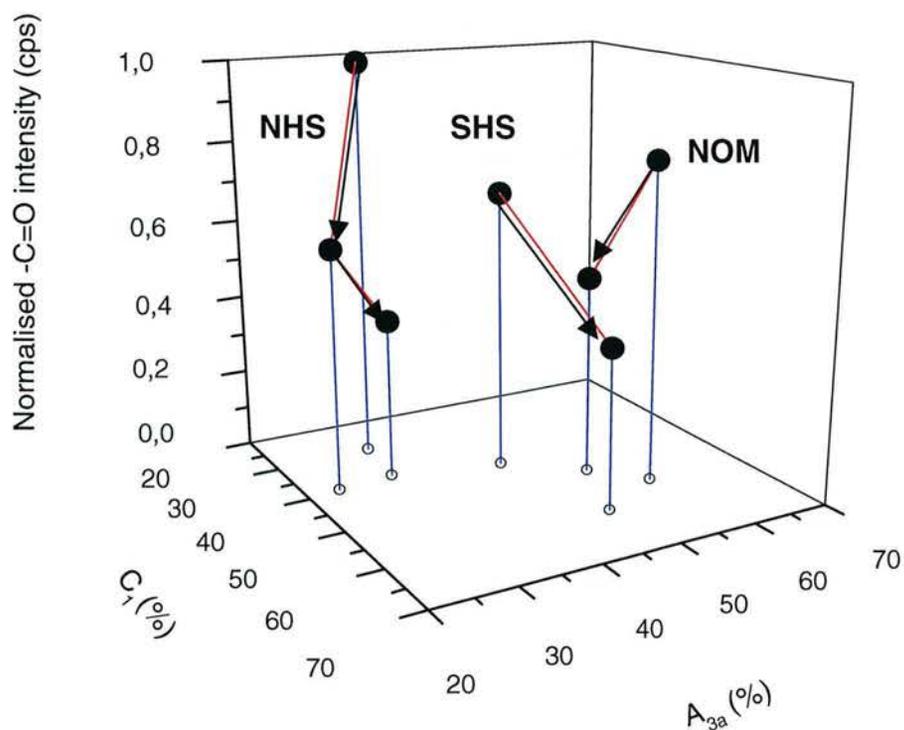


Figure 5. Correlation between Fe-EELS correlation (A_{3a} , % area issued from Fe L_{3a} -edge), Mössbauer decomposition (C_1 , % area issued from doublets) and C-EELS (Normalised intensity of carbonyl $-C=O$ chemical bond implied in the mechanism. See Jung (2004).

Table 1. Coagulant (298K and 77 K)

Temperature	CS	QS	w	C ₁	C ₂	A _{3a}	A _{3b}	A _{3c}	A _{3b} + A _{3c}
298	0.3537	1.002	0.349	37.0		41.0	56.0	3.0	59.0
	0.2550	0.573	0.291		63.0				
77	0.4545	1.095	0.217	35.0		*	*	*	*
	0.4515	0.582	0.252		65.0				

* non- calculated parameters at 77 K

Tables 2. Iron coagulated organic matter

2a. Synthetic humic-like substance (298 K)

Iron concentration ^a	CS	QS	w	C ₁	C ₂	A _{3a}	A _{3b}	A _{3c}	A _{3b} + A _{3c}
1	*	*	*	*	*	37.0	58.0	5.0	63.0
2	0.361	0.557	0.174	41.0		44.0	50.0	6.0	56.0
	0.349	0.978	0.214		59.0				
3	0.3515	0.605	0.196	59.0		48.0	35.0	17.0	52.0
	0.3550	1.049	0.193		41.0				

2b. Raw river water NOM (298 K)

Iron concentration ^a	CS	QS	w	C ₁	C ₂	A _{3a}	A _{3b}	A _{3c}	A _{3b} + A _{3c}
1	*	*	*	*	*	60.0	34.0	6.0	40.0
2	0.3583	0.998	0.201	54.0		57.0	39.0	4.0	43.0
	0.3532	0.595	0.171		46.0				
3	0.3528	1.046	0.196	48.0		52.0	40.0	8.0	48.0
	0.3462	0.608	0.178		52.0				

2c. Natural humic substances (298 K)

Iron concentration ^a	CS	QS	w	C ₁	C ₂	A _{3a}	A _{3b}	A _{3c}	A _{3b} + A _{3c}
1	0.3645	1.039	0.317	29.0		32.0	60.0	8.0	68.0
	0.3651	0.618	0.372		71.0				
2	0.3615	1.026	0.356	39.0		24.0	63.0	13.0	76.0
	0.3625	0.587	0.362		61.0				
3	0.3626	1.031	0.353	38.0		31.0	59.0	10.0	69.0
	0.3634	0.598	0.356		62.0				

2d. Natural humic substances (77 K)

Iron concentration ^a	CS	QS	w	C ₁	C ₂	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	H	ε
1	0.4653	1.109	0.209	30.6							
	0.4593	0.634	0.235		63.0						
	0.5600		0.640			6.3				444	-0.14
2	0.4604	1.190	0.274	22.8							
	0.4551	0.685	0.725		65.6						
	0.5090					11.6				448	-0.11
3	0.4659	1.129	0.239	31.0							
	0.4596	0.647	0.261		61.7						
	0.5100		0.350			2.9				442	-0.05
	1.1800		0.290				1.4			410	0.20
	0.0400		0.347					2.4		434	-0.25
	0.9360		0.102						0.6	448	0.13

^a **1, 2, 3** : Iron concentrations before, at and after the optimum concentration coagulation (Jung, 2004).

CS : center shift in mm/s ; **QS** : quadrupole splitting in mm/s ; **w** : half width in mm/s ; **A_{3a}, A_{3b}, A_{3c}** : areas (expressed in % total area) issued from Fe-L₃ three band (L_{3a}, L_{3b}, L_{3c}) peak-fitting EELS decomposition according to Guillaume, 2002 ; **ε** : quadrupole shift in mm/s ; **H** : hyperfine magnetical field in kOe ; **C₁, C₂** : % areas from Mössbauer doublets decomposition according to Benali et al., 2001 ; **S₁, S₂, S₃, S₄** : areas from Mössbauer sextets decomposition with Lorentzian-shape lines according to Benali et al., 2001.

V.3. Elimination d'un polluant type, le pyrène, lors de la coagulation de la matière organique

Pour cette étude, 2 prélèvements ont été réalisés sur le site de Richardménil (Figure II.2(2)), le premier le lundi 26 janvier (Eau brute 1, ER1) et le deuxième le lundi 9 février 2004 (Eau brute 2, ER2).

Les caractéristiques initiales de ces eaux sont données dans le Tableau V.3(1).

*Tableau V.3(1)
Caractéristiques des eaux prélevées qui sont utilisées pour la préparation de solutions artificiellement polluées au pyrène.*

Paramètres	Eau brute 1 (ER1)	Eau brute 2 (ER2)
Turbidité (NTU)	6,4	9,36
pH	7,66	7,31
Conductivité ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	199	147
COT (mg/L)	6,5	8,5
COD (mg/L)	4,1	5,6

V.3.1. Mise au point du dosage du pyrène par fluorescence

Nous avons procédé à une calibration établie pour des solutions étalons de 10^{-10} à 10^{-6} M en pyrène. Les valeurs d'intensités (Figure V.3(1)) de fluorescence relevées sont celles obtenues à 372 nm (I_1) et 382 nm (I_3).

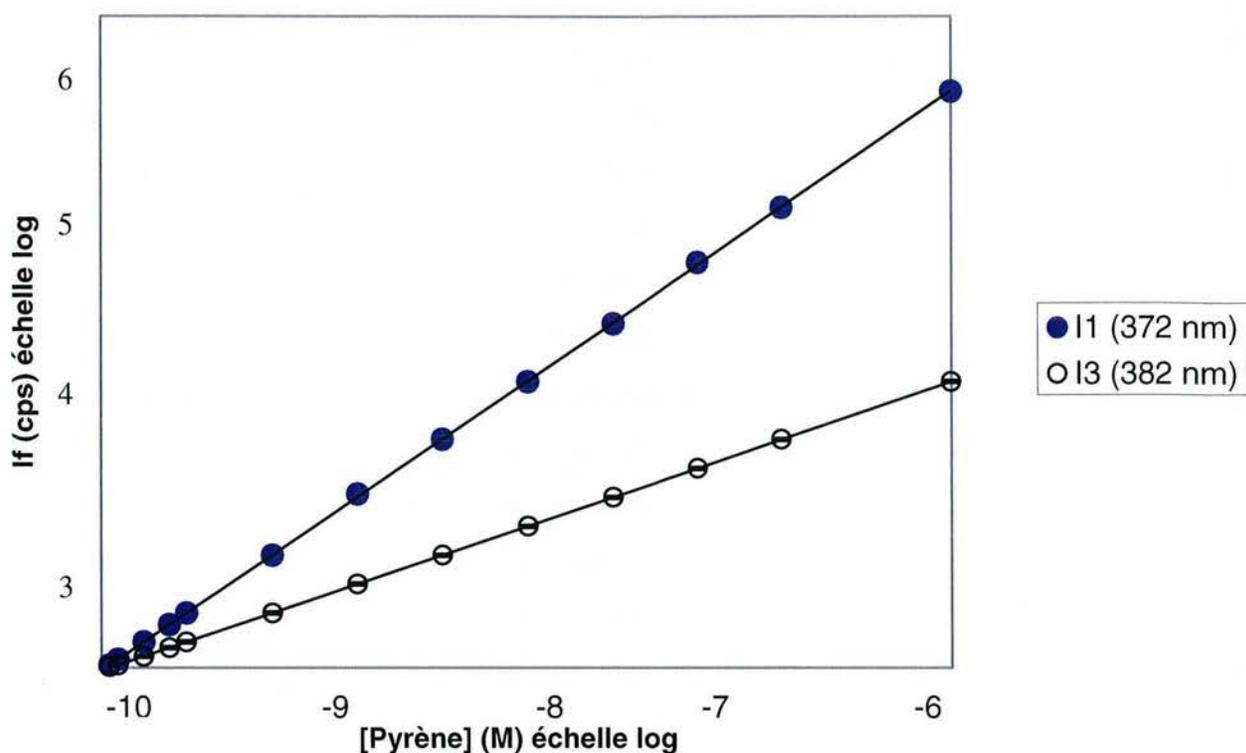


Figure V.3(1)

Courbes de calibration des intensités I_1 et I_3 du pyrène en solution aqueuse en fonction de sa concentration.

Pour I_1 : $y = 4.10^{12} x - 21\,783$, $R^2 = 0,991$ et pour $I_3 = 2.10^{12} x - 20744$, $R^2 = 0,989$.

Nous constatons l'excellente linéarité du signal pour ces deux valeurs d'intensité d'émission de fluorescence en fonction de la concentration en pyrène. La limite de dosabilité du pyrène en solution aqueuse est de 10^{-10} M avec une incertitude de 5%⁵³ et de 10^{-9} M avec une incertitude inférieure au %⁵³ (en l'absence d'effets matriciels éventuels dus à la présence de matière organique).

Nous pouvons donc mesurer la concentration résiduelle en pyrène des surnageants après traitement de la MON par coagulation grâce à cette calibration. Afin de nous affranchir des effets de filtres internes et/ou diffusion (importants dans les régions de concentration en coagulant éloignées de la concentration optimum de coagulation (ou COC)), nous avons mesuré en UV/Visible et fluorescence l'ensemble des surnageants en l'absence de pyrène et procédé à la double correction de fluorescence intrinsèque des acides humiques résiduels en suspension ainsi qu'à la correction d'Auger (cf. II.2).

⁵³ Considérée comme 2 valeurs d'écart-types pour 5 mesures réalisées sur 5 solutions préparées de façon indépendante.

Pour chaque série de jar-tests, nous avons donc réalisé des « blancs » de MO seule en présence de coagulant.

Nous avons vérifié l'absence de fluorescence du coagulant utilisé ici (le nitrate ferrique) ainsi que l'absence d'interaction des ions nitrate introduits (aux concentrations des jar-tests) sur la fluorescence du pyrène. Par ailleurs, l'effet de filtre interne imposé par le coagulant seul en présence de pyrène, s'il peut être corrigé par nos formules habituelles de correction, est difficilement applicable dans notre cas, étant donné que nous ne connaissons pas la quantité exacte de fer résiduel dans le surnageant. Cependant, El Samrani, 2003, a montré que les quantités résiduelles de fer dans les surnageants d'eau (usées et pluviales) atteignaient au maximum le dixième des teneurs en fer introduit initialement, et ce pour des concentrations en coagulant appartenant au domaine de restabilisation de la matière organique (fortes concentrations éloignées de l'optimum de coagulation). En procédant à une série de blancs pour une concentration initiale de pyrène de 10^{-6} M (seul présent en solution) en présence de nitrate ferrique jusqu'à des teneurs équivalentes en fer au dixième de la concentration de restabilisation pour chaque jar-test, nous n'avons constaté qu'un écart d'un pourcent sur la teneur estimée en pyrène sans correction aucune. Nous avons donc uniquement choisi de corriger les effets de filtres imposés par le complexe MO-coagulant vis-à-vis du pyrène, pris en compte dans notre correction (mesures des blancs en absorption UV/Visible).

L'absence de coagulation du pyrène seul en solution à 10^{-6} M par le nitrate ferrique dans les conditions de nos jar-tests nous a fait éliminer la possibilité de connaître la part éventuelle de la fluorescence du polluant inhibée par le coagulant. Cependant, étant donné nos résultats en l'absence de coagulation et des essais antérieurs précédemment mentionnés, nous pouvons la supposer faible.

Enfin, pour tous nos essais, nous avons également rapporté les mesures des variations I_1/I_3 afin de suivre ultérieurement l'évolution qualitative du complexe MO-coagulant-pyrène (variation de polarité).

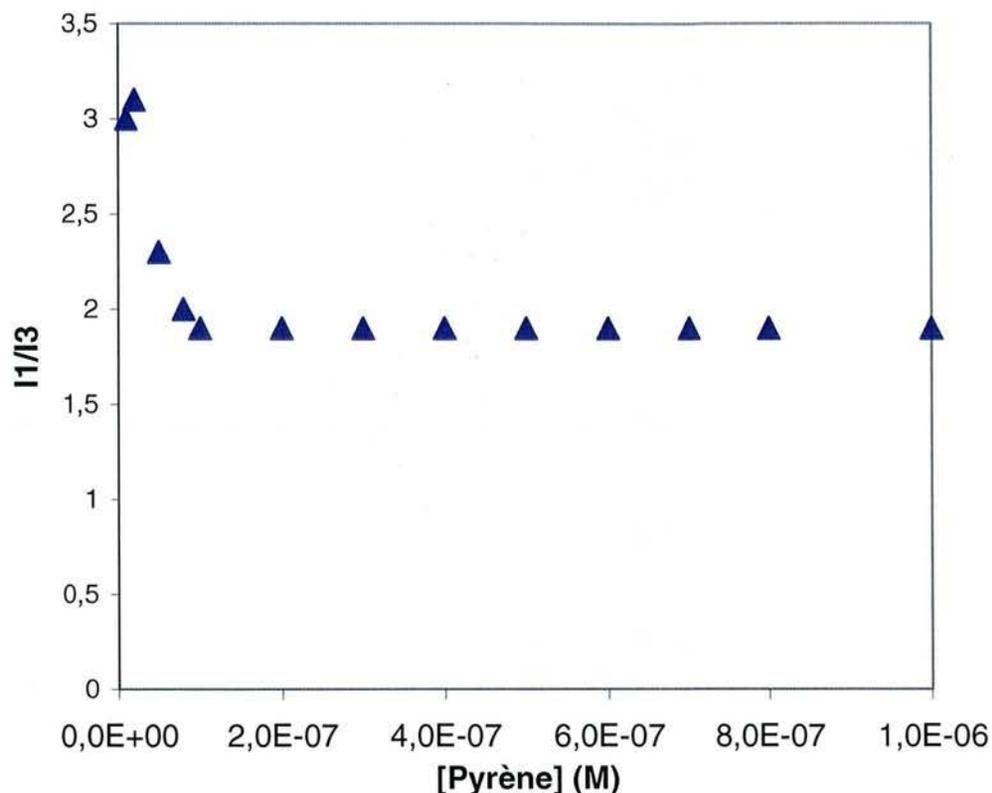


Figure V.3(2)

Evolution du rapport I_1/I_3 en fonction de la concentration en pyrène en solution aqueuse.

Nous constatons que pour des teneurs en pyrène inférieures à 5.10^{-8} M en solution aqueuse, nous ne pouvons rien conclure quant à la mesure de polarité en solution avec cette sonde de fluorescence. En effet, les rapports I_1/I_3 sont alors supérieurs à 2, ce qui est aberrant, étant donné que la polarité du pyrène dans l'eau UP est voisine de 1,9 dans notre cas (cette valeur dépendant de l'appareillage et de la pureté des réactifs utilisés).

V.3.2. Résultats des essais de coagulation avec les acides humiques

V.3.2.1. Coagulation de l'AHCG en présence de pyrène

Le jar-test a été réalisé avec une gamme de nitrate ferrique de $0,5.10^{-4}$ à $1,1.10^{-3}$ M. Les résultats obtenus après 24 h de sédimentation sont représentés sur la Figure V.3(3).

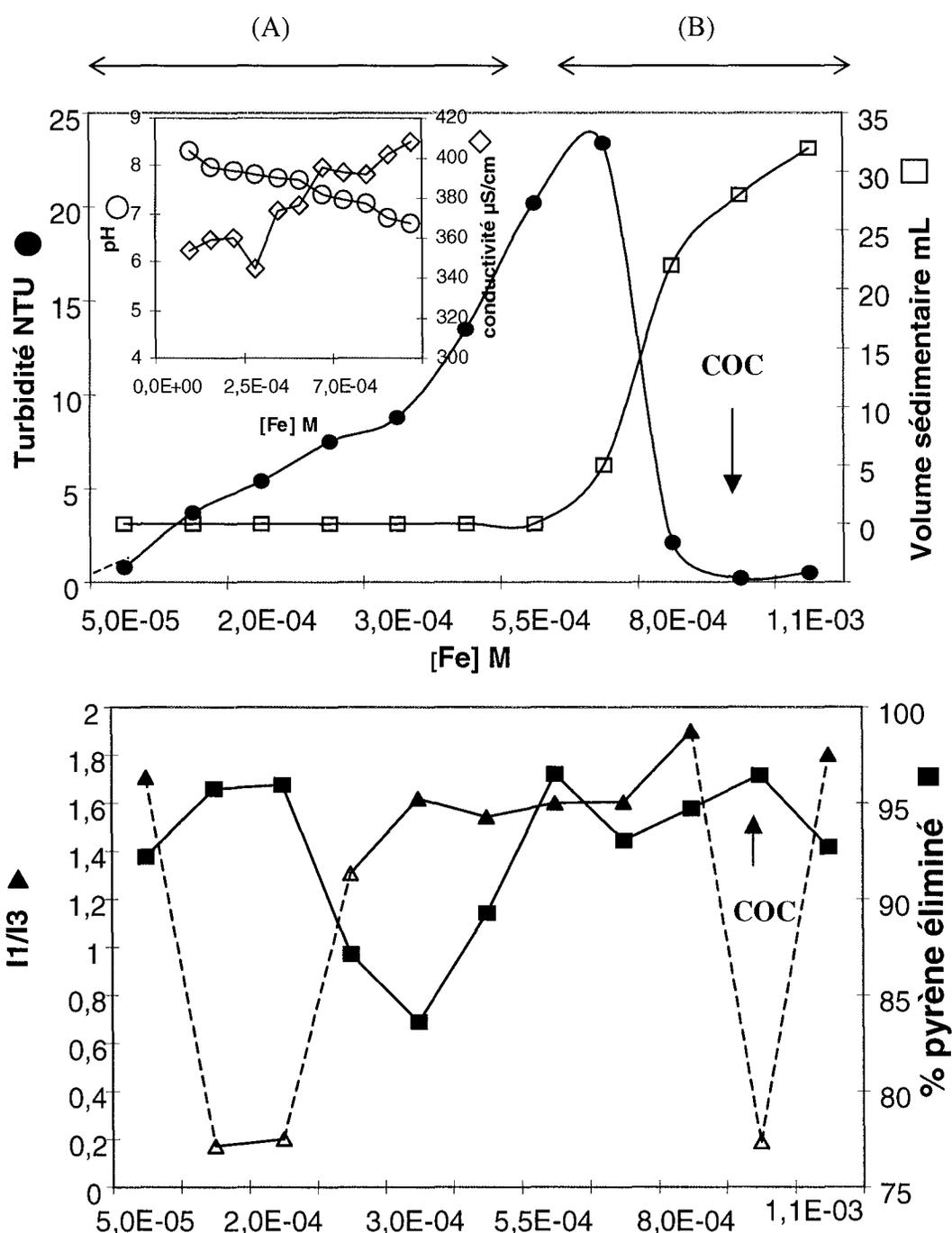


Figure V.3(3)
Jar-tests et résultats de l'élimination du pyrène pour AHCG.

a) Turbidité

La turbidité varie entre 0,21 et 23 NTU (précision : 0,2 NTU en moyenne) pour l'ensemble de la gamme en nitrate ferrique. Entre $3 \cdot 10^{-4}$ et $7 \cdot 10^{-4}$ M, la turbidité augmente jusqu'à 23 NTU, cette zone (A) correspond à la formation de particules colloïdales entre la matière organique et le coagulant. L'action du coagulant sur la matière organique en

suspension est visible (réduction des charges électriques négatives portées par les AH, cf. V.3.3), mais ne permet pas une agrégation des particules conduisant à la décantation. Puis, la turbidité diminue jusqu'à 0,21 NTU pour une concentration en coagulant de $8 \cdot 10^{-4}$ M. Cette zone va nous permettre de définir l'optimum de coagulation (B). Ensuite, la turbidité se stabilise entre 0,21 et 0,31 NTU pour des concentrations en nitrate ferrique de $8 \cdot 10^{-4}$ à $1,2 \cdot 10^{-3}$ M. Dans ce cas, comme les floccs ne sont pas remis en suspension, nous pouvons conclure à l'absence de restabilisation.

b) Volume décanté

Pour des concentrations en coagulant jusqu'à $5,5 \cdot 10^{-4}$ M, le volume décanté est nul, ensuite, ce volume augmente fortement jusqu'à 5 mL environ par litre de mélange, pour une concentration en nitrate ferrique de $7 \cdot 10^{-4}$ M. Puis, le volume décanté continue d'augmenter jusqu'à 30 mL environ pour le point ayant la concentration en coagulant la plus élevée ($1,2 \cdot 10^{-3}$ M). Les floccs formés ne sont pas déstabilisés et continuent de décanter.

c) Concentration optimale en coagulant

Pour une concentration en coagulant de $9,5 \cdot 10^{-4}$ M, la turbidité est de 0,21 NTU. Ce point correspond à la concentration optimale en coagulant (COC). Dans ce cas, nous avons $\text{COC} = 9,5 \cdot 10^{-4}$ M.

d) pH et conductivité

Pour des concentrations en coagulant comprises entre 10^{-4} et $1,1 \cdot 10^{-3}$ M, le pH diminue de 7,64 à 6,19 et la conductivité augmente de 376 à $405 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Les courbes de pH et de conductivité présentent une évolution opposée. L'augmentation de la conductivité serait due à l'ajout d'ions mobiles comme les ions nitrate NO_3^- . La baisse du pH a pour origine l'ajout de nitrate ferrique (hydrolyse du fer). La mise en solution d'un coagulant se déroule en deux étapes. L'étape 1 est une phase d'hydrolyse. Des intermédiaires polychargés positifs ($\text{Fe}_x(\text{OH})_y(\text{NO}_3)_z$) se forment, ils sont très efficaces pour neutraliser la charge négative des colloïdes. L'étape 2 permet la formation d'un précipité d'oxyhydroxydes de fer, qui assure le pontage et la coalescence entre les colloïdes déstabilisés (cf. I.4.1.1).

e) Pyrène éliminé⁵⁴

Initialement, le pourcentage de pyrène éliminé augmente légèrement de 90 à 96,5% pour des concentrations en coagulant de $0,5 \cdot 10^{-4}$ à $2 \cdot 10^{-4}$ M, puis il diminue jusqu'à 83,6% (valeur la plus faible du pourcentage d'élimination en pyrène sur la totalité de la gamme d'ajout) lorsque $3 \cdot 10^{-4}$ M de nitrate ferrique sont ajoutées. Ensuite, l'élimination du pyrène augmente à nouveau jusqu'à près de 96% pour $6 \cdot 10^{-4}$ M de coagulant. Au-delà, l'élimination est fluctuante quantitativement, mais ne redescend pas en dessous de 83,6%.

V.3.2.2. Coagulation de l'AHCT2 en présence de pyrène

Pour ce jar-test, la gamme de concentration en nitrate ferrique est comprise entre $3 \cdot 10^{-4}$ et $1,2 \cdot 10^{-3}$ M. Les résultats obtenus après 24 h de sédimentation sont présentés sur la Figure V.3(4).

⁵⁴ L'incertitude (2 écarts-types/reproductibilité sur 5 mesures) déterminée sur la teneur en pyrène est de $5 \cdot 10^{-9}$ M en moyenne pour l'ensemble de la gamme.

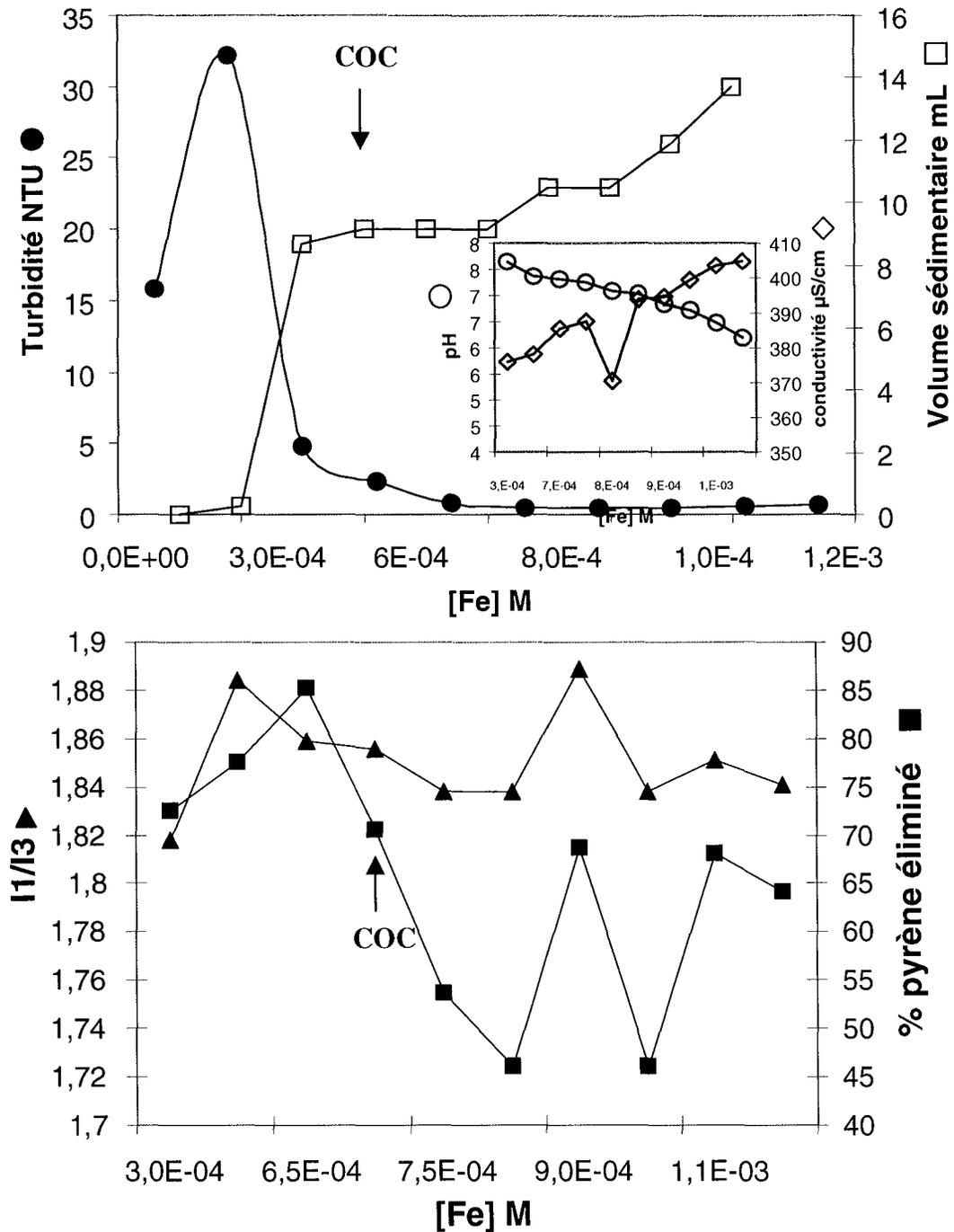


Figure V.3(4)
Résultats du jar-test de l'acide humique synthétique AHCT2.

L'évolution des paramètres généraux de suivi de la coagulation de cette fraction d'acide humique synthétique est similaire à celle de AHCG, les résultats ne seront donc pas détaillés. Cependant, nous devons mentionner qu'avec cette fraction, tous les résultats de

variation de polarité avec le pyrène peuvent être pris en compte, étant donné que toutes les teneurs trouvées dans le surnageant sont supérieures à 5.10^{-8} M⁵⁵.

La COC est atteinte pour une concentration en nitrate ferrique de 4.10^{-4} M. Pour cette concentration, l'élimination du pyrène est réalisée à 74,5%.

V.3.2.3. Coagulation de l'AHCTI en présence de pyrène

Pour cette fraction, étant donné le peu de matière dont nous disposons pour l'ensemble de nos essais (150 mg de poudre ont été recueillis lors de la synthèse après dialyse et lyophilisation), nous avons effectué les jar-tests dans des réacteurs de 100 mL, de même configuration que celle exposée au Chapitre II, et dans les mêmes conditions opératoires d'agitation et de mélange. Nous devons donc mentionner que les incertitudes pour ces essais sont certainement plus importantes par rapport aux essais réalisés avec les autres fractions d'acides humiques (notamment au niveau de la lecture du volume sédimentaire dans les cônes). Les erreurs engendrées par le dimensionnement du réacteur de mélange devront également être prises en compte pour l'extrapolation des résultats, et devront certainement être confirmées lors d'études futures au laboratoire. L'ensemble des mesures est reporté à la Figure V.3(5).

⁵⁵ L'incertitude sur les teneurs en elles-mêmes du pyrène sont de 4.10^{-9} M dans les surnageants

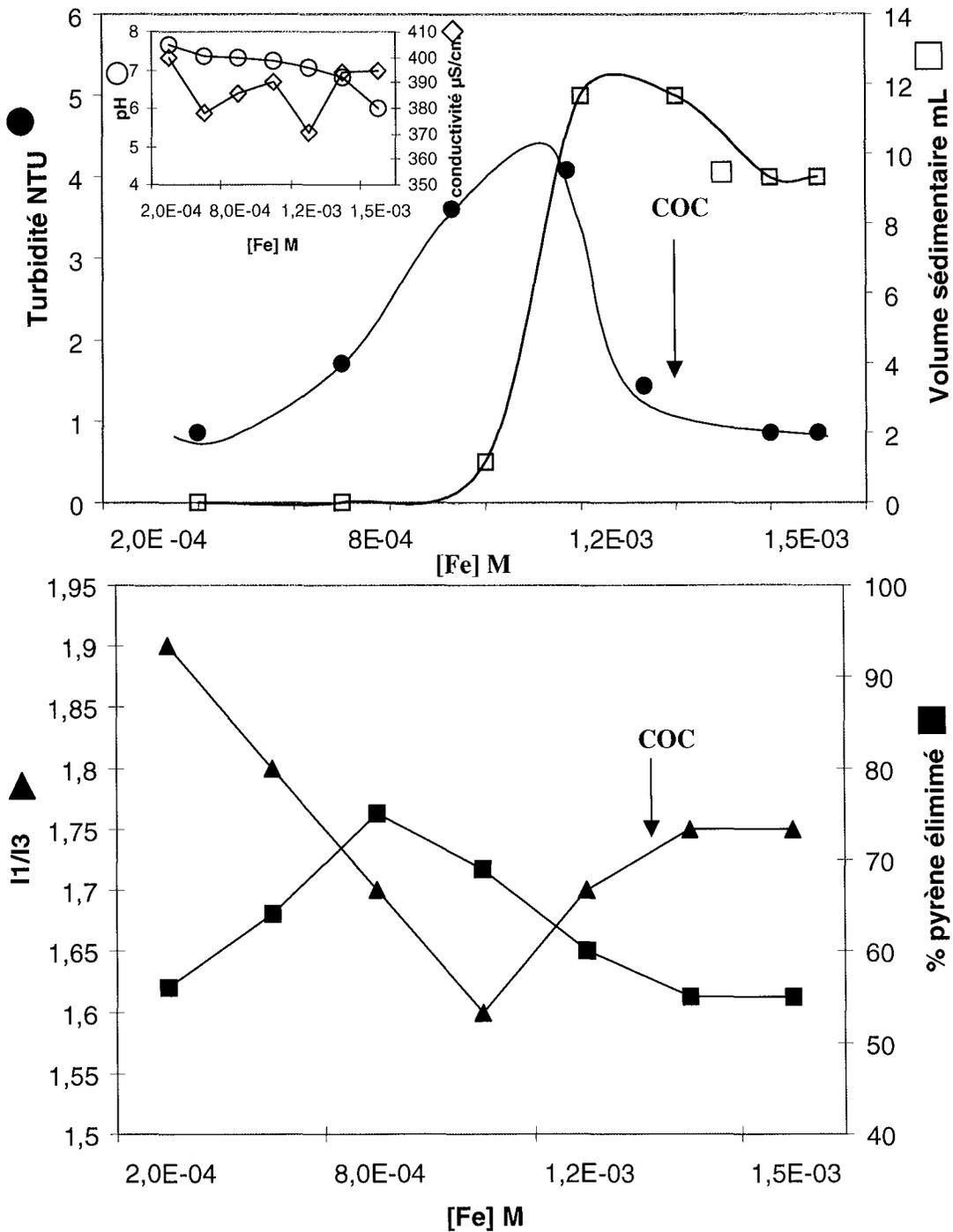


Figure V.3(5)
Résultats du jar-tests AHCT1.

Pour cette fraction, l'optimum de coagulation est très élevé : $1,2 \cdot 10^{-3}$ M en fer. Il n'y a pas de restabilisation constatée.

V.3.2.4. Coagulation de l'AHNI en présence de pyrène

La gamme de concentration en coagulant a été choisie entre 10^{-4} et $1,5 \cdot 10^{-3}$ M de nitrate ferrique. Les résultats obtenus après 24 h de sédimentation sont présentés à la Figure V.3(6).

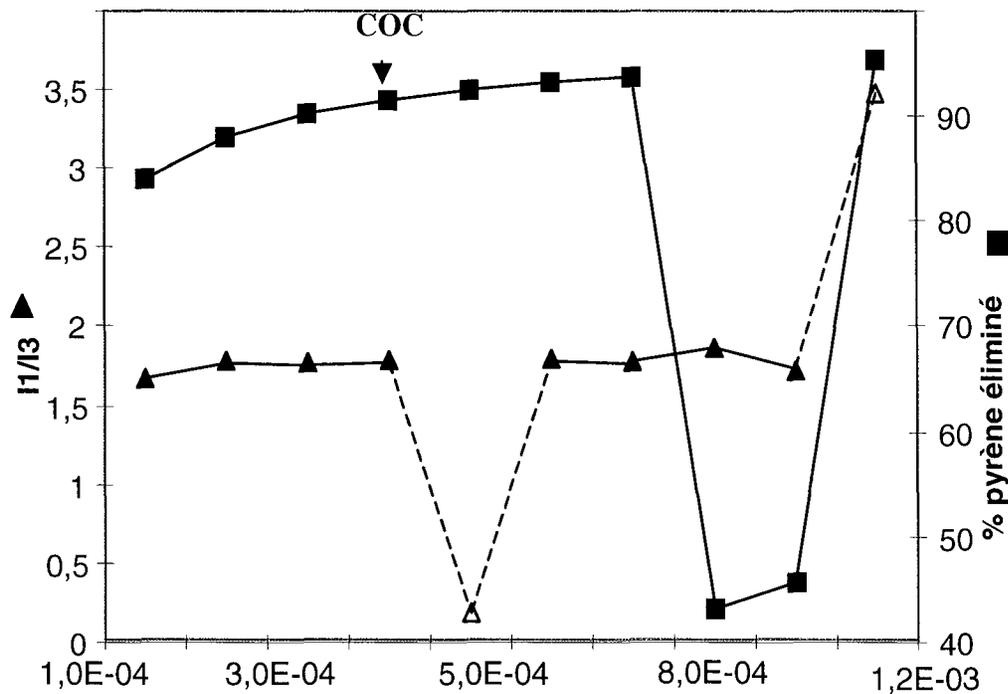
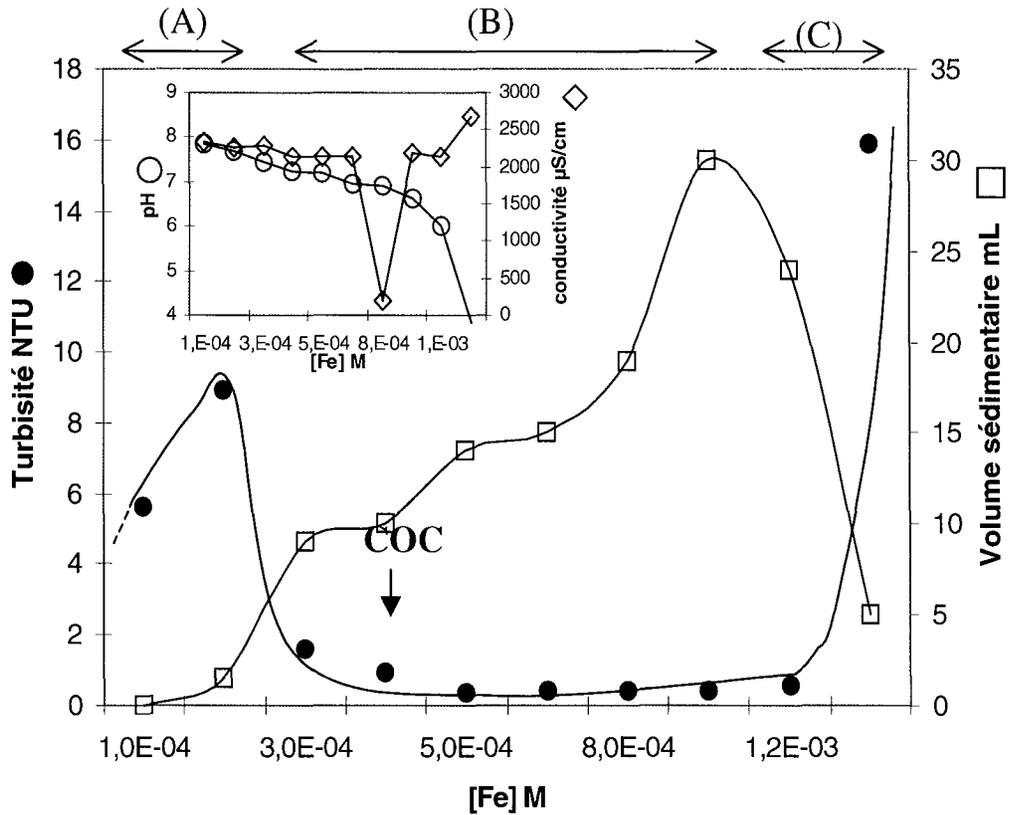


Figure V.3(6)
Résultats des jar-tests de l'AHNI.

a) Turbidité

La turbidité varie entre 0,31 et 16 NTU pour l'ensemble de la gamme en coagulant (10^{-4} à $1,5 \cdot 10^{-3}$ M de nitrate ferrique). Dans une première étape, la turbidité augmente jusqu'à 9 NTU pour $3 \cdot 10^{-4}$ M de coagulant (zone A), ensuite, la valeur de la turbidité diminue jusqu'à environ 0,6 NTU pour une concentration en coagulant de $3 \cdot 10^{-4}$ M et se stabilise jusqu'à $1,2 \cdot 10^{-3}$ M (zone B), pour ensuite augmenter jusqu'à 16 NTU (restabilisation (zone C)).

b) Volume décanté

L'évolution du volume décanté est beaucoup plus variable que pour les acides humiques synthétiques (cf. description précédente). Il semblerait que des floccs de compacité différente suivant la concentration ajoutée en coagulant soit formés au bout de 24 h.

c) Concentration optimale en coagulant

Les mesures conduisent à une COC = $3 \cdot 10^{-4}$ M.

d) pH et conductivité

Les variations de ces deux paramètres sont similaires à celles généralement décrites, sauf pour la dernière valeur de pH, où nous atteignons une valeur de 4,5 indiquant une restabilisation.

e) Pyrène éliminé

Le pyrène est bien éliminé à la COC (à 93,7%). Lors de la restabilisation, il est intéressant de noter que ce taux diminue jusqu'à atteindre une valeur minimale d'élimination de 43,2%.

V.3.2.5. Coagulation de l'AHN2 en présence de pyrène

Pour le jar-test, la gamme de coagulant choisie était comprise entre 10^{-4} et $1,5 \cdot 10^{-3}$ M de nitrate ferrique.

Les résultats obtenus après 24 h de sédimentation sont présentés sur la Figure V.3(7).

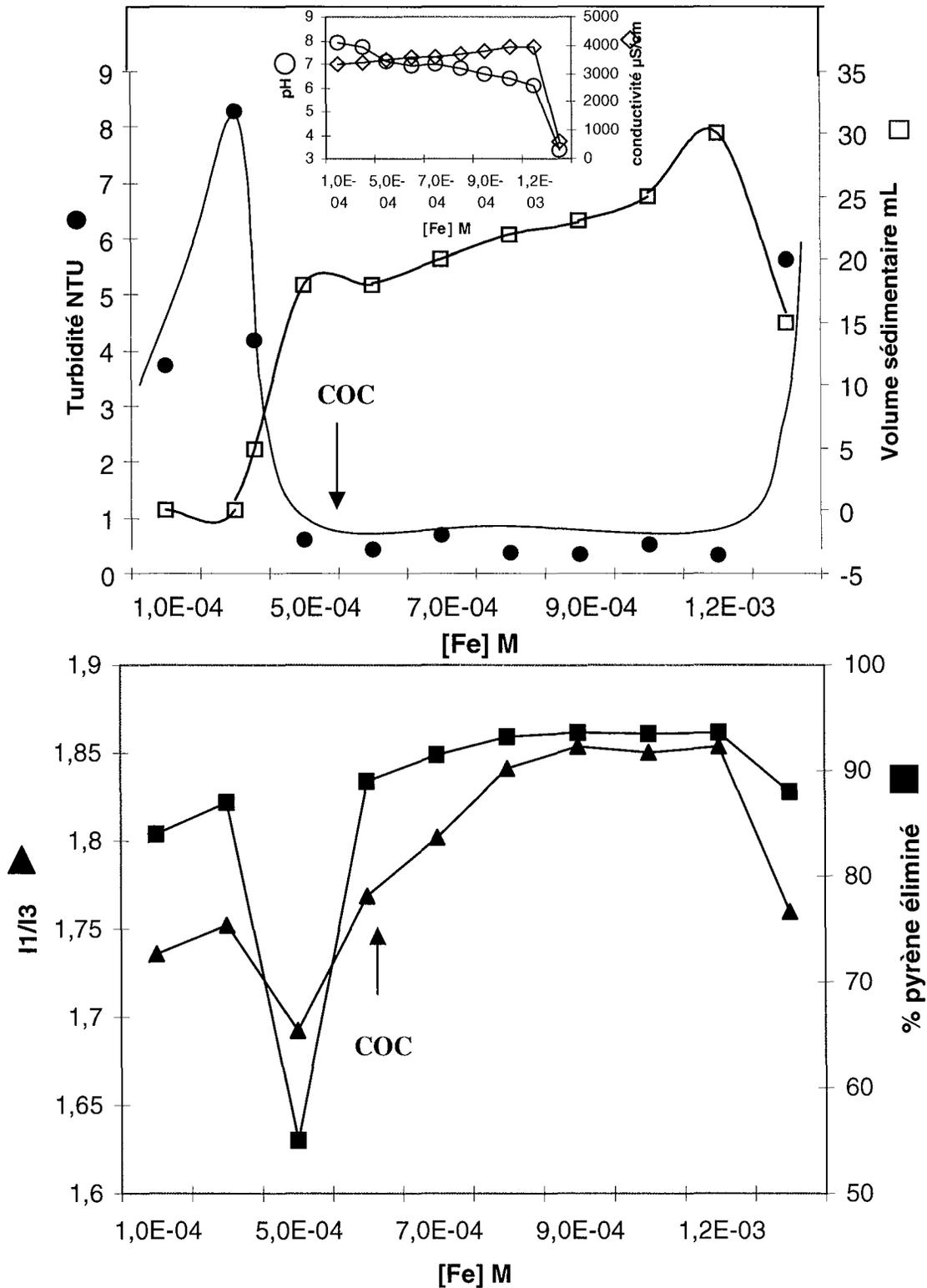


Figure V.3(7)
Résultats du jar-test de l'AHN2.

L'évolution des paramètres de cet acide humique naturel est similaire à celle de l'acide humique naturel 1 (AHN1), les résultats ne seront donc pas détaillés. La concentration optimale de coagulation (COC) est atteinte pour $5,0 \cdot 10^{-4}$ M de nitrate ferrique. Pour ce point, la

turbidité est minimale (0,38 NTU) pour un volume de 14 mL. Contrairement à l'acide humique naturel 2, le pyrène est bien éliminé (92,5%) lors de l'ajout de l'optimum de coagulant.

V.3.2.6. Coagulation de l'Eau brute ERI en présence de pyrène

Pour ce jar-test, nous avons travaillé sur une gamme en coagulant ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$) de $0,5 \cdot 10^{-4}$ à $7 \cdot 10^{-4}$ M. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure V.3(8).

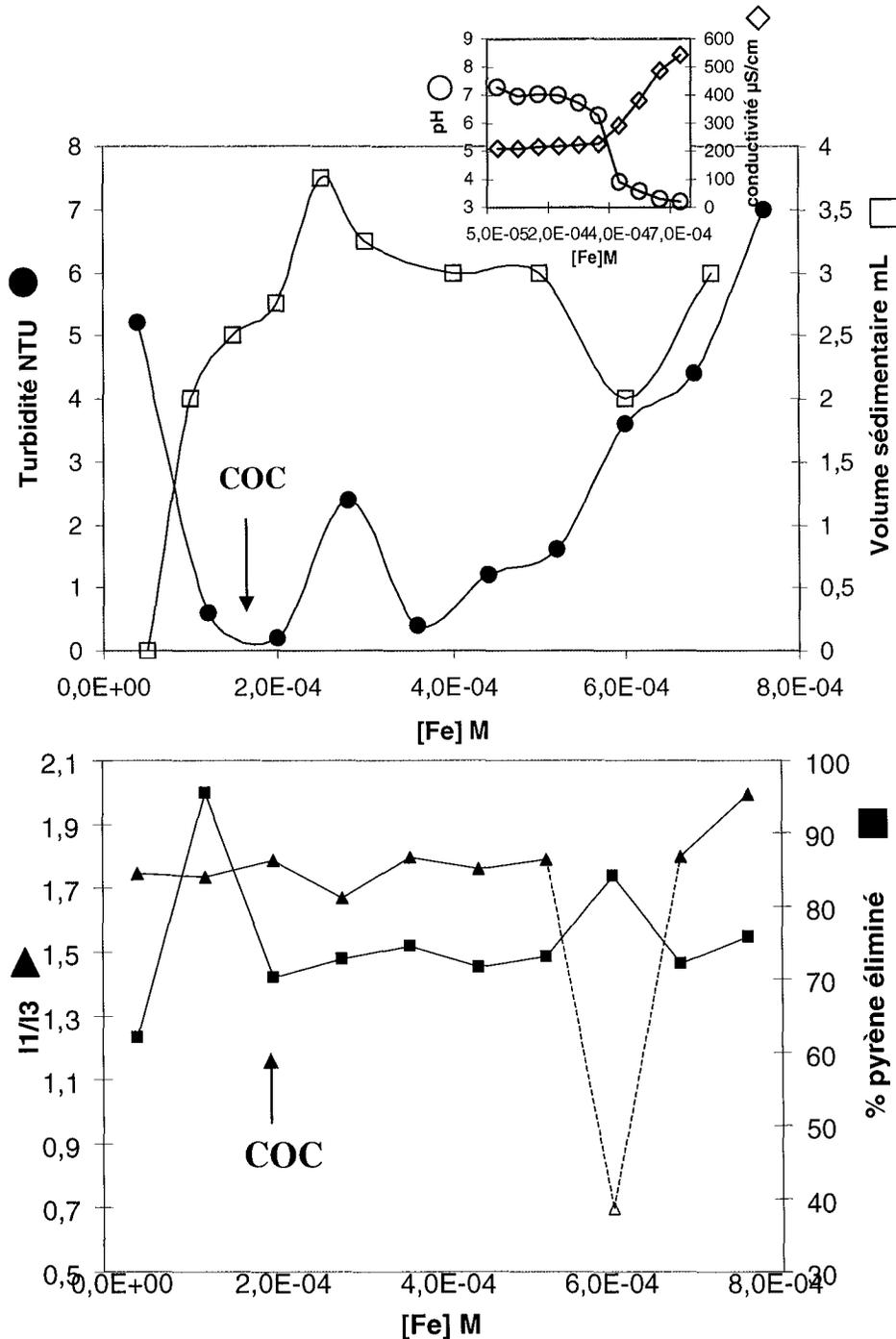


Figure V.3(8)
Jar-tests de l'Eau brute ERI.

Dans ce cas, la COC correspond à $1,5 \cdot 10^{-4}$ M. Dès l'ajout des premières doses de coagulant ($0,5 \cdot 10^{-4}$ et 10^{-4} M), l'élimination du pyrène augmente rapidement jusqu'à 95,5%. Pour la COC, l'élimination du pyrène est réalisée à 70,2%. Ensuite, lorsqu'il y a un excès de coagulant, l'élimination est mieux réalisée (entre 72 et 84% d'élimination).

V.3.2.7. Coagulation de l'Eau brute ER2 en présence de pyrène

Pour le jar-test, nous avons travaillé avec une gamme de coagulant allant de $0,25$ à $7 \cdot 10^{-4}$ M. Les résultats obtenus après 24 h de sédimentation sont présentés sur la Figure V.3(9).

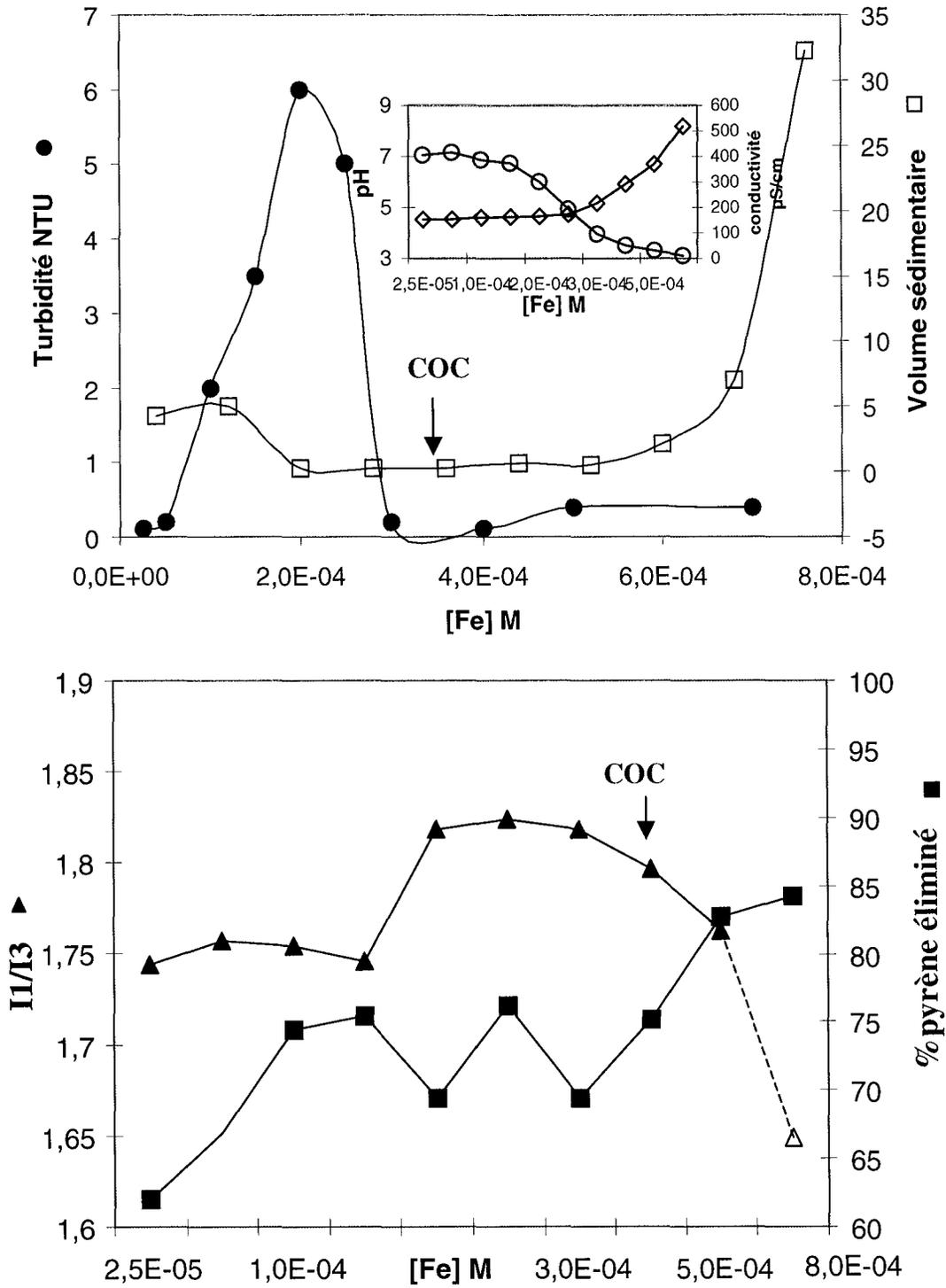


Figure V.3(9)
Résultats des jar-tests de l'Eau brute ER2.

La concentration optimale de coagulation (COC) est atteinte pour 3.10^{-4} M de nitrate ferrique. Pour ce point, la turbidité est minimale (0,23 NTU) pour un volume maximal

(6 mL). Comme pour l'Eau brute ER1, le pyrène est moins éliminé (69,5%) pour l'optimum de coagulation par rapport aux points proches de cette concentration ⁵⁶.

V.3.3. Bilans

Nous pouvons dans un premier temps comparer l'élimination des différents types de matière organique en fonction de la concentration en coagulant ajouté. Les jar-tests nous ont montré que l'allure des courbes d'évolution des volumes sédimentaires et de turbidité sont similaires entre les acides humiques synthétiques et naturels. Initialement, les agrégats formés ne sont pas suffisamment grands (ou compacts) pour sédimenter, ce qui explique leur stabilité en suspension (turbidité élevée). Dans la zone de la COC, la déstabilisation des suspensions d'acide humique conduit à la formation d'agrégats qui sédimenter. Enfin, pour des concentrations élevées en coagulant, aucune restabilisation ne se produit. Ces résultats confirment ceux de Kazpard, 2001. Concernant les différences observées pour les courbes de volumes sédimentaires entre les acides humiques naturels et synthétiques, nous pensons que l'homogénéité macromoléculaire (cf. ARTICLE I) des acides humiques synthétiques est plus importante que celles des acides humiques naturels. Ces différences de comportement des macromolécules en solution va engendrer la formation de floccs de compacité très différente, évoluant de manière distincte en solution. Notamment pour l'AHN1, les différents palliers engendrés par l'ajout de coagulant au-delà de la COC ne sont pas anodins. Ils pourraient correspondre à une hétérogénéité supplémentaire en nature chimique pour cet extrait naturel : des fragments protéiques (d'origine supposée microbienne et végétale) ont été mis en évidence par Py/CG-SM (ARTICLE I).

Pour le deuxième prélèvement d'eau de rivière (Eau brute ER2), une restabilisation est observée pour des concentrations supérieures à $5 \cdot 10^{-4}$ M en fer. Les valeurs élevées de turbidité dans cette zone témoignent d'une restabilisation s'effectuant à l'échelle des agrégats plutôt qu'à l'échelle moléculaire (Kazpard, 2001). Ce phénomène témoigne de la diversité en nature, composition et quantité (teneurs en carbone organique) de la MON aquatique de la Moselle, visible pour deux prélèvements effectués à 15 jours d'intervalle. Pour ces prélèvements, les différences constatées peuvent également s'expliquer par les teneurs variables en anions et cations minéraux dissous allant également prendre part dans le mécanisme de coagulation (Randtke, 1993).

⁵⁶ L'incertitude du dosage du pyrène est de $3 \cdot 10^{-9}$ M.

En corrélant les deux principaux paramètres (hydrophobie et taille moléculaire) habituellement utilisés en traitement de l'eau afin de prévoir l'élimination d'un certain type de matière organique aqueuse (Tableau V.3(2)), nous nous rendons compte que les phénomènes précédemment mentionnés entreraient également en ligne de compte dans l'élimination de la matière organique à proprement parlé (seule en l'absence de polluant). En effet, nous constatons que les deux acides humiques naturels, les moins hydrophobes (d'après l'indice défini dans l'ARTICLE I), nécessitent les doses les plus faibles en coagulant pour atteindre la COC. Ceci est en contradiction avec les théories généralement admises (Bose et Reckhow, 1998). Cependant, le deuxième critère (la taille moléculaire de la MON) semble ici respecté du moins pour les deux fractions synthétiques d'acide humique catéchol/triglycine (AHCT1 et AHCT2). En effet, la fraction de taille moléculaire la plus élevée (AHCT2, supérieure à 8 kDa), est la mieux éliminée (COC la plus faible). Ce résultat justifie les théories de Randtke, 1993, notamment, selon lequel les acides humiques sont généralement plus facilement éliminés que les acides fulviques dans les eaux de surface (et dans tous les cas moins que les fractions hydrophiles).

Tableau V.3(2)
Etude comparative des propriétés des différentes fractions d'acides humiques lors de la coagulation par le nitrate ferrique.

Fractions	COC (M)	Acidité totale ⁵⁷ (meq/g)	Indice hydrophobie ⁵⁸	Pyrène éliminé Avant - à la COC -après (%)	K _{sv} ⁶¹ (mL.g ⁻¹)
AHCG	9,5.10 ⁻⁴	3,7	84,5	97-96-93	4,5.10 ⁴
AHCT1 ⁵⁹	1,2. 10 ⁻³	4,3	76,6	80-60-55	1,5.10 ⁴
AHCT2 ⁶⁰	4,0.10 ⁻⁴	3,9	82,8	87-75-65	5,5.10 ⁴
AHN1	3,0.10 ⁻⁴	2,5	51,1	90-91-92	0,8.10 ⁴
AHN2	5,0.10 ⁻⁴	3,0	52,2	55-90-95	0,5.10 ⁴

⁵⁷ Il s'agit de la somme des 2 acidités (fortes et moyennes déterminées dans l'ARTICLE I) susceptible de représenter la quantité de sites d'interactions potentielles avec le coagulant, dans nos conditions initiales (pH 8). Pour l'AHCG est également pris en compte l'acidité la plus faible (étant donné la valeur du pK_{A3} 7,2).

⁵⁸ Défini dans l'ARTICLE I par CLHP.

⁵⁹ Acide humique catéchol/ triglycine 1-3,5 kDa.

⁶⁰ Acide humique catéchol/ triglycine > 8 kDa.

⁶¹ Cette constante est déterminée dans l'ARTICLE I pour des concentrations en MO inférieures à 30 mg/L, ce qui correspond bien aux teneurs en MO des surnageants des jar-tests. Les interprétations données dans ce paragraphe ne concernent pas l'AHCG dont le comportement sera discuté en fin de partie.

Nous pouvons également discuter du mécanisme d'élimination majoritaire en présence. L'acidité susceptible de quantifier le nombre total de sites d'interactions potentiels avec le coagulant a été déterminée précédemment (ARTICLE I) et est redonnée dans le Tableau V.3(2). Nous constatons que pour toutes les fractions humiques synthétiques et

naturelles confondues, les molécules ayant l'acidité la plus élevée (majoritairement purement carboxylique), sont les plus difficiles à éliminer par coagulation. Ces résultats rejoignent ceux de Kazpard, 2001 ; la densité de charge des macromolécules étant le facteur limitant de la coagulation dont le mécanisme principal passe donc par une neutralisation de charges. Par ailleurs, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une probable séquestration de Fe^{III} par les groupements carboxyliques et/ou carboxyphénoliques (ARTICLE III).

L'élimination du pyrène semble être fonction de plusieurs paramètres.

Dans tous les jar-test réalisés, malgré les différences constatées au niveau quantitatif, les étapes de traitement pour le polluant suivent le même schéma (exception faite du comportement de l'AHN1, présentant des caractéristiques particulières précédemment décrites, cf. ARTICLE I) :

- Le pyrène est rapidement éliminé à des taux supérieurs à 80, voire 90% dès l'ajout des plus faibles concentrations en coagulant ⁶². Ainsi, malgré l'absence de floccs décantables, la quantité de pyrène présent dans le surnageant diminue, ce qui ne peut s'expliquer que par une association avec la matière organique dissoute ou colloïdale restant en suspension. A ce stade, nous pouvons d'ores et déjà constater que le pourcentage de pyrène éliminé n'est pas directement corrélable avec la constante de Stern-Volmer d'association photophysique de la matière organique avec le pyrène ⁶³ (Tableau V.3(9)). Par ailleurs, il ne semble pas y avoir de lien direct entre ce même pourcentage et le degré d'hydrophobie des différentes fractions. Comme l'a suggéré Thébault, 1978, le mécanisme d'élimination majoritaire pour le pyrène ne serait pas uniquement un piégeage dans les parties hydrophobes des macromolécules, mais serait également dû à une adsorption. Si l'effet d'interaction hydrophobe/hydrophobe avait été le phénomène majoritaire gouvernant le mécanisme d'élimination du polluant, on aurait pu penser que les fractions les plus hydrophobes allaient piéger davantage le polluant et donc favoriser son élimination lors de l'ajout de coagulant (le pyrène serait vu totalement « encapsulé » par la MO et sédimenterait donc de façon proportionnelle à la quantité de MO coagulée).

⁶² Thébault, 1978, avait déterminé 91% d'élimination pour le polluant pyrène à une concentration initiale de 400 ng/L dans une eau de Seine avec une solution de chlorure ferrique commerciale.

⁶³ Cette constante est déterminée dans l'ARTICLE I pour des concentrations en matière organique inférieures à 30 mg/L, ce qui correspond bien aux teneurs en matière organique des surnageants des jar-tests. Les interprétations données dans ce paragraphe ne concernent pas l'AHCG dont le comportement sera discuté en fin de Chapitre.

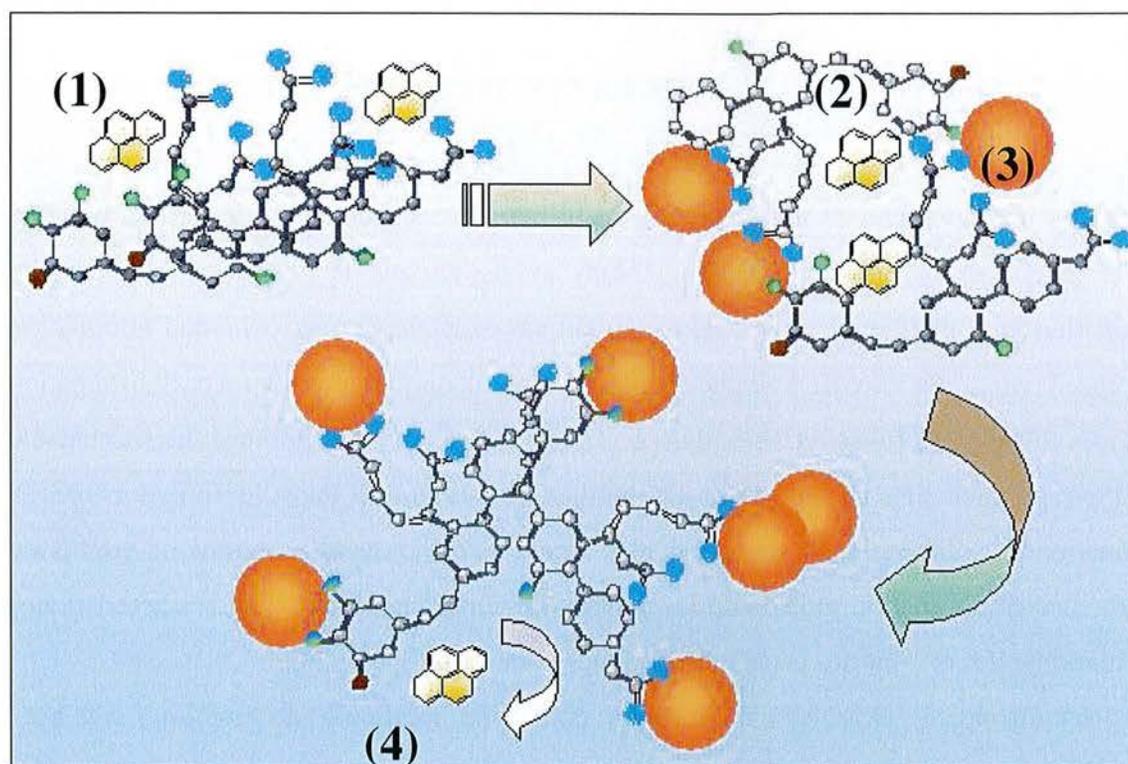
Ces résultats nous amènent à penser que le coagulant va également jouer un rôle prépondérant par rapport à l'interaction MO-pyrène en modifiant l'organisation moléculaire en solution et la conformation initiale des macromolécules en présence de pyrène. Cette hypothèse est confirmée par l'évolution du rapport de polarité du microenvironnement vu par la sonde pyrène lors des jar-tests. Mis à part l'AHCG pour lequel aucune conclusion significative ne peut être envisagée pour les raisons de limite de sensibilité de la méthode de mesure pour ce paramètre (précédemment mentionnées), le rapport I_1/I_3 diminue avant l'optimum pour atteindre un minimum à une concentration proche de la COC. Lors de la restabilisation, les variations sont aléatoires même pour une même fraction d'acide humique et ne seront pas ici discutées. Ces résultats témoignent d'une organisation en microdomaines hydrophobes à des concentrations en coagulant proches de la COC.

- Nous pouvons penser que les macromolécules vont regrouper leurs zones hydrophobes de manière « resserrée » autour du pyrène dans un premier temps. Ce phénomène est induit par la perte progressive de groupements ionisables hydrophiles due à l'ajout de coagulant. Avant la neutralisation de tous les sites chargés négativement des molécules organiques par le coagulant, le pourcentage de pyrène piégé dans les microdomaines peut donc être important.
- A la COC, la déstabilisation des microdomaines est totale. Le pyrène peut être libéré en solution. L'interaction entre la MO et le coagulant (qui semble essentiellement de nature électrostatique) est la force prédominante en solution à cette concentration.
- Après la COC, suivant la fraction de MO, le pourcentage de pyrène éliminé peut à nouveau augmenter car des interactions hydrophobes/hydrophobes peuvent à nouveau se mettre en place sans être masquées ou perturbées par des liaisons covalentes qui se forment.

Les interprétations précédemment données expliquent bien le mécanisme pour les fractions humiques synthétiques, car la neutralisation de charge semble être essentiellement responsable de l'élimination de la MO. Pour les acides humiques naturels, étant donné que le maximum absolu dans les % d'élimination du pyrène est atteint légèrement après la COC, nous ne pouvons pas exclure l'existence d'un 2^{ème} mécanisme (de type ennoisement ou pontage) lors de la coagulation. Cependant, l'hypothèse des différences en nature des matières organiques en elles-mêmes, et notamment l'abondance de groupements aminés mis en évidence dans les acides humiques naturels (ARTICLE I) nous ferait plutôt penser à l'existence de différents types de microdomaines hydrophobes, de réactivité différente avec le pyrène. En effet, il est intéressant de constater le parallélisme entre l'AHN1 (très riche en liaisons peptidiques) et l'AHCT > 8 kDa : le minimum de polarité vue par la sonde pyrène coïncide exactement avec le minimum d'élimination du pyrène. Nous pouvons suggérer que les liaisons peptidiques vont donc influencer l'effet d'emprisonnement du pyrène lors de la coagulation et la structure des agrégats.

Le seul mécanisme de neutralisation de charge pourrait suffire à expliquer nos résultats dans ce cas.

Le schéma présenté à la Figure V.3(10) résume les mécanismes proposés.



Molécule de pyrène (adsorbé majoritairement (1) puis successivement piégé dans les régions hydrophobes de la matière organique par effet de reconfiguration des macromolécules (2) sous l'action du coagulant (3) et relargué dans le milieu (4) suivant la nature de la MO).

Figure V.3(10)

Evolution du complexe MON-pyrène lors de l'ajout de coagulant.

Enfin, nous pouvons approfondir les différences observées entre les différentes fractions grâce à l'effet d'organisation moléculaire notamment mis en évidence par tension de surface (ARTICLE II). Nous constatons en effet (contrairement aux autres fractions), l'excellente corrélation obtenue entre la constante de Stern-Volmer, le degré d'hydrophobie et le pourcentage d'élimination du pyrène pour la fraction AHCG. Le comportement de polyélectrolyte à structure plus flexible et linéaire (par rapport aux autres fractions) avait été suggéré lors de notre étude par spectrofluorimétrie et tension de surface (ARTICLES I et II). Ce polymère, présentant des microdomaines hydrophobes plus accessibles au pyrène du fait de sa structure va donc permettre une élimination optimale pour ce polluant lors de son élimination. La présence de composés à caractère plus tensio-actif (comme les acides humiques naturels) ne va pas déplacer la COC à des concentrations supérieures, mais va gêner l'élimination du pyrène au final. Les groupements peptidiques peuvent encore une fois être incriminés.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE L'ÉLIMINATION DU PYRÈNE LORS DE LA COAGULATION DE LA MATIÈRE ORGANIQUE

Dans une approche de traitement de l'eau, nous avons mis en évidence l'association entre le pyrène et la matière organique. Nous avons vu que la concentration optimum d'élimination de la matière organique ne coïncidait pas exactement avec celle de l'élimination du pyrène. Il existe un taux de traitement optimal à partir duquel le rendement d'élimination en micropolluant se stabilise, et peut, dans le cas de surtraitement, diminuer. Le mécanisme dépend en premier lieu de la nature de la matière organique dans le milieu et de sa conformation en solution. Ainsi, les molécules à caractère fortement protéique ne vont donc pas influencer l'élimination globale de la matière organique, mais plutôt ses caractéristiques conformationnelles et donc ses capacités de piégeage des micropolluants.

Par ailleurs, il existe un compromis entre une meilleure accessibilité des sites ionisés⁶⁴ des macromolécules aux espèces coagulantes et la reconformation des macromolécules pouvant engendrer le piégeage ou la remise en solution du pyrène (suivant la concentration en fer). La structure des macromolécules en solution va donc modifier le type du mécanisme d'élimination avec le coagulant. La neutralisation de charge pourrait suffire *a priori* à expliquer le phénomène. Cette hypothèse reste à confirmer par la mise en œuvre d'autres techniques permettant d'avoir accès au potentiel d'oxydo-réduction du fer en solution (mesures par électrochimie).

Nous pouvons enfin apporter quelques remarques et limitations à nos résultats. Nous devons en effet garder à l'esprit que nous comparons et nous servons de mesures globales utilisées en traitement de l'eau (turbidité et volume sédimentaire) entachées d'une erreur (essentiellement de lecture) environ 10 fois supérieure à celle commise dans le dosage du pyrène par spectrofluorimétrie. Il est donc très difficile d'apprécier exactement et de définir des domaines exacts de concentrations en coagulant pour lesquels l'un ou l'autre des mécanismes envisagés existe de façon claire. Nous ne pouvons que proposer plusieurs mécanismes globaux, en définissant dans notre cas 3 zones principales de variation du comportement des acides humiques par rapport au pyrène lors de la coagulation.

Les autres limitations de cette partie de notre travail concernent les résultats quantitatifs du dosage du pyrène. En effet, malgré l'effort analytique mis en œuvre afin de

⁶⁴ A ce pH, d'après les résultats de dosage des différentes acidités, nous savons que les groupements carboxyliques et/ou phénoliques associés aux parties aminées sont en majorité chargés négativement ($pH > pK_{A1}$ et pK_{A2}).

corriger toute interférence matricielle provenant de la matière organique associée au pyrène lors du dosage, nous pensons que ces résultats devraient être envisagés en utilisant d'autres techniques de dosage, passant par des étapes d'extraction (utilisation de solvants organiques) préalables éventuelles et utilisant une détection chromatographique par exemple (CLHP) ou encore une extraction sur résine. Actuellement, l'utilisation de résines XAD-2 (Amberlite) est d'un usage encore courant dans les pays anglo-saxons (Stepan et Smith, 1977 ; Stepan et al., 1978). Thébault, 1978, avait quant à lui utilisé la technique d'extraction liquide/liquide pour doser le pyrène et l'anthracène dans des essais de coagulation de la matière organique par 2 étapes d'extraction successives avec le cyclohexane.

Les perspectives sont nombreuses. Notre pH de travail, représentant les conditions naturelles aquatiques de la Moselle, n'est certainement pas le pH optimal de l'élimination du micropolluant. Thébault, 1978, a en effet montré que le pH optimal se situerait plutôt aux alentours de la neutralité, voire de conditions légèrement acides pour l'eau traitée. Des essais réalisés sur des gammes de pH plus étendues permettraient de confronter à la fois le type de mécanisme d'élimination de la matière organique vis-à-vis du coagulant, et aussi les hypothèses formulées quant au rôle des différents groupements ionisables des acides humiques suivant leurs acidités respectives.

Par ailleurs, il serait intéressant d'effectuer, lors des jar-tests, le dosage du COT/COD, de Fe et de NO_3^- afin de réaliser des bilans de matière en matière organique et espèces susceptibles d'être présentes en solution.

L'utilisation d'autres coagulants pourrait également être intéressante (sels d'aluminium notamment) afin de comparer les rendements d'élimination pour le polluant et les optimiser.

Il serait également intéressant d'envisager des mesures de vitesse de sédimentation et de granulométrie des floccs formés en parallèle afin de comprendre le rôle de l'architecture et connaître la contribution des liaisons faibles en présence dans le mécanisme de coagulation.

Pour compléter cette étude, il serait enfin possible d'effectuer une filtration du surnageant sur charbon actif afin d'optimiser l'élimination du polluant, ou encore d'effectuer une nanofiltration.

Enfin, les mêmes expériences peuvent être mises en œuvre avec les molécules d'herbicides et les tensio-actifs pour compléter cette étude de traitabilité. Les techniques analytiques de dosage doivent cependant être choisies avec un certain nombre de précautions, permettant de s'affranchir de problèmes d'interférences dus à la matrice organique et de descendre à des seuils de sensibilité très bas. A cette fin, des techniques de chromatographie (liquide ou gazeuse), nécessitant éventuellement des préparations pré-analytiques particulières (par exemple des extractions par solvants organiques, cf. Thébault, 1978) peuvent être envisagées.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'étude des molécules humiques en solution a montré que l'utilisation de sondes de fluorescence était délicate d'application et d'interprétation. Diverses techniques analytiques complémentaires doivent en réalité être mises en jeu afin de répondre de façon non biaisée et reproductible à la question du comportement de ces substances en solution aqueuse et de leur caractérisation moléculaire. De grands espoirs résident dans l'utilisation de méthodes liées à l'exploitation directe du signal de fluorescence de ces macromolécules, qui doivent encore être développées afin d'en saisir toute la portée.

La mise en évidence du quenching de fluorescence des substances humiques par différentes familles de polluants du milieu aquatique nous a permis de déterminer des indices de complexation entre les molécules organiques. Ces indications peuvent conduire à des prévisions de persistance d'action ou de contamination des cours d'eau pour un produit donné. L'étude de la complexation sur des polymères catéchol-glycine et catéchol-triglycine a montré que ces modèles présentaient des coefficients d'association plus élevés que ceux des acides humiques naturels. Plusieurs hypothèses de mécanismes d'interactions ont été proposées. Des études plus poussées, avec des moyens analytiques plus performants, seraient nécessaires pour comprendre les mécanismes réactionnels conduisant à ce type d'interactions. La spectrométrie de masse (notamment l'électro-ionisation), pratiquée sur des oligomères formés au début du processus de polymérisation et sur d'autres modèles prenant en compte les caractéristiques des substances naturelles de notre étude (incorporation de tryptophane par exemple), ou des études en diffusion de RMN, pourraient par exemple fournir des informations intéressantes.

Ce travail a enfin montré l'intérêt des modèles de substances humiques pour des investigations globales concernant le comportement des polluants d'origine xénobiotique dans le milieu aquatique. Notre étude, abordant à la fois les aspects de l'utilisation de ces substances dans le cadre de leurs propriétés à l'échelle moléculaire et de leur impact en traitement de l'eau, laisse encore beaucoup de questions en suspens, mais aura convaincu le lecteur, du moins nous l'espérons, des perspectives ouvertes par ce type de recherche.

ANNEXE 1 : Les contributions de la ZAM, liste des laboratoires et des directeurs de recherche

CEGUM

Centre d'Etudes Géographiques de l'Université de Metz , Laboratoire de
Géographie Physique. UFR Sciences Humaines et Arts, Ile du Saulcy,
57045 METZ Cedex 01

Tél : 03 87 31 59 78; fax : 03 87 31 52 55 ou 59 70

e-mail : corbonnois@zeus.univ-metz.fr

J. CORBONNOIS

CRF-INRA

Centre de Recherches forestières ; Forêt d'Amance ; 54280 Seichamps

Tel : +33 (0)3 83 39 40 41, Fax : +33 (0)3 83 39 40 69

e-mail : dambrine@nancy.inra.fr

E. DAMBRINE

CRPG

Centre de Recherches Pétrographiques et Géochimiques ; UPR-CNRS 2300 ;
15, rue notre-Dame des Pauvres ; 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy

Tel : +33 (0)3 83 59 42 02, Fax : +33 (0)3 83 51 17 98

e-mail : carignan@crpg.cnrs-nancy.fr

B. MARTY

EBSE

Ecotoxicité, Biodiversité et Santé Environnementale; EA 3473, UFR
Sciences Fondamentale et Appliquée. Campus Bridoux, rue du

Général Delestraint, Université de Metz, 57070 Metz

Tél : 33 (0)3 87 737 85 00; fax : 33 (0)3 87 37 85 12

e-mail : ebse@sciences.univ-metz.fr

P. VASSEUR

S. MULLER

J. C. PIHAN

G2R

UMR 7566 CNRS - Université Henri Poincaré, Nancy 1 - INPL - CREGU,

Géologie et Gestion des Ressources Minérales et Energétiques ,

Faculté des Sciences - BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex

Tel : +33 (0)3 83 68 47 02 , Fax : +33 (0)3 83 68 47 01

e-mail : jacques.leroy@g2r.uhp-nancy.fr

J. LEROY

IDEDE

Institut de Droit et Economie des Dynamiques en Europe ;

Université de Metz ; Ile du Saulcy ; 57045 Metz Cedex

Tel : +33 (0)3 87 31 57 39, Fax : +33 (0)3 87 31 50 77

e-mail : roselyne.allemand@wanadoo.fr

L. JOB

R. ALLEMAND

ILGU

Institut Lorrain de Génie Urbain ; 22-24 Viaduc Kennedy ;
54035 Nancy Cedex
Tel : +33 (0)3 83 91 83 39, Fax : +33 (0)3 83 91 83 46
e-mail : davaine@id-net.fr
J.J. DAVAINÉ

LAEGO

Laboratoire Environnement-Géomécanique et Ouvrages ; rue du Doyen
Marcel Roubault ; 54500, Vandoeuvre-lès-Nancy
Tel : +33 (0)3 83 59 63 12, Fax : +33 (0)3 83 59 63 00
e-mail : Michel.Bues@ensg.inpl-nancy.fr
M. BUES

LCPME

UMR 7564 CNRS - Université Henri Poincaré, Nancy 1 Laboratoire Chimie
Physique et Microbiologie pour l'Environnement, 405, rue de Vandoeuvre,
54600 Villers-lès-Nancy
Tel : +33 (0)3 83 68 52 20, Fax : +33 (0)3 83 27 54 44
e-mail : ehrhhardt@lcpce.cnrs-nancy.fr
J.J. EHRHARDT

LEMGRESD

Laboratoire Environnement et Minéralurgie ; UMR CNRS-INPL 7569 ;
15, avenue du Charmois ; 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy
Tel : +33 (0)3 83 59 62 81, Fax : +33 (0)3 83 59 62 00
e-mail : jean-luc.bersillon@ensg.inpl-nancy.fr
J. YVON

LIMOS

Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique
dans les Sols. FRE 2440-CNRS - Université Henri Poincaré, Nancy 1,
Faculté des Sciences - BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex
Tel : +33 (0)3 83 51 08 60 , Fax: +33 (0)3 83 57 65 23
e-mail : leyval@cpb.cnrs-nancy.fr
C. LEYVAL

LSE-INRA

Laboratoire Sol et Environnement ; URA 1006 INRA-INPL ; 2, avenue de la
Forêt de Haye ; 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy
Tel : +33 (0)3 83 59 58 65, Fax : +33 (0)3 83 59 57 91
e-mail : Jean-Louis.Morel@ensaia.inpl-nancy.fr
J. L. MOREL

LTAC

Laboratoire de Thermodynamique et d'Analyse Chimique, Université de
Metz, Ile du Saulcy, 57045 Metz Cedex 01
Tel : +33 (0)3 87 31 54 34, Fax : +33 (0)3 87 31 54 34
e-mail : rogalski@ipc.sciences.univ-metz.fr
M. ROGALSKI

SERES

Service Environnement et Recherches en Santé Publique; INSERM U420
Faculté de Médecine, avenue de la Forêt de Haye,
54500 Vandoeuvre-lès-Nancy
Tel : +33 (0)3 83 68 34 81, Fax : +33 (0)3 83 68 34 89
e-mail : Philippe.Hartemann@medecine.uhp-nancy.fr
P. HARTEMANN

SRSMC

UMR 7565 CNRS - Université Henri Poincaré, Nancy , Structure et Réactivité
des systèmes moléculaires complexes , Faculté des Sciences - BP 239,
54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex
Tel : +33 (0)3 83 91 23 79 , Fax : +33 (0)3 83 91 25 30
e-mail : yves.chapleur@meseb.uhp-nancy.fr
Y. CHAPLEUR

SSADINRA

INRA Station Systèmes Agraires et Développement ; 88000 Mirecourt
Tel : +33 (0)3 29 38 55 00
Fax : +33 (0)3 29 38 55 19
e-mail : benoit@mirecourt.inra.fr
M. BENOIT

ANNEXE 2 : La Sécheresse de l'été 2003



Vue aérienne de Liverdun (15 km amont Richardménil) au mois de juillet 2003-
vue aérienne de l'étiage et bloom algal.

ANNEXE 3: dispositif de prélèvements des MES

1



2



3



1. Prise d'eau.
2. Centrifugeuse de terrain pour le recueil des matières en suspension.
3. Vue panoramique de la station de pompage de Nancy (à gauche un bassin de réserve, à droite notre point de prélèvement sur la Moselle).

Carbone Organique Total (COT)

Les mesures de COT ont été effectuées par au Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les Sols (LIMOS) par Madame Gérard.

Principe

Le carbone organique total est obtenu par mesure en spectroscopie infra-rouge du gaz carbonique dégagé par la calcination d'une quantité de 6 mL de surnageant dans un four à 900°C. Il s'agit d'un dosage par oxydation thermique.

Appareil et préparation analytique

L'appareil Dorhmann 190 (Teledyne Technologies, Los Angeles, Etats Unis) est préalablement calibré par une solution de phtalate tamponnée.

Analyses élémentaires (C, N, H, O)

Le phosphore a été dosé par Monsieur Marin au CRPG et les dosages C, N, H, O par Madame Gérard.

Principe

Le principe est basé sur la transformation du carbone en CO_2 , de l'azote en oxydes d'azote et du soufre en SO_2 . Pour cela, l'échantillon est brûlé à 1000°C sous un courant d'oxygène. Les gaz de combustion sont entraînés vers divers réactifs tels que sur de l'oxyde de cuivre pour parfaire la combustion et sur du carbohydroné pour retenir l'eau formée. Les oxydes d'azote sont retenus les moins longtemps sur cette colonne, le CO_2 a un temps de rétention légèrement plus fort (90s) et le SO_2 a un temps de rétention proche de 15min. Les différents gaz sont détectés par catharométrie. Un filament électrique fournit les calories qui sont cédées au bloc injecteur via le gaz vecteur. La température du filament sera d'autant plus élevée que la conductibilité du gaz sera mauvaise. La variation de température entraîne une variation de résistance. En pratique, on effectue la mesure différentielle entre le filament balayé par le gaz vecteur pur (référence) et un filament balayé par le gaz de mesure provenant de la colonne. Ces éléments sont placés dans un pont de Wheastone.

Dans un premier temps, le point est équilibré en faisant passer du gaz vecteur dans les deux cellules. Au passage de gaz, on mesure un déséquilibre du pont. Celui-ci varie en fonction de la concentration en azote, carbone ou soufre.

Appareil et préparations analytiques

L'appareil Carbo Erba 1108 (Orono, Etats Unis) a été utilisé pour des solutions liquides d'acides humiques de 100 mg/L. Remarque pour le phosphore : la solution a été préparée dans de l'eau oxygénée (30%) afin de se débarrasser de la matière organique susceptible de gêner la détection colorimétrique. Les résultats fournis nous ont démontré une teneur en phosphore à l'état de traces (< 0,05 en pourcentage pondéral).

Titration potentiométrique (détermination des acidités des AH)

Les titrations potentiométriques des acides humiques ont été effectuées avec l'aide de Madame Shouller et Monsieur Thomas au LEM.

Principe

La méthode appliquée repose sur celle développée par Prélot, 2001. Les données de titrage potentiométrique (pH de la solution en fonction du volume en titrant ajouté) sont considérées comme une isotherme d'adsorption de protons (ou d'hydroxyles).

La quantité d'hydroxyles adsorbés N_{ads} (mol/m²) est donnée par l'expression suivante :

$$N_{ads} = \frac{\Delta V \cdot C}{m \cdot S} - Y_{shift}$$

avec ΔV la différence entre le volume de titrant ajouté à la référence (V_e), et celui ajouté à la suspension (V_s) pour atteindre un même pH ($\Delta V = V_s - V_e$).

C la concentration de la base (mol/L)

S la surface spécifique BET azote de l'échantillon (m²/g) (Hill, 1956)

m la masse de solide (g).

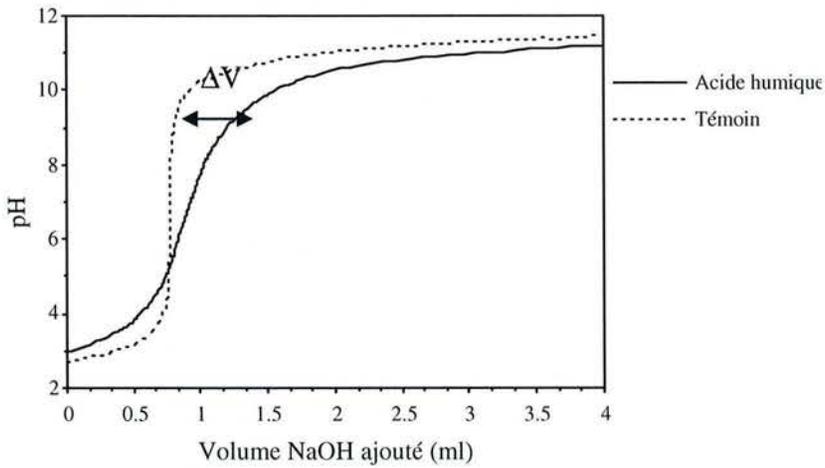
Afin de travailler sur un format de type « isotherme » d'adsorption, les courbes sont translattées d'une quantité Y_{shift} suivant le principe donné à la Figure A(1).

Ensuite, le nombre élevé de points expérimentaux et la précision obtenue grâce au titrateur haute résolution permettent de travailler directement et sans interpolation pour le calcul de la dérivée de la quantité adsorbée N_{ads} par rapport au pH (dN_{ads} / dpH). Celle-ci est calculée à partir des points expérimentaux uniquement, selon une fenêtre glissante large de 4 points de part et d'autre du point considéré.

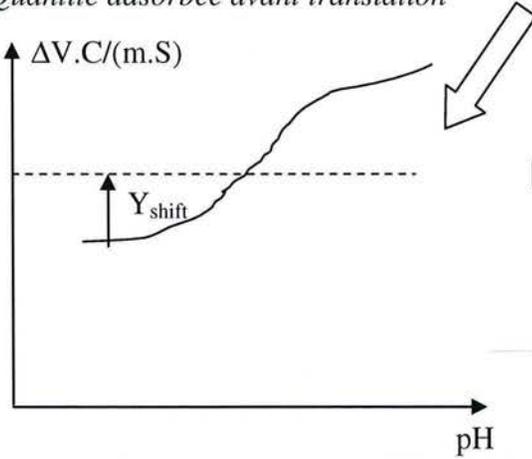
Enfin, la courbe est recomposée par des dérivés d'isothermes théoriques de type BRAGG-WILLIAM-TEMKIN (Bragg et Williams, 1934 et 1935) suivant la démarche étudiée à l'interface solide /gaz d'après l'étude de Prélot, 2001 (Figure A(2)).

Le pH (ou pK) étant proportionnel à une enthalpie par la relation pH ou $pK = \frac{\Delta G^\circ}{2,303kT}$, l'axe des abscisses (pH) est un axe d'énergie comme pour l'adsorption de gaz. La position du pic correspond à une énergie globale (ou pK) pour le domaine défini. En conséquence, les courbes dN_{ads} / dpH en fonction du pH traduisent alors une distribution d'affinité du proton pour la surface. Ce résultat est obtenu directement à partir des données expérimentales sans l'intervention de modèle électrochimique, ni l'utilisation de procédure de lissage ou d'interpolation des données relatives à la suspension. La décomposition de l'isotherme expérimentale en isothermes dérivées locales permet d'obtenir différents paramètres relatifs à chaque pic : position, largeur à mi-hauteur, quantité de protons ou d'hydroxyles adsorbés. La position de ce « pK » local n'est pas encore défini avec certitude. Deux explications peuvent être retenues. Ce pK local pourrait correspondre à un pK de demi-neutralisation d'une réaction unique. Il est aussi envisageable que ce pK local soit la résultante de plusieurs réactions de protonation/ déprotonation. Dans ce cas, la position du pic indique alors un point de charge nulle pour le domaine considéré. L'aire du pic renseigne sur la quantité de protons ou d'hydroxyles adsorbés, donc permet la détermination des acidités des AH (donnée en meq/g).

Résultat brut du titrage potentiométrique



Quantité adsorbée avant translation



Isotherme d'adsorption d'hydroxyles

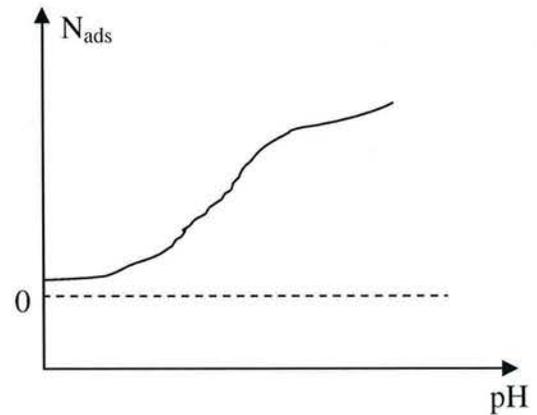


Figure A(1)

Principe de traitement des données de titrage potentiométrique (Prélot, 2001).

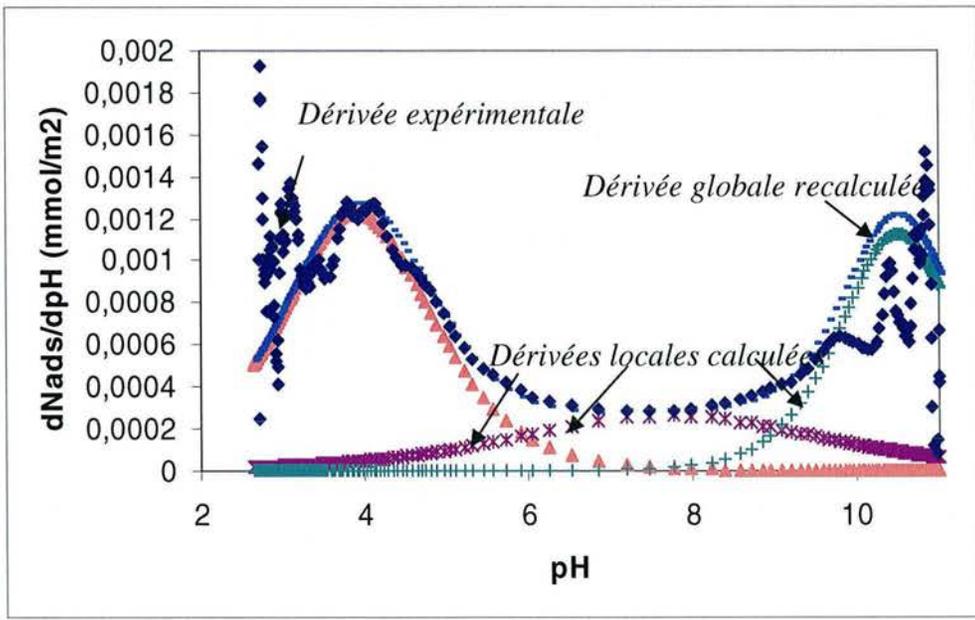


Figure A(2)

Distribution d'affinité de protons lors du dosage potentiométrique.

Appareillage et préparation analytique

La titration de l'acide humique HA a été faite en dissolvant une masse connue d'AH (environ 20 mg) dans une solution contenant 50 mL NaCl (10^{-1} N). Le titrant utilisé est le NaOH (0,1 M). Une titration du témoin 50 mL NaCl par NaOH a été réalisée dans les mêmes conditions en utilisant un titrateur haute résolution développé en collaboration avec Christian Mustin du Centre de Pédologie Biologique de Vandoeuvre.

Le titrateur est composé des éléments suivants:

1/ Un réacteur thermostaté à double paroi dans lequel un flux d'azote est maintenu afin d'empêcher la carbonatation des suspensions par le CO₂ atmosphérique. Le contrôle de la température est assuré par un thermocryostat (Heto Lab Equipment, HMT 200 et CBN 8-30).

2/ Un pHmètre-ionomètre (Radiometer Copenhagen - Tacussel électronique, Ion Analyser PHM250, gamme Meterlab) sur lequel est adaptée l'électrode de pH (GK2041 Tacussel électronique).

3/ Une autoburette (Radiometer Copenhagen - Tacussel électronique, ABU 901) sur laquelle est adaptée un stand de 20 mL.

4/ Un ordinateur muni de cartes de communication spécifiques assure la gestion des appareils et trace en continu le pH et la dérivée expérimentale.

Chromatographie liquide haute-performance en phase inverse

Les mesures ont été réalisées au DCPR avec l'aide de Mademoiselle Frochot.

Principe

Nous avons utilisé la chromatographie de partage avec une colonne en C_{18} (Figure A(3)).

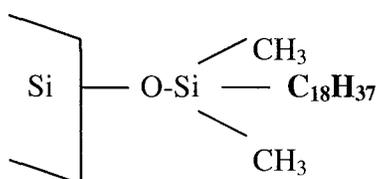


Figure A(3)

Chromatographie de partage en C_{18} sur silice greffée.

Elle est dite en « phase inverse » car l'éluant est polaire (acétonitrile/eau) et la colonne est apolaire.

Le solvant organique s'adsorbe préférentiellement à la surface des greffons apolaires. Les solutés sont donc partagés entre la phase mobile et la phase liquide adsorbée sur les greffons. En général (Görner, 2003), les composés apolaires sont plus retenus par la colonne que les composés polaires dans l'ordre suivant : hydrocarbures saturés > hydrocarbures insaturés > alcools > amides > acides carboxyliques.

L'augmentation de la teneur en solvant organique de la phase mobile (diminution de la polarité de celle-ci) accélère l'éluion.

Appareillage et préparation analytique

Les mesures ont été réalisées sur un modèle DGU-14A (Shimadzu, Kyoto, Japon) équipé d'un détecteur fluorescent (RF-10AXL) avec une pompe de type LC-10AT. 50 μ L de solutions d'acide humique à 30 mg/L ajustées à pH 8 ont été injectées dans une colonne Lichrosorb (5 μ m, 150 * 4 mm ; Agilent Technologies, Palo Alto, Etats Unis). Un gradient eau/acétonitrile a été utilisé pour déterminer les coefficients de partage hydrophobe/hydrophile : 5 min de 0 à 10% d'acétonitrile puis 30% à 9 min et 70% à 13 min pour atteindre les 100% à 17 min et continué dans des conditions isocratiques pendant encore 23 min durée totale pour un chromatogramme : 40 min). Le débit d'éluion a été fixé constant à 0,8 mL/min. Cette méthode est décrite dans Wu et al., 2002.

Pyrolyse chromatographie gazeuse couplée avec spectromètre de masse (Py/GCMS)

Les expériences de Py/GCMS ont été réalisées grâce à Madame Filippi (Suez-Environnement/ Service analytique du CIRSEE (Le Pecq, France) dirigé par Monsieur Bruchet.

Principe

La Py-GCMS est une méthode de caractérisation applicable aux structures organiques complexes. Elle est basée sur l'identification de sous-produits issus de leur dégradation thermique. Par une flash pyrolyse, les structures organiques complexes sont cassées. Les sous-produits de pyrolyse sont alors séparés par chromatographie gazeuse puis détectés par spectrométrie de masse.

Appareillage et préparation analytique

Environ 0,4 mg de produit à analyser sont introduits dans un tube de quartz.

Le tube de quartz est placé dans le filament du pyrolyseur CDS PYROPROBE 2000 (Oxford, Etats Unis), dans lequel l'échantillon est chauffé rapidement à 620°C avec une augmentation de température de 20°C/ms.

Après pyrolyse, les fragments obtenus sont entraînés par un courant d'hélium vers un couplage CG-SM (FISONS MD800). Ils sont séparés sur une colonne capillaire DBWax (Agilent Technologies, Palo Alto, Etats Unis) de 30m, de diamètre 0,32 mm avec une épaisseur de film de 0,5 µm. La température du four est programmée de 30 à 220°C à 3°C/min.

Les pics sont identifiés en spectrométrie de masse opérant en impact électronique à 70eV, sur une gamme de scans de 30 à 350 amu avec un balayage de 1 scan/s.

Les fragments identifiés sont classés, par comparaison à des étalons en 5 familles de biopolymères:

- Les polysaccharides
- Les protéines
- Les aminosucres
- Les composés polyhydroxyaromatiques ou PHA: ceux-ci désignent les composés polyphénoliques, ils comprennent en particulier les substances humiques et les dérivés de lignine.

- Les composés divers: cette classe regroupe tous les fragments qui n'ont pas pu être attribués à l'une des classes précédentes.

Une méthode de calcul semi quantitative basée sur les fragments caractéristiques produits par les biopolymères permet d'estimer les proportions relatives de ces différentes familles. Cette estimation prend en compte les différents facteurs de réponse des composés organiques en GC-MS (Bruchet et al., 1985).

Absorption UV-visible

Principe

La technique d'absorption UV-visible est basée sur la propriété de la matière, et plus particulièrement de certaines molécules, d'absorber certaines longueurs d'ondes du spectre UV-visible. Elle permet de réaliser des dosages grâce à la loi de Beer-Lambert qui montre une relation de proportionnalité entre l'absorbance et la concentration, aussi bien qu'une étude structurale des complexes par l'étude des spectres d'absorption.

~ Loi de Beer-Lambert : $I = I_0 * 10^{-\epsilon.C.l}$

~ Absorption : $A = \log (I_0/I)$

- I : intensité lumineuse transmise
- I_0 : intensité lumineuse incidente
- ϵ : coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde λ ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$)
- C : concentration ($mol.L^{-1}$)
- l : trajet optique (cm)

Appareillage

Pour cette étude, la mesure de l'absorption, effectuée à l'aide d'un appareil de marque SHIMADZU (Kyoto, Japon), permet de tracer les spectres UV pour des longueurs d'ondes comprises entre 200 et 700 nm le plus souvent. L'appareil fonctionne par double faisceau.

Les cuves de mesures sont en quartz (1 cm de trajet optique).

Spectroscopie infra-rouge en transmission à transformée de Fourier (FTIR)

Les spectres de nos échantillons ont été réalisés par Madame Barrès au LEM.

Principe

La spectrométrie d'absorption infra-rouge concerne l'étude de l'ensemble des transitions résonantes induites par des rayonnements dans la gamme de 400 - 4000 cm^{-1} . Le signal est enregistré quand il y a variation du moment dipolaire de la molécule sous l'effet de l'onde électromagnétique incidente. Dans ces conditions la vibration est active en infra-rouge. La mesure consiste donc à construire la courbe de l'intensité absorbée en fonction de la longueur d'onde. Cette dernière pour laquelle le faisceau incident est absorbé, est caractéristique de la nature et de l'environnement local des liaisons chimiques (local parce que les phénomènes inductifs des moments polaires sont de courte portée). L'intensité des spectres enregistrés est une fonction de l'abondance et de la probabilité d'absorption du vibreur. La spectrométrie infra-rouge permet donc d'étudier les liaisons chimiques que contient un composé.

Appareil et préparation analytique

Les analyses sont faites en transmission, c'est-à-dire que le faisceau infra-rouge est collecté par le détecteur après avoir traversé l'échantillon. L'appareil utilisé est un interféromètre à Transformée de Fourier IFS 55 commercialisé par la société Bruker (Billerica, États-Unis). L'interférométrie permet d'obtenir une plus grande sensibilité et une diminution du temps de mesure par rapport à un système conventionnel. Les mesures sont réalisées par un détecteur DTGS. Un point est mesuré tous les 4 cm^{-1} . Les autres points sont obtenus par interpolation suite à la transformée de Fourier. L'acide humique initial et les sédiments lyophilisés sont analysés en IR en diluant 2 mg du composé à analyser dans 100 mg d'une matrice non absorbante de KBr. Le mélange est ensuite pastillé sous presse.

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les mesures ont été réalisées à l'ENSIC par Monsieur Fabvre.

Principe

La résonance magnétique nucléaire (RMN) permet d'avoir des renseignements sur l'environnement chimique local d'un noyau. Seuls les atomes dont le noyau est doté d'un nombre quantique de spin non nul peuvent être étudiés par RMN, ce qui n'est pas le cas de tous les noyaux. Le spin nucléaire étant la résultante des spins portés par chaque neutron et chaque proton, il en découle que tous les noyaux ayant un nombre pair de protons et de neutrons ont un nombre quantique de spin nul et ne peuvent donner lieu à la résonance magnétique nucléaire. C'est le cas de l'isotope 12 du carbone (6 protons et 6 neutrons), de l'isotope 16 de l'oxygène (8 protons et 8 neutrons). Le noyau, à nombre quantique de spin I non nul, constitue un dipôle magnétique qui dans un champ d'induction B_0 est soumis à un couple de moment M :

$$M = \mu \wedge B_0 = \gamma (h/2\pi) I B_0$$

Avec μ le moment magnétique de la particule

B_0 le champ d'induction

γ le rapport gyromagnétique du noyau

h la constante de Planck

Sous l'influence du couple de moment M , l'extrémité du vecteur moment magnétique décrit un mouvement de précession autour de l'axe du champ magnétique, appelé mouvement de fréquence ν , fréquence de Larmor donnée par l'expression suivante :

$$\nu = (\gamma/2\pi) B_0 \text{ (Equation de Larmor)}$$

Dans le champ magnétique d'induction B_0 le vecteur moment magnétique ne peut prendre que certaines directions privilégiées, chacune d'entre elles correspondant à une énergie bien déterminée E . En effet, le nombre quantique de spin peut prendre toutes les valeurs comprises entre $+I$ et $-I$ par pas de 1, d'où autant de valeurs de l'énergie. Les noyaux se répartissent sur $(2I+1)$ états d'énergie séparés par le même intervalle d'énergie ΔE tel que :

$$\Delta E = (\gamma h / 2\pi) B_0$$

Pour déterminer le rapport gyromagnétique γ qui est caractéristique du noyau, il faut déterminer l'intervalle d'énergie ΔE , ce qui est fait par une méthode de résonance. A cette fin, l'échantillon placé dans le champ magnétique d'induction B_0 est entouré d'une bobine parcourue par un courant alternatif. Cette bobine engendre un champ électromagnétique d'induction susceptible de céder de l'énergie au milieu nucléaire. Cette énergie ne pourra être cédée au système de spins que lorsque l'énergie des photons ($h\nu$) sera égale à l'énergie qui sépare les différents états d'énergie autorisés aux noyaux.

Appareil

Le spectromètre RMN utilisé (Avance, 300 MHz) est commercialisé par Bruker (Billerica, Etats Unis).

Spectrométrie d'émission atomique à ionisation induite par plasma (ICP-AES)

Les mesures ont été réalisées au Centre de Recherche Pétrographique et Géologique (CRPG) de Vandoeuvre-lès-Nancy dans le service commun d'analyse des roches et minéraux (SARM) sous la responsabilité de Monsieur Morel.

Principe

La quantification des abondances élémentaires des échantillons est basée sur la capacité de l'appareil à séparer un spectre d'émission assez complexe en ses longueurs d'onde individuelles. Le spectre de l'échantillon est focalisé par un système de lentilles est séparé en ses différents composants grâce à un diffracteur. Chaque longueur d'onde est analysée par un capteur qui lui est spécifique. L'amplification du signal se fait grâce à un photomultiplicateur. L'intensité de ce signal détermine l'abondance de l'élément correspondant dans l'échantillon.

Appareil et préparation analytique

Ces mesures sont faites en utilisant un spectromètre d'émission atomique à ionisation par plasma induit ICP-AES 70 type B commercialisé par Jobin-Yvon (Stanmore, Middlesex, Royaume-Uni).

L'échantillon est introduit dans l'appareil par un nébulisateur qui le réduit en un fin aérosol. Il subit ensuite la désolvatation, la dissociation et l'ionisation dans un plasma en argon.

La calibration de l'ICP-AES est externe. Elle se fait par une solution étalon à 10 ppm contenant les éléments Al, Si, Ca, Na, Mn, Mg, Ti, K et P.

Le sodium est mesuré par spectrométrie d'absorption atomique qui donne des résultats plus précis que l'ICP-AES dans les plus faibles gammes de concentrations. C'est une méthode de dosage d'éléments chimiques fondée sur l'absorption de radiations en phase vapeur. Au départ l'élément à doser (comme le sodium) est sous forme combinée et il faut le séparer pour obtenir un gaz d'atomes libres. Ceci est réalisé par la dissociation thermique effectuée dans un four ou dans une flamme. Un générateur de radiations émet les radiations de l'élément à doser puisqu'un atome ne peut absorber que les radiations qu'il peut émettre. On emploie donc une source fournissant le spectre d'émission du sodium pour doser le sodium. Le faisceau de radiations traverse le brûleur contenant l'élément à doser en phase vapeur. La radiation d'analyse aboutit enfin sur la surface photosensible du photomultiplicateur et le signal électrique issu de celui-ci est introduit dans un circuit à atténuation réglable, accordé en fréquence et en phase avec la modulation du faisceau de radiations émis par le générateur de radiations.

Analyse par spectroscopie Mössbauer en transmission

Les spectres Mössbauer ont été enregistrés en collaboration avec Monsieur Abdelmoula au Laboratoire de Chimie-Physique et Microbiologie de l'Environnement (Villers-lès-Nancy).

Principe

L'effet Mossbauer découvert par Rudolph Mössbauer en 1957 consiste en la mesure des informations nucléaires d'un atome d'un élément donné soumis au rayonnement gammas d'une source radioactive (Figure A(4)).

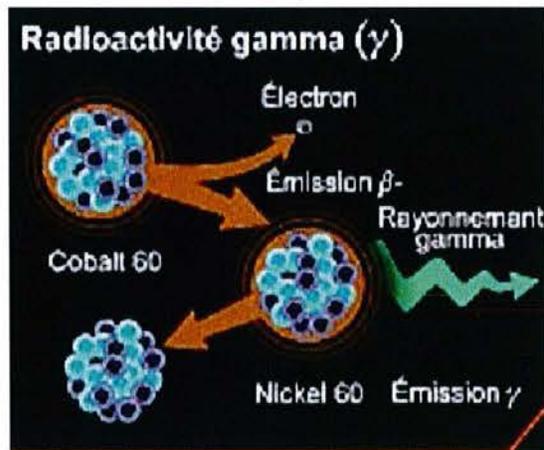


Figure A(4)

Source de rayonnement gamma par les noyaux radioactifs

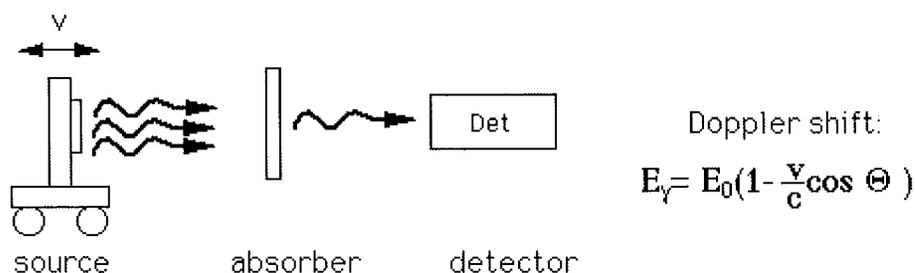
Le rayonnement gamma suit souvent une désintégration alpha ou bêta.

En effet, après émission de la particule alpha ou bêta, le noyau est encore excité car ses protons et ses neutrons n'ont pas encore trouvé leur équilibre.

Il se libère alors un trop-plein d'énergie dans le milieu : c'est le rayonnement gamma.

Les énergies des rayons gamma dépendent de la nature de l'élément chimique de la source radioactive. Pour nos mesures, nous avons travaillé avec le ^{57}Fe . L'énergie émise par ce noyau est de 14,4 keV. En réalité, à cause de phénomènes de réabsorption par les propres noyaux radioactifs de la source, l'énergie n'est pas linéaire en réponse, mais suit une loi de distribution. Un dispositif de mesure par effet Doppler permet de contrôler la vitesse des différences de réponse en énergie constituant cette distribution et de connaître précisément l'énergie des rayons gamma émis atteignant le détecteur.

Pour obtenir un spectre Mössbauer, on mesure donc pour chaque énergie (ou vitesse), le nombre de rayons gamma absorbés ou non par l'échantillon et détectés (Figure A(5)).



*Figure A(5)
Dispositif de mesure de l'effet Mössbauer.*

Le noyau ^{57}Fe , de spin $I=3/2$ dans son état fondamental, a un premier état excité de Spin $I=3/2$, situé à environ 14,4 keV. Les informations contenues dans un spectre Mössbauer sont liées aux modifications des énergies de ces niveaux nucléaires sous l'influence de champs électriques et/ou magnétiques.

Déplacement isomérique

Les fonctions d'ondes des orbitales s ayant une valeur non nulle au noyau, il en résulte un décalage des niveaux nucléaires donné par :

$$\delta = C[\psi_{ns}(o)_{ref} * \psi_{ns}(o) - \psi_{ns}(o)_{ech} * \psi_{ns}(o)_{ech}].\Delta R / R$$

Où $\psi_{ns}(o)$ représente la densité électronique au noyau des orbitales s de l'échantillon et d'une référence. $\Delta R / R$ est la différence de rayon normalisé du noyau dans l'état fondamental et excité ($\Delta R / R$ est < 0 pour ^{57}Fe). Le déplacement isomérique sera donc sensible à la valence de l'élément et à la nature des liaisons chimiques avec les ligands environnants.

Effet quadrupolaire électrique

Dans un environnement électronique de symétrie cubique, les niveaux fondamental et excité de ⁵⁷Fe sont dégénérés (2I+1) fois (Figure A(6)). Lorsque le gradient de champ électrique (GCE) existe, un lever de dégénérescence du niveau excité intervient. Deux transitions sont alors possibles et le spectre Mössbauer prend la forme d'un doublet. L'effet quadrupolaire est alors exprimé par :

$$\Delta E_Q = 1 / 2e * e.Q.V_{zz}(1 + \eta_{\epsilon/3})^{1/2}$$

Où Q est le moment quadrupolaire du noyau

V_{zz} est la composante principale du GCE

η est un terme décrivant l'asymétrie du GCE

Le GCE est la résultante de deux contributions : un terme de valence (q_{val}) qui rend compte de l'inégale occupation des orbitales 3d ; un terme de réseau (q_{lat}) dû à la répartition des charges autour de l'atome de fer, et quantitativement moins important. Pour Fe³⁺ (de structure 3d⁵), généralement de configuration haut spin, le terme (q_{val}) est, au moins en première approximation, égal à zéro. Pour Fe²⁺, les termes (q_{val}) et (q_{lat}) sont de signes opposés.

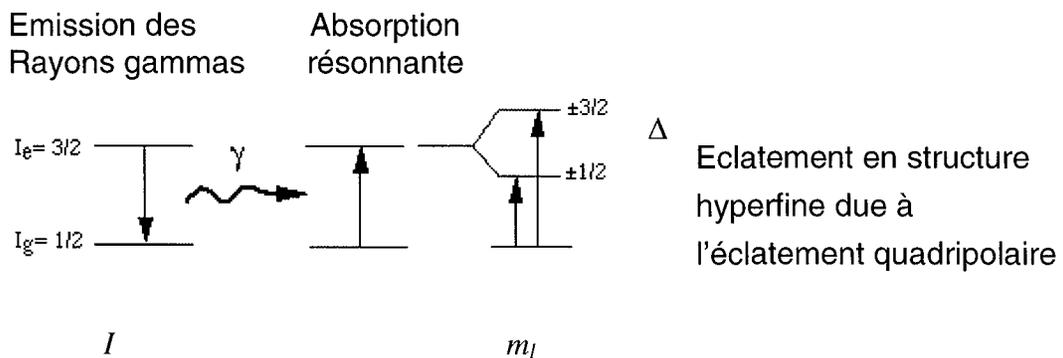


Figure A(6)
Eclatement des noyaux analysés en structure hyperfine.

Détermination de l'état d'oxydation du fer

L'origine des différences de valeurs des déplacements isomériques observées pour Fe^{3+} et Fe^{2+} vient de l'effet d'écran exercé par les couches 3d sur les orbitales 3s des atomes. Lorsqu'on passe de Fe^{3+} ($3d^5$) à Fe^{2+} ($3d^6$), cet effet d'écran augmente, ayant pour conséquence d'entraîner le déplacement isomérique. Les valeurs de Δ peuvent donc servir de guide dans la détermination de l'état d'oxydation, particulièrement quand les sites cristallographiques contenant les atomes de fer ne présentent pas de distorsion importante. Ainsi, en général, les valeurs mesurées de Δ pour le Fe^{3+} sont petites (souvent $< 1\text{mm/s}$), tandis que celles de Fe^{2+} sont grandes (2 à 3,5 mm/s) (Hawthorne, 1988).

Répartition entre sites tétraédriques et octaédriques

Les modèles de charge ponctuelle mettent clairement en évidence que les valeurs de (q_{val}) et Δ permettent de différencier les sites. Cependant, les valeurs dans l'absolu ne permettent pas de conclure sur l'environnement du fer. Elles ne doivent être interprétées qu'en prenant des références (standards de structure la plus proche des échantillons). Outre ce problème, le spectre Mössbauer ne présente souvent qu'un large doublet irrésolu ayant a priori les caractéristiques de Fe^{3+} octaédrique. Aussi, la valeur de l'écart quadrupolaire entre les doublets externes et internes est uniquement déduite d'une modélisation du spectre.

Appareillage et conditions expérimentales

Les spectres de nos échantillons ont été réalisés à 77 ou à 293 K. Le traitement des spectres est numérique. Une décomposition est réalisée en utilisant des bandes lorentziennes à positions, largeurs et intensités variables (Benali et al., 2001). Cet ajustement permet de quantifier la proportion de différents « types de fer » caractérisés par leur valence et leur environnement chimique. Il est possible de distinguer un Fe^{2+} d'un Fe^{3+} , du fer en position octaédrique ou en position tétraédrique, du fer présent dans une argile ou dans un oxyde.

Liste des Figures

- Figure I.1(1)*
Carte des sous-bassins de la Zone Atelier Moselle (ZAM) P.11
- Figure I.2(1)*
Apports de Carbone Organique (Veyssy, 1998). P.13
- Figure I.2(2)*
*Taille du carbone organique dissous (COD) et particulaire (COP)
dans les eaux naturelles (Thurman, 1985). P. 19*
- Figure I.2(3)*
*Distribution du carbone organique dissous dans une eau de rivière qui
contient 5 mg/L de COD (Sigg et al., 1992). P.21*
- Figure I.2(4)*
*Formation des substances humiques selon la théorie de la lignine
(Stevenson, 1994). P.24*
- Figure I.2(5)*
*Formation des substances humiques d'après la théorie des polyphénols
(Stevenson, 1994). P.25*
- Figure I.2(6)*
*Composés organiques pouvant servir de modèles par leurs propriétés
complexantes analogues pour les substances humiques (Sigg et al., 1992) P.29*
- Figure I.2(7)*
*Représentation schématique d'une micelle d'acide humique (Wershaw, 1986)
P.31*
- Figure I.2(8)*
*Représentation 2D d'un acide humique (Schulten et Schnitzer, 1993).
P.32*
- Figure I.2(9)*
*Modèle 3D de matière organique colloïdale dissoute de type acide humique
résultant d'une modélisation assistée par ordinateur
(Schulten et Gleixner, 1999). P. 33*
- Figure I.2(10)*
*Structure moléculaire d'un monomère d'acide humique avec sa variation de
conformation autour d'un centre chiral (Sein et al., 1999). P. 34*
- Figure I.3(1)*
*Distribution des polluants entre les compartiments
air, eau, colloïdal et sédimentaire (Hayes et al., 1989) P. 36*

- Figure I.3(2) *Evolution de la dégradation de la fluorescence d'une zone côtière soumise à une activité anthropique (Parlanti et al., 2000). P.44*
- Figure I.3(3) *Détermination de l'indice d'hydrophobie (Taylor et al., 1993). P.46*
- Figure I.3(4) *Détermination de l'indice d'humification HI pour un acide humique (Zolsnay et al., 1999). P.47*
- Figure I.3(5) *Evolution des intensités de fluorescence à l'excitation et à l'émission pour différentes valeurs en COD (Buffle et al., 1982).P. 50*
- Figure I.4(1) *Les étapes de la clarification des eaux de surface. P.60*
- Figure I.4(2) *Titration d'une solution 0,1 M Fe^{III} (Dousma et de Bruyn, 1976 ; Combes et al., 1989). P.62*
- Figure I.4(3) *Diagramme de spéciation de Fe^{III} en solution. P.64*
- Figure I.4(4) *Evolution des polymères de fer lors de l'hydrolyse de FeCl₃ (Rose, 1996). P.65*
- Figure I.4(5) *Diagramme de coagulation de Fe^{III} (Johnson et Amirtharajah, 1983). P.66*
- Figure I.4(6) *Courbes typiques d'élimination de la MON en fonction de la dose en coagulant. P. 68*
- Figure I.4(7) *Comparaison de l'élimination de différentes fractions de MON par adsorption sur des floes préformés d'hydroxydes d'aluminium et par jar-tests (Bose et Reckhow, 1998). P. 71*
- Figure I.4(8) *Isothermes de Freundlich pour l'adsorption de fractions de MON sur des floes préformés d'hydroxydes d'aluminium (Bose et Reckhow, 1998). P. 72*
- Figure I.4(9) *Différents modes d'interactions par échange de ligand entre les sites de MON et des oxyhydroxydes de fer (Gu et al., 1994) P.73*

- Figure I.4(10) *Représentation schématique de la dissolution des particules d'oxyhydroxydes par des ligands organiques (Stumm et O'Melia, 1968) P.75*
- Figure I.IV(11) *Modèle conceptuel de spéciation du fer en présence de substances fulviques (AF extrait de la rivière Suwanee) à 2 complexes A et B (Pullin et Cabaniss, 2003). P.77*
- Figure II.1(1) *Visualisation des phénomènes observés lors de l'enregistrement d'un spectre d'émission de fluorescence (excitation à 320 nm). P.84*
- Figure II.1(2) *Diagramme de Jablonski. P. 85*
- Figure II.1(3) *Dispositif de mesure de spectrofluorimétrie. P. 87*
- Figure II.1(4) *Les dispositifs de détection et d'analyse en fluorescence. P.87*
- Figure II.1(5) *Quenching de l'état excité. P.88*
- Figure II.1(6) *Principe de l'excitation- émission synchrone. P.92*
- Figure II.1(7) *Mécanismes des effets de filtre pour des mesures à 90° entre la lumière excitatrice incidente et le signal de fluorescence émis (Mc Donald et al., 1997). P.95*
- Figure II.1(8) *Coupe d'une cuve montrant les différents paramètres utilisés dans les formules de correction de Mc Donald et al., 1997 et de Fang et al., 1998. P.96*
- Figure II.1(9) *Influence de la correction de l'effet de filtre interne pour les solutions d'acide humique synthétique AHCG: intensité de fluorescence I_f à 377 nm, excitation 332 nm en fonction de la densité optique DO des solutions à 332 nm. P.98*

- Figure II.1(10)
 (1) Densité optique DO à 332 nm des solutions d'acide humique AHCG en fonction de la concentration.
 (2) Intensité de fluorescence I_f à 377 nm, excitation 332 nm pour les solutions d'acide humique AHCG en fonction de la concentration selon les différents auteurs de la littérature.
 P.99
- Figure II.1(11)
 Tensiomètre (Adamson, 1990) P.102
- Figure II.1(12)
 Comportement d'un liquide sur la paroi d'une plaque immergée verticalement.
 P.103
- Figure II.1(13)
 Comportement d'une goutte d'eau à la surface d'un solide.
 P.103
- Figure II.1(14)
 Visualisation du phénomène d'hystérèse pour une solution contenant des traces de tensio-actifs ou des impuretés. P.105
- Figure II.1(15)
 Détermination de la force au zéro d'immersion-cas d'une solution de type polyélectrolyte ou gel P.106
- Figure II.1(16)
 Protocole du jar-test. P.109
- Figure II.1(17)
 Schéma du réacteur de mélange(El Samrani, 2003). P.110
- Figure II.1(18)
 Les différentes interactions électrons-matière. P.112
- Figure II.1(19)
 Photo du Microscope Electronique à Transmission (Philips CM 20) et PEELS (Gatan). P.114
- Figure II.1(20)
 Représentation schématique du trajet des électrons en modes image et diffraction. P.116
- Figure II.1(21)
 Les différentes zones spectrales en perte d'énergie et place du seuil du fer.
 P.118
- Figure II.1(22)
 Pertes faibles dans le cas du graphite (Ghanbaja, 2003). P.119

- Figure II.1(23) *Spectre de pertes d'énergie au seuil du K du carbone pour le graphite et diagramme des orbitales moléculaires associé (Bozzolo, 1996 ; Ghanbaja, 2003). P.119*
- Figure II.1(24) *Spectres EELS dans le cas d'un système à plusieurs éléments et méthode d'analyse quantitative. P.121*
- Figure II.2(1) *Carte des différentes zones occupationnelles du bassin de la Moselle en amont de la prise d'eau de Richardménil. P.126*
- Figure II.2(2) *Carte de la Réserve de Richardménil et localisation du site des points de prélèvement d'eau et de MES. P.129*
- Figure II.2(3) *Débits instantanés (DIREN, Lorraine) pour 2003 ; placement temporel des 2 prélèvements de MES. P.133*
- Figure II.2(4) *Coupe de la séparatrice permettant le recueil de MES. P.134*
- Figure II.2(5) *Choix de la nature de la membrane filtrante des échantillons d'eau. P.136*
- Figure II.2(6) *Effets de l'extraction des acides humiques naturels des 2 prélèvements (17-18/07/03 et 22-23/07/03) sur le statut de la matière organique des MES. P.138*
- Figure II.2(7) *Le pyrène, représentant des HAP pour notre étude. P.180*
- Figure II.2(8) *Les différentes classes de molécules tensioactives de l'étude. P.182*
- Figure II.2(9) *Structure chimique des 2 molécules d'herbicides de notre étude. P.188*
- Figure III.1(1) *Spectre d'absorption et d'émission de fluorescence du pyrène (10^{-6} M dans l'eau, excitation à 332 nm). P.197*
- Figure III.1(2) *Schématisation de la torsion d'un rotor moléculaire dans l'espace. P.198*
- Figure III.1(3) *Formules chimiques des sondes de fluorescence utilisées. P.199*

Figure III.1(4)

*Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence
en solution aqueuse de la sonde rotor2-CN
(densité optique et intensité de fluorescence normalisées, excitation 480 nm).
P.200*

Figure III.1(5)

*Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence
en solution aqueuse de la sonde rotor2-CN
(densité optique et intensité de fluorescence normalisées, excitation 525 nm).
P.201*

Figure III.1(6)

*(1) Influence du pH sur le spectre d'absorption de la sonde D 7760 ($10^{-5}M$)
(2) Influence du pH sur le spectre d'émission de fluorescence de la sonde D 7760
($10^{-5}M$, $\lambda_{ex} = 320$ ou 380 nm suivant le maximum correspondant au pH de mesure).
P.203*

Figure III.1(7)

*Influence de la polarité du milieu sur l'absorption (1)
et l'émission de fluorescence (2) de la sonde D7760 ($10^{-5}M$)
dans des mélanges eau/dioxane.
P.204*

Figure III.1(8)

*Influence de la polarité du solvant sur
l'émission de fluorescence de la sonde D 7760. P.205*

Figure III.1(9)

*Spectres d'absorption et de fluorescence
(densité optique et intensité de fluorescence normalisées, excitation 465nm)
de la sonde coumarine CouC12 dans l'eau. P. 209*

Figure III.1(10)

*Influence de la polarité du solvant sur la longueur
d'onde maximale d'émission de fluorescence
de la sonde rotor coumarine CouC12. P.209*

Figure III.1(11)

*Représentation schématique de la fixation de la sonde coumarine
rotor CouC12 sur l'acide humique. P.210*

Figure IV.1(1)

*Exemple d'absence d'inhibition de fluorescence du signal de la MO
(excitation 350 nm) lors d'ajouts dosés en pyrène (10^{-10} (1) à 10^{-6} M(4))
Les spectres de fluorescence présentés dans le zoom sont spécifiques
à la MO. P.239*

Figure IV.1(2)

*Exemple du suivi UV-Visible des ajouts dosés en pyrène
dans les solutions de MO (10^{-10} M (1) à 10^{-6} M (4)). P.240*

Figure IV.2(1)

*Spectres d'absorption UV-Visible de l'atrazine(1)
et de la sulcotrione (2)
(à 10 µg/L dans l'eau UP. Parcours optique de 1 cm).
P.241*

Figure IV.2(2)

*Résultats des ajouts dosés en atrazine et sulcotrione
dans les solutions de MO (exemple de l'AHN1). P.242*

Figure IV.2(3)

*Résultats obtenus en spectrofluorimétrie pour des ajouts dosés
d'atrazine et de sulcotrione dans les solutions de MO
(exemple pour le fluorophore α de AHN1). P.243*

Figure IV.3(1)

*Spectre d'absorption UV-Visible du NPE ($10^{-3}M$ dans l'eau UP).
P.244*

Figure IV.3(2)

Matrice d'excitation/émission du NPE. P.244

Figure IV.3(3)

*Résultats obtenus en absorption UV-Visible
pour les ajouts dosés en NPE (de 10^{-3} à 1,5 CMC)
dans les solutions de MO ($CMC_{NPE} = 6,3 \cdot 10^{-5}M$). P.245*

Figure IV.3(4)

*Résultats des ajouts dosés en NPE (de 10^{-3} à 1,5 CMC)
Sur le signal de fluorescence de la MO. P.246*

Figure IV.3(5)

*Mesures de tension de surface des solutions de MO
en présence de NPE. P.247*

Figure IV.4(1)

*Spectre d'absorption UV-Visible
du SDS ($1,2 \cdot 10^{-2}M$) dans l'eau. P.248*

Figure IV.4(2)

*Interaction UV-Visible entre le SDS et la MO
(AHN1, AHN2, ER1, ER2). P.249*

Figure IV.4(3)

*Variations des densités optiques des 3 chromophores
A (270-290 nm), B (330-350 nm) et C (400 nm)
pour les solutions de MO (AHN1 et ER1) en présence de SDS. P.250*

- Figure IV.4(4)
*Inhibition de fluorescence (fluorophore δ et α')
des solutions de MO (AHN1, AHN2, ER1, ER2)
en présence de SDS. P.251*
- Figure IV.4(5)
*Inhibition de fluorescence (fluorophore α)
des solutions de MO (AHN1, AHN2, ER1, ER2)
en présence de SDS. P.252*
- Figure IV.4(6)
*Analyse de Stern-Volmer
pour les solutions de MO (AHN1 et ER1) en présence de SDS.
P.253*
- Figure IV.4(7)
*Matrices EEM (Excitation-Emission) de ER1 en présence de SDS.
P.254*
- Figure IV.4(8)
*Rendements quantiques de fluorescence
pour les fluorophores α et δ
des solutions de MO (AHN1 et ER1) en présence de SDS.
P.255*
- Figure IV.4(9)
*Evolution de la conductivité des solutions de MO contenant le SDS.
P.256*
- Figure IV.4(10)
*Mesures des tensions de surface pour les ajouts dosés de SDS
dans les solutions de MO. P.258*
- Figure IV.4(11)
*Représentation de l'interaction entre le SDS et la MO
à l'interface air/solution. P.259*
- Figure IV.5(1)
Spectre UV-Visible du CTAB. P.261
- Figure IV.5(2)
Absorption UV-Visible entre les solutions de MO et le CTAB. P.262
- Figure IV.5(3)
*Variations des densités optiques pour les 3 chromophores
A (270-290 nm), B (330-350 nm) et C (400 nm)
des solutions de MO en présence de CTAB. P.263*

- Figure IV.5(4)
*Inhibition de fluorescence (fluorophores δ et α')
des solutions de MO en présence de CTAB. P.265*
- Figure IV.5(5)
*Inhibition de fluorescence (fluorophore α)
des solutions de MO en présence de CTAB. P.266*
- Figure IV.5(6)
*Matrices EEM (Excitation-Emission) de AHCT2 en présence de CTAB.
P.267*
- Figure IV.5(7)
*Matrices EEM (Excitation-Emission) de ER1 en présence de CTAB.
P.268*
- Figure IV.5(8)
*Analyses de Stern-Volmer pour les solutions de MO en présence de CTAB.
P.269*
- Figure IV.5(9)
*Evolution des rendements quantiques des fluorophores α , α' et δ
des solutions de MO en présence de CTAB. P.272*
- Figure IV.5(10)
*Evolution de la conductivité des solutions de MO avec le CTAB.
P. 273*
- Figure IV.5(11)
*Evolution de la turbidité des solutions de MO lors des ajouts de CTAB.
P.274*
- Figure IV.5(12)
*Mesures de la variation de pH pour les ajouts dosés de CTAB
dans les solutions de matière organique.
P.275*
- Figure IV.5(13)
*Tensions de surfaces pour les ajouts dosés de CTAB
dans les solutions de matière organique.
P.276*
- Figure IV.6(1)
*Représentation schématique des équilibres pouvant s'établir
en solution aqueuse entre les groupements
carboxyliques et phénoliques des AH et le CTAB. P.283*
- Figure V.3(1)
*Courbes de calibration des intensités I_1 et I_3 du pyrène
en solution aqueuse en fonction de sa concentration.
P.347*

- Figure V.3(2) *Evolution du rapport I_1/I_3 en fonction de la concentration en pyrène en solution aqueuse.* P.349
- Figure V.3(3) *Jar-tests et résultats de l'élimination du pyrène pour AHCG .* P.350
- Figure V.3(4) *Résultats du jar-test de l'acide humique synthétique AHCT2.* P.353
- Figure V.3(5) *Résultats du jar-tests AHCT 1.* P.355
- Figure V.3(6) *Résultats des jar-tests de AHN1.* P.356
- Figure V.3(7) *Résultats du jar-test de AHN2.* P.358
- Figure V.3(8) *Jar-tests de l'Eau brute 1.* P.359
- Figure V.3(9) *Résultats des jar-tests de l'Eau brute 2.* P.361
- Figure V.3(10) *Evolution du complexe MON-pyrène lors de l'ajout de coagulant.* P.367

Annexe 4

- Figure A(1) *Principe de traitement des données de titrage potentiométrique* P.379
- Figure A(2) *Distribution d'affinité de protons lors du dosage potentiométrique.* P.379
- Figure A(3) *Chromatographie de partage en C_{18} sur silice greffée.* P.381
- Figure A(4) *Source de rayonnement gamma par les noyaux radioactifs.* P.387
- Figure A(5) *Dispositif de mesure de l'effet Mössbauer.* P.388
- Figure A(6) *Eclatement des noyaux analysés en structure hyperfine* P.389
- Figure A(7) *Profil de mobilité de particules soumises à un champ électrique dans la mesure du potentiel zéta.* P.391

Liste des Tableaux

- Tableau I.2(1)
Différents apports de populations en kg / hab / an (Leroy, 1994). P.17
- Tableau I.2(2)
Produits de dégradation de la biomasse (Sigg et al., 1992). P.22
- Tableau I.2(3)
Classes principales de composés et de biomacromolécules trouvés dans les substances humiques (Saiz-Jimenez, 1996). P.27
- Tableau I.2(4)
*Propriétés des substances humiques
(International Humic Substance Society)
(Murphy et al., 1990). P.30*
- Tableau I.3(1)
Résumé des problèmes inhérents à la présence de matière organique dans l'eau (Malleval, 1993). P.36
- Tableau I.3(2)
Récapitulatif des études concernant les interactions MO-polluants du compartiment sédimentaire. P.39
- Tableau I.3(3)
Récapitulatif des études concernant les interactions MO- polluants du compartiment dissous. P.40
- Tableau I.3(4)
Récapitulatif des principaux domaine de fluorescence de la MO suivant les différentes attributions données par les auteurs selon son origine. P.44
- Tableau I.3(5)
Identification de composés de référence (Buffle et al., 1982). P.51
- Tableau I.4(1)
Les différents grandes catégories de mécanisme d'élimination de la MON. P.67
- Tableau I.4(2)
Modèle conceptuel de la coagulation de la MON proposé par Randtke, 1993. P.78
- Tableau II.2(1)
Données de terrain des deux campagnes d'extractions d'acide humique naturel (respectivement AHN1 et AHN2 pour les prélèvements 1 et 2) et les mesures de spectrofluorimétrie et tensions de surface. P.132
- Tableau II.2(2)
Récapitulatif quantitatif des extractions d'acides humiques naturels à partir des MES. P.137

- Tableau II.2(3)*
Attribution des bandes principales d'élongation et de déformation IR des MES.
P.139
- Tableau II.2(4)*
Principales constantes physico-chimiques des 3 classes
de tensio-actifs considérées. P.183
- Tableau III.1(1)*
Principales propriétés des sondes de fluorescence utilisées. P.200
- Tableau IV.6(1)*
Constantes de Stern-Volmer et Concentrations Optimales de Complexation
(COCx) relatives aux fractions d'acide humique avec le CTAB.
P.286
- Tableau V.3(1)*
Caractéristiques des eaux prélevées qui sont utilisées pour
la préparation de solutions artificiellement polluées au pyrène.
P.346
- Tableau V.3(2)*
Etude comparative des propriétés des différentes fractions
d'acides humiques lors de la coagulation par le nitrate ferrique.
P. 363

Références bibliographiques

Les références bibliographiques des quatre articles préliminaires de ce manuscrit figurent en fin des chapitres correspondants à ces articles.

Ces références ne sont pas rappelées dans la liste ci-dessous.

A

Adamson A.W. (1990) The physico-chemistry of Interfaces, 5th Ed. Wileys and Son, 698 p.

Adibnejad M. (1996) Rotors Moléculaires Fluorescents. Synthèse- Etude Photophysique- Applications. Thèse INPL 280 p.

Aguer J.-P. (1995) Caractérisation des espèces réactives mises en jeu dans les transformations photo-induites par les acides humiques. Comparaison entre les acides humiques naturels et synthétiques. Thèse de l'Université Blaise Pascal. Ecole Doctorale des Sciences Fondamentales d'Aubières 150 p.

Ahmad S.R., Reynolds D.M. (1999) Monitoring of water quality using fluorescence technique : prospect of on-line process control. *Water Research*, 33, 2069-2074.

Ahel M., McEvoy J., Giger W. (1993) Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms. *Environ. Pollut.*, 79, 243-248.

Ahn C. C., Krivanele O.L. with contribution by Burgner R. P., Disko M. M. and Swann P. R. (1990) A reference guide of electron energy loss spectra covering all stable element, Gatan 196 p.

Ameil M.-H. (2000) Expolymères de boues activées. Séparation par chromatographie d'exclusion par taille. Analyse par microspectrométrie infra-rouge. DEA Génie des Procédés ENSIC 48 p.

Andreux F. (1978) Etude des étapes initiales de la stabilisation physico-chimique et biologique d'acides humiques modèles. Thèse Université de Nancy I 174 p.

Anthony O., Zana R. (1994) Fluorescence Investigation of the Binding of Pyrene to Hydrophobic Microdomains in Aqueous Solutions of Polysoaps. *Macromolecules*, 27, 3885-3891.

Arrouays D., Vion I. , Kicin J.-L. (1995) Spatial analysis and modeling of topsoil carbon storage in temperate forest humic loamy soils of France. *Soil Sc.*, 159, 191-198.

Atik S. S., Nam M., Singer L.A. (1979) Transient studies on intramicellar excimer formation. A useful probe to the host micelle. *Chem. Phys. Lett.*, 67, 75-83.

Auger R.L., Jacobson A.M., Domach M.M. (1995) Aqueous Phase Fluorescence Quenching Technique for Measuring Naphtalene Partition Coefficients in Nonionic Surfactant Micelles. *Environ. Sci. Technol.*, 29, 1273-1278.

B

Bachoc A., Chebbo G., Mouchel J.M. (1993) La pollution des rejets pluviaux urbains : son importance, ses caractéristiques, quelques éléments sur ses origines et son interprétation dans "Rejets urbains par temps de pluie : pollution et nuisances". Presse de l'École Nationale des Ponts et Chaussées, 9-23.

Baker A. (2002) Fluorescence Excitation-Emission Matrix Characterization of River Waters impacted by a Tissue Mill Effluent. *Environmental Science and Technology*, 36, 1377-1382.

Bardot F., Faure P., Montarges-Pelletier E., Bersillon J.-L. (2001) Rapport bibliographique pour la Zone Atelier Moselle 55 p.

Bayard R., Barna L., Mahjoub B., Gourdon R. (2000) Influence of the presence of PAHs and Coal tar on naphthalene sorption in soils. *Journal of contaminant Hydrology*, 46, 61-80.

Belin C., Quelec C., Lamotte M., Ewald M., Simon P. (1993) Characterization by fluorescence of the dissolved organic matter in natural water. Application to fractions obtained by tangential ultrafiltration and XAD resin isolation. *Environmental Technology*, 14, 1131-1144.

Benali O, Abdelmoula M, Refait P, Génin J.M. (2001) Effect of orthophosphate on the oxidation products of Fe(II)-Fe(III) hydroxycarbonate: the transformation of green rust to ferrihydrite. *Geochim Cosmochim Acta*, 65, 1715-1726.

Berger P., Laane R.W.P.M., Ilahude A.G., Ewald M., Courtot P. (1984) Comparative study of dissolved fluorescent matter in four West European Estuaries. *Oceanology Acta*, 7, 309-314.

Bersillon J.L. (1983) The mechanism of organic removal during coagulation . PhD Mc Master University, 188 p.

Berthelin J. (1995) Effect of microorganismes on mobility of heavy metals in soils in Environmental impact of soil component interaction. Huang P.M., Berthelin J., Bollag J.-M., Mc Gill W.B., Page A.L., Lewis Ed. Vol II, 3-17.

Bertin G. (1989) L'immobilisation de l'atrazine par la matière organique des sols. Une approche modélisée en conditions naturelles au laboratoire. Thèse INPL 103 p.

Bertin G., Schiavon M., Portal J.M., Andreux F. (1991) in Diversity of Environmental Biogeochemistry, Developments in Geochemistry. Berthelin J. Ed., Elsevier Pub., 6, 105-110.

Bose P., Reckhow D.A. (1998) Adsorption of natural organic matter on preformed aluminium hydroxide flocs. *Journal of Environmental Engineering*, 803-811.

Bottero J.-Y., Bersillon J.-L. (1989) in Aquatic humic substances. Am. Chem. Soc. Pub., Suffet and Maccarty Eds.

Bottero J.-Y., Tchoubar D., Arnaud M., Quienne P. (1991) Partial hydrolysis of ferric nitrate salt. Structural investigation by Dynamic Light Scattering and Small angle X-Ray scattering, *Langmuir*, 7, 1365-1369.

Bottero J.Y., Khatib K., Thomas F., Jucker K., Bersillon J.L., Mallevalle J. (1994a) Adsorption of atrazine onto zeolites and organoclays, in the presence of background organics. *Wat. Res.*, 28, 483-490.

Bottero J.-Y., Manceau A., Villiéras F., Tchoubar D. (1994b) Structure and mechanisms of formation of FeOOH(Cl) polymers, *Langmuir*, 10, 316-319.

Bourdon S., Laggoun-Défarce F., Disnar J.-R., Maman O., Guillet B., Derenne S., Largeau C. (2000) Organic matter sources and early diagenetic degradation in a tropical peaty marsh (Tritsivakely, Madagascar). Implications for environmental reconstruction during the sub-Atlantic. *Organic Geochemistry*, 31, 421-438.

Bozzolo N. (1996) Contribution de la microscopie électronique en transmission analytique à la caractérisation du diamant CVD, Thèse INPL 196 p.

Bragg W.L., Williams E.G. (1934) The effect of thermal agitation on atomic arrangement in alloys (I). *Proc. Roy. Soc.*, 145, 699.

Bragg W.L., Williams E.G. (1935) The effect of thermal agitation on atomic arrangement in alloys (II) *Proc. Roy. Soc.*, 151, 699.

Brown D.S., Flagg E.W. (1981) Empirical Prediction of Organic Pollutant Sorption in Natural Sediments. *Journal of environmental quality*, 10, 382-386.

Bruchet A. (1985) Applications de la technique de pyrolyse-GC-SM à l'étude des matières organiques non volatiles des eaux naturelles ou en cours de traitement. Thèse Université de Poitiers 200 p.

Bruchet A., Rousseau C., Mallevalle J. (1990) Pyrolysis-GC-MS for Investigating High-Molecular-Weight THM Precursors and Other Refractory Organics. *Journal AWWA*, 66-74.

Buciova L., Hrdlovic P., Chmela S. (2001) Spectral characteristics of fluorescence probes based on pyrene in solution and in polymer matrix. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, 143, 59-68.

Buffle J., Deladoey P., Zumstein J., Haerdi W. (1982) Analysis and characterization of natural organic matters in freshwaters I. Study of analytical techniques. *Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie*, 44, 325-362.

Buffle J., DeVitre R.R., Perret D. (1988) Combining field measurements for speciation in non perturbable water samples in Metal speciation : theory analysis, applications. Kramer J.R., Allen H.E. Eds, Lewis Pub., 99-122.

C

Cabaniss S.E., Schuman M.S. (1987) Synchronous Fluorescence Spectra of Natural Waters : Tracing Sources of Dissolved Organic Matter. *Marine Chemistry*, 21, 37-50.

Caruso F., Donath E., Möhwald H., Georgieva R. (1998) Fluorescence Studies of the Binding of Anionic Derivatives of Pyrene and Fluorescein to Cationic Polyelectrolytes in Aqueous Solution. *Macromolecules*, 31, 7365-7377.

Cases J.M., Villieras F., Michot L.J, Bersillon J.-L. (2002) Long chain ionic surfactants : the understanding of adsorption mechanisms from the resolution of adsorption mechanisms from the resolution of adsorption isotherms. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 205, 85-99.

Cauwet G., Mac Kenzie F.T.(1993) Carbon inputs and distribution in estuaries of turbid rivers - the Yangtze and Yellow rivers (China). *Mar. Chem.*, 43, 235-246.

Celis R., Cornejo J., Hermosin M.C., Koskinen W.C. (1998) Sorption of Atrazine and Simazine by Model Associations of Soil Colloids. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 62, 165-171.

Challinor, J.M. (2001) Review : the development and applications of thermally assisted hydrolysis and methylation reactions. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 61, 3-34.

Chen R.F., Bada J.L. (1992) The fluorescence of dissolved organic matter in the seawater. *Marine Chemistry*, 37, 191-221.

Chen J., Gu B., Leboeuf E.J., Pan H., Dai S. (2002) Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere*, 48, 59-68.

Cherrier R., Perrin-Ganier C., Schiavon M. (2004) Degradation of sulcotrione in a brown soil amended with various organic matters. *Agronomie*, 24, 29-33.

Cherrier R. (2003) Impact sur l'environnement de deux herbicides du maïs : la sulcotrione et l'atrazine. Thèse INPL 174 p.

Chin Y.-P., Buterbaugh J.M., Gustafson T.J., Traina S.J., Danielsen K.M. (1996) Response to Comment on « Solubility Enhancement and Fluorescence Quenching of Pyrene by Humic Substances : The Effect of Dissolved Oxygen on Quenching Processes ». *Environ. Sci. Technol.*, 30, 1409-1410.

Choudry C.G. (1984) Humic Substances Structural Aspects, and Photophysical, Photochemical and Free Radical Characteristics. In *The Handbook of Environmental Chemistry*, Springer-Verlag Ed. 1-24.

Christman R. F., Ghassemi M. (1966) Chemical nature of organic color in water. *J. Amer. Water Works Assoc.*, 58, 723-726.

Coble P.G. (1996) Characterization of marine and terrestrial DMO in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry*, 51, 325-346.

Coly A., Aaron J.-J. (1999a) Photochemically-induced fluorescence determination of sulfonylurea herbicides using micellar media. *Talanta*, 49, 107-117.

Coly A., Aaron J.-J. (1999b) Sensitive and rapid flow injection analysis of sulfonylurea herbicides in water with micellar-enhanced photochemically induced fluorescence detection. *Analytical Chimica Acta*, 392, 255-264.

Combes J.M., Manseau A., Calas G., Bottero J.-Y. (1989) Formation of ferric oxides from aqueous solutions : a polyhedral approach by X-Ray absorption spectroscopy. I. Hydrolysis and formation of ferric gels. *Geochem. Cosmochim. Acta*, 53, 583-594.

Conte P., Piccolo A. (1999) Conformational arrangement of dissolved humic substances. Influence of solution composition on association of humic molecules. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 1682-1690.

Cox L., Celis R., Hermosin M.C., Cornejo J., Zsolnay A., Zeller K. (2000) Effect of Organic Amendments on Herbicide Sorption as Revealed to the Nature of the Dissolved Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.*, 34, 4600-4605.

Croué J.P., Martin B., Simon P., Legube B. (1993) Les matières hydrophobes et hydrophiles dans les eaux de retenue : extraction, caractérisation et quantification. *Water Supply*, 11, 51-62.

D

Datta D., Majee B., Ghosh A.K. (1971) Spectrophotometric investigations on the solvolysis of triphenyltin oxinate in methanol. *Journal of Organometallic Chemistry*, 30, 43-51.

Danielsen K.M., Chin Y.-P. (1995) Solubility Enhancement and Fluorescence Quenching of Pyrene by Humic Substances : the effect of dissolved oxygen on quenching processes. *Environ. Sci. Technol.*, 29, 2162-2165.

Davis J.A. (1982) Adsorption of Natural Dissolved Organic Matter at the Oxide/Water Interface. *Geochem. Cosmochim. Acta*, 46, 2381-2393.

Degens E.T. (1982) Riverine carbon. An overview in Transport of carbon and minerals in major world rivers. Part 1, Mitt. Geol. Paleont. Inst. Univ. Hamburg. SCOPE/UNEP sonderband, 1-12.

Delon J.F., Yvon J., Berthelin J., Belgi G. Marchand F., Landais P., Elie M., Faure P., Krup M., Langlois P. (1996) Etude du statut des polluants minéraux et organiques dans les sédiments et les suspensions de trois rivières lorraines. Rapport final pour l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse

Descy J.P., Gosselain V. (1994) Development and ecological importance of phytoplankton in a large lowland river (river Meuse, Belgium). *Hydrobiol.*, 289, 139-155.

De Souza-Sierra M.M., Donard F.X., Lamotte M. (1997) Spectral identification and behavior of dissolved organic fluorescent material during estuarine mixing processes. *Marine Chemistry*, 58, 51-58.

De Souza-Sierra M.M., Giovanela M., Soriano-Sierra J. (2000) Fluorescence properties of well-characterized sediment estuarine humic compounds and surrounding pore waters. *Environmental Technology*, 21, 979-988.

Dessery S., Dulac C., Laurenceau J.M., Meybeck M. (1984) Evolution du carbone organique "algal" et "détritique" dans trois rivières du bassin parisien. *Arch. Hydrobiol.*, 100, 235-260.

Del Rio J.C., Mc Kinney D.E., Knicker H., Nanny M.A., Minard R.D. (1998) Structural characterization of bio- and geo-macromolecules by offline thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxyde. *Journal of Chromatography A*, 823, 433-438.

Dixon W., Smyth G.K., Chiswell B. (1999) Optimized selection of river sampling sites. *Wat.Res.*, 33, 971-978.

Donard O.F.X., Lamotte M., Belin C., Ewald M. (1989) High-sensitivity fluorescence spectroscopy of Mediterranean waters using a conventional or pulsed laser excitation source. *Marine Chemistry*, 27, 117-136.

Dong D., Winnik M.A. (1982) The *Py* scale of solvent polarities. Solvent effects on the vibronic fine structure of pyrene fluorescence and empirical correlations with the E_T and Y values. *Photochemistry and Photobiology*, 35, 17-21.

Dousma J., De Bruyn P.L. (1976) Hydrolysis-Precipitation studies of Iron solutions, I. Model for hydrolysis and precipitation from Fe^{III} Nitrate solutions. *J. of Coll. and Interf. Sci.*, 56, 527-539.

Duchaufour P. (1994) Pédologie-sol, végétation, environnement. Masson 2^{ème} Ed. 285 p.

E

Edeline F. (2001) Le pouvoir autoépurateur des rivières. Tec et Doc Ed. 230 p.

Edzwald J.L. (1993) Coagulation in Drinking water treatment: particles, organics and coagulants. *Water Science and Technology*, 27, 21-35.

Egerton R.F., 1986, Electron Energy Loss Spectroscopy in the electron microscope, Plenum Press 200p.

El Samrani A. (2003) Dépollution des eaux pluviales : spéciation des éléments traces et optimisation du traitement de coagulation- flocculation. Thèse INPL 270 p.

El Samrani A., Lartiges B.L., Montargès-Pelletier E., Kazpard V., Barrès O., Ghanbaja J. (2004a) Clarification of municipal sewage with ferric chloride: the nature of coagulant species. *Wat. Res.*, 38, 756-768.

El Samrani A., Lartiges B.L., Ghanbaja J., Yvon J., Kohler A. (2004b) Trace element carriers in combined sewer during dry and wet weather : an electron microscopy investigation. *Wat. Res.*, 38, 2063-2076.

Engebretson R.R., von Wandruska R. (1994) Microorganization in dissolved humic acids. *Environ. Sci. Technol.*, 28, 1934-1941.

Engebretson R.R., von Wandruska R. (1997) The effect of molecular size on humic associations. *Org. Geochem.*, 26, 759-767.

Engebretson R.R., von Wandruska R. (1999) Effects of humic acid purification on interactions with hydrophobic organic matter : Evidence from fluorescence behavior. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 4299-4303.

Entreprises pour l'environnement, Nanterre (1996) Problèmes d'Environnement : dires d'experts", Entreprises pour l'environnement Lavoisier Ed. 288 p.

Esser G., Köhlmayer G.H. (1991) Modelling terrestrial sources of nitrogen, phosphorous, sulphur and organic carbon to rivers in Biogeochemistry of major world rivers, SCOPE/UNEP Sonderbad Eds. 297-322.

F

Fang F. (1997) Masters of Science Thesis in Ecology and Environmental Science. Maine University, 190 p.

Fang F., Kanan S., Patterson H.H., Cronan C.S. (1998) A spectrofluorimetric study of the binding of carbofuran, carbaryl and aldicarb with dissolved organic matter. *Analytica Chimica Acta*, 373, 139-151.

Farmer V.C. (1974) The Infrared spectra of minerals. Farmer V.C. Ed. 539 p.

Fiebig D.M., Lock M.A. (1991) Immobilization of dissolved organic matter from groundwater discharging through the stream bed. *Freshwater Biology*, 26, 45-55.

Fiessinger F., Bersillon J.L. (1977) Prépolymérisation de l'Hydroxyde d'Aluminium pour la Coagulation des Eaux. *Tribune de Cebeneau*, 399, 52 p.

Fox K.K., Chapman L., Solbe J., Brenhand V. (1997) Effect of environmentally relevant concentrations of surfactants on the desorption or biodegradation of model contaminants in soil. *Tenside Surfactants Detergents*, 34, 436-441.

Frimmel F.H. (1998) Characterization of natural organic matter as major constituents in aquatic systems. *Journal of Contaminant Hydrology*, 35, 201-216.

G

Galapate R.P., Baes A.U., Ito K., Mukai T., Shoto E., Okada M. (1998) Detection of Domestic Wastes in Kurose River using synchronous fluorescence spectroscopy. *Water Research*, 32, 2232-2239.

Ganaye V.A., Keiding K., Vogel T.M., Viriot M.-L., Block J.-C. (1997) Evaluation of Soil Organic Matter Polarity by Pyrene Fluorescence Spectrum Variations. *Environmental Science and Technology*, 31, 2701-2705.

Gauthier T.D., Shane E.C. Guerin W.F., Seitz W.F., Grant C.L. (1986) Fluorescence quenching method for determining equilibrium constants for polycyclic aromatic hydrocarbons binding to dissolved humic materials. *Environ. Sci. Technol.*, 20, 1162-1166.

Ghanbaja J. (2003) Cours Microscopie électronique à transmission et ses techniques d'analyses (EDXS et EELS). Service Commun de Microscopie Electronique à Transmission, Faculté des sciences – UHP Nancy I 60 p.

Ghosh U., Gillette J.S., Richard G.L., Zare R.N. (2000) Microscale Location Characterization, and Association of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on harbor Sediment Particles. *Environmental Science and Technology*, 34, 1729-1736.

Giannissis D. (1987) Etude des interactions des substances humiques avec les cations de métaux lourds. Thèse de 3^{ème} cycle Etat Univ.Rennes 152 p.

Görner T. (2003) Cours de Chimie Analytique. Méthodes chromatographiques ENSIC 78 p.

Grasset L., Amblès A. (1998a) Aliphatic lipids released from a soil humin after enzymatic degradation of cellulose. *Organic Geochemistry*, 29, 4, 881-891.

Grasset L., Amblès A. (1998b) Structural study of soil humic acids and humin using a new preparative thermochemolysis technique. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 47, 1-12.

Grätzel M., Thomas J.K. (1973) On the Dynamics of Pyrene Fluorescence Quenching in Aqueous Ionic Micellar Systems. Factors Affecting the Permeability of Micelles. *Journal of the American Chemical Society*, 95, 6885-6889.

Gray K.A., Simpson A.H.(1996) Use of Pyrolysis-GC-MS to study the nature and behavior of natural organic matter in water treatment. Water Disinfection and natural organic matter Characterization and control. R.A. Minear and G.L. Amy, ACS Symposium Series 649, 159-181.

Green S.A., Blough N. V. (1994) Optical absorption and fluorescence properties of chromophoric dissolved organic matter in natural waters. *Limnol. Oceanogr.*, 39, 1903-1916

Green S., Blough N.V. (1996) Comment on « Solubility Enhancement and Fluorescence Quenching of Pyrene by Humic Substances : The Effect of Dissolved Oxygen on Quenching Processes ». *Environ. Sci. Technol.*, 30, 1407-1408.

Gu B., Schmitt J., Chen Z., Liang L., Mc Carthy F. (1994) Adsorption and Desorption of Natural Organic Matter on Iron oxide : mechanisms and models. *Environ. Sci. Technol.*, 28, 38-46.

Gunning P.A., Mackie A.R., Gunning A.P., Wilde P.J., Woodward N.C., Morris V.J. (2004) The effect of surfactant type on protein displacement from the air-water interface. *Food hydrocolloids*, 18, 509-515.

Guo L., Bicki T.J., Felsot A.S., Hinesly T.D. (1993) Sorption and Movement of Alachlor in Soil Modified by Carbon-Rich Wastes. *J. Environ. Qual.*, 22, 18-194.

H

Haigh S.D. (1996) A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. *The Science of the Total environment*, 185, 161-170.

Hallouis M. (1989) Etude analytique des phase tribochimiques avec des additifs colloïdaux. Apport de la microscopie filtrée en énergie. Thèse de L'Ecole Centrale de Lyon 230 p.

Harrington G.W., Bruchet A. (1996) Characterization of Natural Organic Matter and its Reactivity with Chlorin. Water Dinsinfection and natural organic matter characterization and control. Minear R.A. and Amy G.L. Washington DC, American Chemical Society, 1, 139-158.

Hatcher P.G., Clifford D.J. (1994) Flash Pyrolysis and in situ methylation of humic acids from soil. *Org.Geochem.*, 21, 10-11, 1081-1092.

Hauser M., Klein U. (1973) Fluorescence and Excimer Kinetics in Micellar Detergent Solutions. *Acta Physica et Chemica*, 19, 363-373.

Hayes M.B.H., Mc Carthy P., Malcolm R.L., Swift R.S. (1989) The search for structure : setting the scene in Humic substances II: In search of structures, Hayes M.B.H., Mc Carthy P., Swift R.S., Wiley Ed. 764p.

Hawthorne F.C. (1988) Spectroscopic methods in Mineralogy and Geology. Reviews in Mineralogy, Mineralogical Society of America, Hawthorne F.A. Ed., 18, 698 p.

Heikinen K. (1994) Organic matter in the drainage basin of a boreal humic river in northern Finland. *Sci. of the Total Environnement*, 152, 81-89.

Hill T.L. (1956) In statistical mechanics, Graw-Hill Eds.

Hofstraat J.W., Gooijer C., Velthorst N.H. (1988) Molecular Luminescence Spectroscopy, Part 2 , Wiley and Sons Eds. 335 p.

Hoigné J., Zuo Y., Nowell L. (1994) in Aquatic and surface photochemistry, Pub. Lewis, 75-84.

Hope D., Billet M.F., Cresser M.S. (1994) A review of the export of carbon in river water - fluxes and processes. *Environmental Pollution*, 84, 301-324.

Horowitz A.J., Lum K.R., Garbarino J.R., Hall G.E.M., Lemieux C., Demas C.R. (1996) Problems associated with using filtration to define dissolved trace element concentrations in natural water samples. *Environ. Sci. Technol.*, 30, 954-963.

Huang W., Yu H., Weber W.J. (1998) Hysteresis in the sorption and desorption of hydrophobic organic contaminants by soils and sediments. *Journal of Contaminant Hydrology*, 31, 129-148 et 149-165.

Hwang S., Cutright T.J. (2002) The impact of contact time on pyrene sorptive behavior by a sandy-loam soil. *Environmental Pollution*, 117, 371-378.

I

Isobe T., Nishiyama H., Nakashima A. and Takada H. (2001) Distribution and Behavior of Nonylphenol, Octylphenol, and Nonylphenol Monoethoxylate in Tokyo Metropolitan Area : Their Association with Aquatic Particles and Sedimentary Distributions. *Environ. Sci. Technol.*, 35, 1041-1049.

Ittekkot V., Laane R.W.P.M. (1991) Fate of riverine particulate organic matter in Biogeochemistry of major world rivers. SCOPE/UNEP Sonderbad Eds. 233-244.

J

Jasper J.J. (1972) The surface tension of pure liquid compounds. *Physical and Chemical Reference Data*, 1/4, 841-1010.

Jiji G.A., Booksh K.S. (1999) Excitation-emission matrix fluorescence based determination of carbamate pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Anal. Chim. Acta*, 397, 61-72.

Jouany C., Chassin P. (1987) Wetting properties of Fe and Ca humates. *The science of the Total Environment*, 62, 267-270.

Johnson P.N., Amirtharajah A. (1983) Ferric chloride and alum as single and dual coagulants. *Journal AWWA*, 232-239.

Johnson B.A., Kreuter J., Zograpfi G. (1986) Effect of surfactants and polymers on advancing and receding contact angles. *Colloids Surfaces*, 17, 325-342.

Julien F., Guéroux B. (1994) Comparaison de l'élimination de molécules organiques par coagulation- flocculation et par adsorption sur floccs d'hydroxydes métalliques préformés. *Water Research*, 28, 12, 2567-2574.

K

Kalyanasudaram K., Thomas J.K. (1977) Environmental Effects on Vibronic Band Intensities in Pyrene Monomer Fluorescence and Their Application in Studies of Micellar Systems. *Journal of the American Society*, 99, 2039-2043.

Karapanagioti H.K., Sabatini D.A., Kleideinam S., Grathwohl P., Ligouis B. (1999) Phenanthrene Sorption with Heterogeneous Organic Matter in a Landfill Aquifer Material. *Phys. Chem. Earth*, 24, 535-541.

Karickhoff W., Brown D.S., Scott T.A. (1979) Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water Research*, 13, 241-248.

Karlson S., Wolrath H., Dahlen J. (1999) Influence of filtration, preservation and storing of the analysis of low molecular weight organics acids in natural waters. *Water Research*, 33, 2569-2578.

Kattan Z. (1989) Géochimie et hydrologie des eaux fluviales des bassins de la Moselle et de la Mossig. Transports dissous et particuliers. Cycles biogéochimiques des éléments. Thèse Univ. Louis Pasteur Strasbourg, 220 p.

Kazpard V. (2001) Mécanismes d'agrégation d'un acide humique synthétique : influence de la nature du coagulant et conséquences sur la siccité des gâteaux de filtration. Thèse INPL 180 p.

Kazpard V., Lartiges B.S., Görner T., Frochot C., Viriot M.L., Bersillon J.L. (2005) Aggregation of humic macromolecules with polycations (Al₁₃ and PEI) : a combined pyrene fluorescence, electrophoretic mobility and SEC investigation. *Submitted to EST*.

Khan S.U. (1982) Distribution and characteristics of bound residues of prometryn in an organic soil. *J. Agric. Food Chem.*, 30, 175-179.

Khatib K. (1994) Structure et réactivité des argiles organiques utilisées pour l'élimination des micropolluants en milieu aqueux. Thèse INPL 200 p.

Kim J.S., Jung S.Y., Hwang I.T., Cho K.Y. (1999) Characterization of chlorophyll : a fluorescence induction in cucumber cotyledons treated with diuron, norflurazon and sulcotrione. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 65, 73-81.

Knicker H., Del Rio J.C, Hatcher P.G., Mianrd R.D. (2001) Identification of protein remnants in insoluble geopolymers using TMAH thermochemolysis/GC-MS. *Organic Geochemistry*, 32, 397-409.

Knight R.J., Sylva R.N. (1975) *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 37, 779-783.

Kumke M.U., Frimmel F.H., Ariese F., Gooijer C. (2000) Fluorescence of Humic Acids (HA) and Pyrene-HA complexes at Ultralow Temperature. *Environ. Sci. Technol.*, 34, 3818-3823.

L

Laane R.W.P.M., Kramer K.J.M. (1990) Natural fluorescence in the North Sea and its major estuaries. *Netherlands Journal of Sea Research*, 26, 1-9.

Laha S., Luthy R.G. (1992) Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil-mater systems. *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 1367-1380.

Lakowicz J.R. (1999) Principles of Fluorescence Spectroscopy. Kluwer Academic/ Plenum Second Ed., 25-61.

LaMer V.K., Healy T.W. (1963) Adsorption-Flocculation Reaction of Macromolecules at the Solid Liquid Interface- Review of Pure and Applied Chemistry, 13, 112 p.

Lamotte M., Fournier De Violet P., Garrigues P. (2001) Détection et analyse directe des micro-polluants organiques par spectroscopie optique sur phases solides adsorbantes. Performances et perspectives. *Spectra Analyse*, 222, 27-31.

Langford C.H., Khan T.R., Skippen G.B. (1979) On the nature of the complexing capacity of natural waters : functional group based fractionation of a sample from the Indian River, Ontario. *Inorganic and Nuclear Chemistry Letters*, 15, 291-295.

Langford C.H., Gamble D.S., Underdown A.W., Lee S. (1983) Interaction of metal ions with a well characterised fulvic acid. Aquatic and terrestrial Humic materials. *Ann Ar.Sci.*, 219-238.

Laor Y., Strom P.F., Farmer W.J. (1998) Bioavailability of phenanthrene sorbed to mineral-associated humic acid. *Water Research*, 7, 1719-1729.

Lead J.R., Wilkinson K.J., Starchev K., Canonica S., Buffle J. (2000) Determination of Diffusion Coefficients of Humic Substances by Fluorescence Correlation Spectroscopy : Role of Solution Conditions. *Environ. Sci. Technol.*, 34, 1365-1369.

Leenheer J.A., Brown P.A., Noyes T.I. (1989) In Aquatic Humic Substances : Influence in Fate and Treatment of Pollutants, Advances in Chemistry series 219 ; American Chemical Society ; Suffet, I.H., MacCarthy, P., Eds. 25-39.

Lefebvre E., Legube B. (1990) Coagulation par Fe^{III} de substances humiques extraites d'eaux de surface : effet du pH et de la concentration en substances humiques. *Water Research*, 24, 5, 591-606.

Lefebvre E., Legube B. (1993) Coagulation-flocculation by ferric chloride of some organic compounds in aqueous solution. *Water Research*, 27, 3, 433-447.

Legrand A.P., Hommel H., Tuel A., Vidal A., Balard H., Papirer Z., Levitz P., Czernichowski M., Eru R., Van Damme H., Gallas J.P., Hemidy J.F., Lavalley J.C., Barrès O., Burneau A., Gillet Y. (1990) Hydroxyls of silica powders. *Advances in Colloid and Interface Science*, 33, 91-330.

Leroy J.B. (1994) La pollution des eaux, coll. Que sais-je? n°983, Presses universitaires de France Ed. 128 p.

Lévesque M. (1972) Fluorescence and gel filtration of compounds. *Soil Sci.*, 113, 346-355.

Li C., Frolking S., Harris R. (1994) Modelling carbon biogeochemistry in agricultural soils. *Global Geochem. Cycles*, 8, 237-254.

Lichtfouse E., Chenu C., Baudin F., Lenblond C., Da Silva M., Behar F., Derenne S., Largeau C. (1998) Preservation of resistant straight-chain biopolymers : chemical and isotope evidence. *Organic Geochemistry*, 28, 411-415.

Lick W., Rapaka V. (1996) A quantitative analysis of the dynamics of the sorption of hydrophobic organic chemicals to suspended sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, 1038-1048.

Lochmuller C.H., Saavedra, S.S. (1986) *Anal. Chem.*, 58, 1978-1985.

Long J.L.A., House W.A., Parker A., Rae J.E. (1998) Micro-organic compounds associated with sediments in the Humber rivers, *The Science of the Total Environment*, 210/211, 229-253

Ludwig W., Probst J.L., Kempe S. (1996) Predicting the oceanic input of organic carbon by continental erosion. *Global Biogeochemical Cycles*, 10, 23-41.

M

Mac Bride M.B. (1989) Mobility and solubility of toxic metals and nutrients in soil fifteen years after sludge application. *Soil Science*, 162, 487-500.

Mac Kinney D.E., Hatcher P.G. (1996) Characterization of peatified and coalified wood by tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis. *International Journal of Coal Geology*, 32, 217-228.

MacDonald B.C., Livin S.L., Patterson H. (1997) Correction of fluorescence inner filter effects and the partitioning of pyrene to dissolved organic carbon. *Analytica Chimica Acta*, 338, 155-162.

Maillard L.C. (1912) Action des acides amines sur les sucres : formation des mélanoidines par voie méthodologique. *Compte rendus de l'Académie des Sciences*, 156, 148-149.

Malleval J. (1993) Why is natural organic matter problematic ? Workshop Proceedings of AWWA about Natural Organic Matter in Drinking water, AWWA Research Foundation Ed. 3-17.

Malliaris A., Lang J., Zana R. (1986) Dynamics of Micellar Solutions of Ionic Surfactants by Fluorescence Probing. *Journal of Physical Chemistry*, 90, 655-660.

Maneux E. (1998) Erosion mécanique des sols et transports fluviaux de MES : application des systèmes d'information géographiques dans les bassins versants de l'Adour, la Dordogne et la Garonne. Thèse Univ. Bordeaux I 252 p.

Martin F., Almendros G., Gonzalez-Vila F.J., Verdejo T. (2001) Experimental reappraisal of flash pyrolysis and low-temperature thermally assisted hydrolysis and methylation using tetramethylammonium hydroxide for the molecular characterization of humic acids. *J. Anal. Appl. Pyrol.*, 61, 133-145.

Martin F., Del Rio J.C. Gonzalez-Vila, F.J., Verdejo, T. (1994) Pyrolysis derivatization of humic substances. 1-Pyrolysis of soil fulvic acids in the presence of tetramethylammonium hydroxyde. *J. Anal. Appl. Pyrol.*, 28, 71-80.

Matsuzawa S., Garrigues P., Budzinski H., Bellocq J., Shimizu Y. (1995) Applicability of low temperature high-resolution fluorescence spectroscopy to the analysis of nitro and amino polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytica Chimica Acta*, 312, 165-177.

Matthews B.J.H. (1996) Excitation-emission-matrix fluorescence spectroscopy applied to humic acid bands in coral reefs. *Marine Chemistry*, 55, 317-332.

Meybeck M. (1988) How to establish and use world budgets of riverine materials. In Physical and Chemical Weathering in Geochemical Cycles, Lerman A. and Meybeck M. Eds., Kluwer Academic Publishers 247-272.

Meybeck M. (1993) C, N, P and S in rivers : from sources to global inputs in Biogeochemical Cycles and Global Change, R. Wollast, F.T. Mackenzie and L. Chou, Springer-Verlag Eds., 163-193.

Miano T.M., Senesi N. (1992) Synchronous excitation fluorescence spectroscopy applied to soil humic substances chemistry. *Sci. Total Environ.*, 117-118, 42-51.

Miano, T.M., Sposito G., Martin J.P. (1988) Fluorescence spectroscopy of model humic acid-type polymers. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 52, 1016.

Mizusaki M., Morishima Y. (1998) Interaction of Pyrene-Labeled Hydrophobically Modified Polyelectrolytes with Oppositely Charged Mixed Micelles Studied by Fluorescence Quenching. *J. Phys. Chem. B*, 102, 1908-1915.

Mobed J.J., Hemmingsen S.L. (1996) Fluorescence Characterization of IHSS Humic Substances : Total Luminescence Spectra With Absorbance Correction. *Environ. Sci. Technol.*, 30, 3061-3065.

Moore T.R. (1989) Dynamics of dissolved organic carbon in forested and disturbed catchments, westland, New Zealand. 1. Maimai. *Water Resources Research*, 25, 1321-1330.

Moore T.R., Jackson R.J. (1989) Dynamics of dissolved organic carbon in forested and disturbed catchments, Westland, New Zealand. 2. Larry river. *Water Resources Research*, 25, 1331-1339.

Mopper K., Schultz C.A. (1993) Fluorescence as a possible tool for studying the nature and water column distribution of DOC components. *Marine Chemistry*, 41, 229-238.

Morra M.J., Corapcioglu M.O., von Wandruska R., Marshall D.B., Topper K. (1990) Fluorescence quenching studies of Naphtalene and 1-Naphtol interaction with humic acid. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 54, 1283-1289.

Mounier S., Patel N., Quilich L., Benaim J.Y., Benamou C. (1999) Three-Dimensional fluorescence of the dissolved organic carbon in the Amazon River. *Water Research*, 33, 1523-1533.

Mukherjee S., Sen P., Halder A., Sen S., Dutta P., Bhattacharyya K. (2003) *Chemical Physics Letters*, 379, 471-478.

Mulay L.N., Selwood P.W. (1955) Magnetic and Spectrophotometric Studies on Ferric Perchlorate Solutions. *Am. Chem. Soc.*, 77, 2693.

Murphy P.J., Posner A.M., Quirck J.P. (1976) Characterization of Partially Neutralized Ferric Nitrate Solutions. *J. of Coll. And Int. Sci.*, 56, 270-283.

Murphy E.M., Zachara J.M., Smith S.C. (1990) The role of sorbed humic substances on the distribution of organic and inorganic contaminants in groundwater. *Environ. Sci. Technol.*, 28, 1507-1516.

N

Nagorski S.A., Moore J.N., McKinnon, Smith D.B. (2003) Scale-Dependant Temporal Variations in Stream Water Geochemistry. *Environ. Sci. Technol.*, 37, 859-864.

Nakajima A. (1976) Effects of Isomeric Solvents on Vibronic Band Intensities in Fluorescence Spectrum of Pyrene. *Journal of Molecular Spectroscopy*, 61, 467-469.

Nanny M.A., Ratasuk N. (2002) Characterization and comparison of hydrophobic acid dissolved organic carbon isolated from three municipal landfill leachates. *Water Research*, 36, 1572-1584.

Narkis N., Rebhun H. (1977) Stoichiometric relationship between humic and fulvic acids and flocculants. *Journal of AWWA*, 69, 325-337.

Niemeyer J., Chen Y., Bollag J.-M. (1992) Characterization of Humic Acids, Composts, and Peat by diffuse Reflectance Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 56, 135-140.

O

Onken B.M., Traina S.J. (1997) The Sorption of Pyrene and anthracene to humic Acid-Mineral Complexes : Effect of fractional Organic carbon Content. *J. Environ. Qual.*, 26, 126-132.

Oxenford J., Amy G., Malleval J. (1993) Natural organic matter in drinking water: origin, characterization and removal, Workshop Proceedings AWWARF/LED Natural organic matter, Sept. 19-22, ISBN 0-89867-753-X.

P

Parfitt R.L., Fraser A.R., Farmer V.C. (1977) Conductivity of sodium dodecyl sulfate solutions below the critical micelle concentration. *J. Soil Sci. Amer. Prov.*, 39, 838-841.

Parker C.A., Hatchard, C.G., Joyce T.A. (1964) *J. Mol. Spectrosc.*, 14, 311.

Parlanti E., Wörz K., Geoffroy L., Lamotte M. (2000) Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Organic Geochemistry*, 31, 1765-1781.

Peel R.G. (1980) The Roles of Slow Absorption Kinetics and Bioactivity in Modelling of Activated Carbon Absorbers. PhD Thesis, Mc Master University.

Pepper J.W., Wright A.O., Kenny J.E. (2002) In situ measurements of subsurface contaminants with a multi-channel laser-induced fluorescence system. *Spectrochimica Acta Part A*, 58, 317-331.

Pelmont J. (1993) Bactéries et environnement. Adaptations physiologiques. Presses Universitaires Grenoble Ed. 899 p., ISBN 2-7061-0502-8.

Perdue E.M., Beck K.C., Reuter J.H. (1976) Organic Complexes of Iron and Aluminium in Natural Waters. *Nature*, 260, 460-472.

Persson L., Alsberg T., Ledin A., Odham G. (2002) SPME as a method to study partitioning processes in natural samples with high salt concentrations, IHSS Proceedings, Boston.

Peuravuori J. (2001) Binding of pyrene on lake aquatic humic matter : the role of structural descriptors. *Analytica Chimica Acta*, 429, 75-89.

Piccolo A. (2001) The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science*, 166, 810-832.

Piccolo A., Celano G. (1994) Hydrogen-bonding interactions between the herbicide glyphosate and water-soluble humic substances. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13, 1737-1741.

Piccolo A., Cozzolino A., Conte P., Spaccini R. (2000) Polymerization of humic substances by an enzyme catalysed oxidative coupling. *Naturwissenschaften*, 87, 391-394.

Piccolo A., Zaccheo P., Genevi P.G. (1992) Chemical characterization of humic substances extracted from organic-waste-amended soils. *Bioresource Technology*, 40, 275-282.

Prélot B. (2001) Mesure et modélisation de l'hétérogénéité énergétique à l'interface oxyde / électrolyte / métaux. Thèse INPL 246 p.

Princen H.M., Cabazat A.M., Cohen S., Stuart M.A., Heslot F., Nocolet S. (1988) Instabilities during wetting processes : wetting by tensioactive liquids. *J. Colloid Interface Sci.*, 126, 84-92.

Pullin M.J., Cabaniss S.E. (1995) Rank Analysis of the pH-Dependant Synchronous Fluorescence Spectra of Six Standard Humic Substances. *Environ. Sci. Technol.*, 29, 1460-1467.

Pullin M.J., Cabaniss S.E. (2003) The effects of pH, ionic strength, and iron-fulvic acid interactions on the kinetics of non-photochemical iron transformations. I. Iron (II) oxidation and iron (III) colloid formation. II. The kinetics of thermal reduction. *Geochemica et Cosmochimica Acta*, 67, 4067-4077 et 4079-4089.

R

Ragle C.S., Engebretson R.R., von Wandruska R. (1997) The sequestration of hydrophobic micropollutants by dissolved humic acids. *Soil Science*, 162, 106

Randtke, S.J. (1993) Coagulation of NOM : An Overview of the science and U.S. Practice. NOM in drinking water, origin, characterization and removal, Workshop Proceedings of AWWA about Natural Organic Matter in Drinking water, AWWA Research Foundation Ed. 155-163.

Randtke S.J., Jepsen C.P. (1981) Chemical pre-treatment for activated carbon adsorption. *Journal of AWWA*, 73, 8, 411-420.

Rao K.H., Forssberg K.S.E. (1993) Solution Chemistry of Mixed Cationic/Anionic Collectors and Flotation Separation of Feldspar from Quartz. XVIII International Mineral Processing Congress Sydney 837-844.

Reichardt C. (1988) Solvents and solvent effect in organic chemistry, empirical parameters of solvent polarity from spectroscopic measurements. Ebel H.F. 2de Ed., 359-384.

Relexans J.C., Etcheber H. (1982) Cycles saisonniers de la matière organique particulaire à la limite amont de l'estuaire de la Gironde. C.R. Acad. Sci., 294, 861-864.

Reynolds D.M., Ahmad S.R. (1997) Rapid and direct determination of wastewater BOD using fluorescence technique. *Water Research*, 31, 2012-2018.

Richard C., Trubetskaja O., Trubetskoj O., Agfuer J.-P., Guyot G. (2002) Fluorescence and photoinductive efficiency of soil humic acids and their fractions obtained by tandem SEC-PAGE. IHSS Proceedings, Boston.

Richardson M. (1996) Environmental xenobiotics. Taylor and Francis Eds, 492 p., ISBN 0-7484-0399-X.

Richnow H.H., Seifert R., Hefter J., Link M., Francke W., Schaffer G., Michaelis W. (1997) Organic pollutants associated with macromolecular soil organic matter : Mode of binding. *Org. Geochem.*, 26, 745-758.

Rodier J. (1984) L'analyse de l'eau, eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer. Chimie, Physico-chimie, Bactériologie, Biologie. Dunod Ed. 1365 p.

Rose J. (1996) Interactions entre le Fe^{III} et les ions nitrate, phosphate et carboxylate : mécanismes de complexation, nucléation, croissance. Thèse INPL 259 p.

Rose J., Flank A-M., Masion A., Bottero J-Y., Elmerich P. (1997) Nucleation and growth mechanisms of Fe oxyhydroxide in the presence of PO_4 ions.1. Fe K-edge EXAFS study. *Langmuir*, 12, 6701-6707.

Rothman AM.J. (1982) High-Performance Liquid-Chromatography method for determining ethoxymer distribution of alkylphenoxy polyoxyethylene surfactants. *J. Chromatogr. A*, 253, 283-288.

Rouchaud J., Thirion A., Callens D., Bulcke R. (1996) Soil dissipation of the post-emergence herbicide sulcotrione in maize crops treated with organic fertilizers. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 57, 398-405.

Rouchaud J., Neus O., Callens D., Bulcke R. (1998) Sulcotrione soil persistence and mobility in summer maize and winter wheat crops. *Weed Research*, 38, 361-371.

Ryan C.K., Weber J.H. (1982) Fluorescence Quenching Titration for Determination of Complexing Capacities and Stability Constants of Fulvic Acid. *Anal. Chem.*, 54, 986-990.

S

Saiz-Jimenez C. (1994) Pyrolysis methylation of humic substances : pitfalls, limitations and possible solutions. *Environ. Sci. Technol.*, 28, 1773-1780.

Saiz-Jimenez C. (1996) The chemical structure of humic substances in Recent advances in Humic substances in terrestrial ecosystems. Piccolo Ed.

Sanchez F.G., Diaz A.N., Fernandez-Correa R. (1992) Spectrofluorimetric determination of the herbicide bentazone : microenvironment effects on the analytical signal. *Analytica Chimica Acta*, 259, 61-66.

Sannino F., Filazzola M.T., Violante A., Gianfreda L. (1999) Adsorption-Desorption of Simazine on Montmorillonite Coated by Hydroxy Aluminum Species. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 4221-4225.

Sannino F., Violante A., Gianfreda L. (1997) Adsorption-desorption of 2,4-D by hydroxy aluminium montmorillonite complexes. *Pesticide Science*, 51, 429-435.

Savelli G., Focher B., Bunton C.A. (1990) Effects of head group structure on the properties of surfactants. *Colloids and Surfaces*, 48, 29-34.

Sawicki E., Hauser T.R., Stanley T.W. (1960) *Int. J. Air Pollut.*, 2, 253.

Schiavon M. (1988) Studies of the movement and the formation of bound residues of atrazine, of its chlorinated derivatives, and of hydroxyatrazine in soil using ¹⁴C ring-labeled compounds under outdoor conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 15, 55-61.

Schiavon M. (1980) Contribution à l'étude du mouvement et de la dégradation de l'atrazine dans deux sols agricoles drainés. Interaction matière organique-herbicide. Thèse INPL 193p.

Schiavon M., Jacquin F., Goussault C. (1977) Blocage de molécules s-triaziniques par la matière organique. In "Soil organic matter studies", vol. II. IAEA SM Eds., 211, 78, 327-332.

Schnitzer M., Neyroud J. (1975) Alkanes and fatty acids in humic substances. *Fuel*, 54, 17-19.

Schnitzer M., Khan S.U. (1978) Soil Organic Matter. Elsevier Ed. 350 p.

- Schulten H.R., Schnitzer M. (1993) A state of the art structural concept for humic substances. *Naturwissenschaften*, 80, 29-30.
- Schulten H.R., Schnitzer M. (1995) Three dimensional models for humic acids. *Naturwissenschaften*, 487-498.
- Schulten H.R., Schnitzer M. (1997) Chemical model structures for soil organic matter and soils. *Soil Sci.*, 162, 2, 115-130.
- Schulten H.-R., Gleixner G. (1999) Analytical pyrolysis of humic substances and dissolved organic matter in aquatic systems: structure and origin. *Water Research*, 33, 2489-2498.
- Schwertmann U., Cornell R.M. (1991) Iron oxides in laboratory, WCH Ed. 137 p.
- Seal B. K., Roy K. B., Mukherjee S. K. (1964) Fluorescence emission spectra and structure of humic and fulvic acid. *J. Indian Chem. Soc.*, 41, 212-216.
- Sein L.T., Varnum J.M., Jansen S.A. (1999) Conformational modelling of a new building block of humic acid : approaches to the lowest energy conformer. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 546-552.
- Senesi N., D'Orazio V., Miano T.M. (1995) Adsorption mechanisms of s-triazine and bipyridilium herbicides on humic acids from hop field soils. *Geoderma*, 66, 273-283.
- Senesi N., Miano T.M., Provenzo M.R., Brunetti G. (1991) Characterization, differentiation and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Sci.*, 152, 259-271.
- Senesi N., Sposito G., Bradford G.R., Holzclaw K.M. (1992) Residual metal activity of humic acids extracted from soil amended with sewage sludge. *Water, Air, Soil Pollut.*, 55, 409-425.
- Senesi N., Testini C. (1982) Physico-chemical investigations of interaction mechanisms between s-triazine herbicides and soil humic acids. *Geoderma*, 28, 129-146.
- Sierra M.M.D., Donard O.F.X., Etcheber H., Soriano-Sierra E.J., Ewald M. (2001) Fluorescence and DOC contents of pore waters from coastal and deep-sea sediments in the Gulf of Biscay. *Organic Geochemistry*, 32, 1319-1328.
- Sigg L., Stumm W., Behra P. (1992) Chimie des milieux aquatiques : chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement, Masson Ed., 391 p.
- Sliwka-Kaszynska M., Kot-Wasik A., Namiesnik J. (2003) Preservation and Storage of Water Samples. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 33, 31-44.
- Smart P. L., Finlayson B. L., Rylands W. D., Ball C. M. (1976) The relation of fluorescence to dissolved organic carbon in surface waters. *Water Research*, 10, 805-811.
- Spitz A. and Leenher J. (1991) Dissolved organic carbon in river in Biogeochemistry of major world rivers, E.T. Degens, S. Kempe and J.E. Richey, SCOPE/UNEP sonderbad, John Wiley and sons Eds, 213-232.

Spark K.M., Swift R.S. (1994) Investigation of the interaction between pesticides and humic substances using fluorescence spectroscopy. *The Science of the Total Environment*, 152, 9-17.

Stepan S.F., Smith J.F. (1977) Some conditions for use of macroreticular resins in the quantitative analysis of organic pollutants in waters. *Wat. Res.*, 11, 339-342.

Stepan et al. (1978) Approaches for a site extraction of organic compounds from water. *Wat. Res.*, 12, 447-452.

Stevenson F.J. (1994) Humus chemistry : genesis, composition reactions, Wiley and Sons 2nd Ed. 496 p.

Stevenson F.J., Goh K.M. (1971) Infrared spectra of humic acids and related substances, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 35, 471-483.

Stumm W., O'Melia C.R. (1968) Stoichiometry of coagulation. *JAWWA*, 60, 514-539.

Szabo G., Guzzi J., Kordel W., Zsolnay A., Major V., Keresztes P. (1999) Comparison of different HPLC stationary phases for determination of soil-water distribution coefficient, K_{oc} , Values of organic chemicals in RP-HPLC system, *Chemosphere*, 39, 431-442.

T

Tate C.M., Meyer J.L. (1983) The influence of hydrologic conditions and successional state on dissolved organic carbon export from forested watersheds. *Ecology*, 64, 25-32.

Taylor T.A., Patterson H. H., Cronan C.S., Schofield C.L. (1993) Determination of aqueous aluminum with the fluorescent chelating ligand, 2-hydroxy-1-carbazole carboxylate : Part II. Application of ratio fluorescence spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 278, 259-268.

Tchoubar D., Bottero J.Y., Quienne P., Arnaud M. (1991) Partial hydrolysis of Ferric Chloride salt. Structural investigation by Photon-Correlation Spectroscopy and Small-Angle X-Ray Scattering, *Langmuir*, 7, 398-402.

Thébault P. (1978) Elimination des matières organiques et des micropolluants contenus dans les eaux de surface : rôle et efficacité des coagulants minéraux. Thèse INPL, 261 p.

Thévenot D.R. (1993) Pollution des eaux pluviales urbaines : origine, niveau et mobilité des polluants dans Rejets urbains par temps de pluie : pollution et nuisances. Presse de l'École Nationale des Ponts et Chaussées, 81-93.

Thieme J., Niemeyer J. (1998) Interaction of colloidal soil particles, humic substances and cationic detergents studied by X-Ray microscopy. *Progr. Colloid Polym. Sci.*, 111, 193-201.

Thiele B., Günther K., Schwuger M.J. (1997) Alkylphenol Ethoxylates : Trace Analysis and Environmental Behavior. *Chem. Rev.*, 97, 3247-3272.

Thurman E.M., Malcolm R.L. (1981) Preparative isolation of aquatic humic substances. *Amer. Chem. Soc.*, 4, 463-466.

Thurman E.M., Malcolm R.L. (1983) Molecular size of aquatic humic substances. *Org. Geochem.*, 4, 27-35.

Thurman E.M. (1985) Organic geochemistry of natural waters. Thurman E.M. Ed, Martinus Nijhoff, 497 p.

Tipping E. (1981) The adsorption of Aquatic Humic Substances by Iron oxides. *Geochem. Cosmochem. Acta*, 45, 191-199.

Tipping E. (1993) Modelling the competition between alkaline earth cations and trace metal species for binding by humic substances. *Environ. Sci. and Technol.*, 27, 3, 520-529.

Tran C.D., Fleet T.A. (1988) Micellar induced simultaneous enhancement of fluorescence and thermal lensing. *Anal. Chem.*, 60, 2478-2482.

Turro N.J., Yekta A. (1978) Luminescent Probes for Detergent Solutions. A simple Procedure for Determination of the Mean Aggregation Number of Micelles. *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 5951.

V

Van Aken G.A. (2003) Competitive adsorption of protein and surfactants in highly concentrated emulsions : effect on coalescence mechanisms. *Colloids and Surfaces A : Physicochem. Eng. Aspects*, 213, 209-219.

Van der Moude J.H.A., Rijnbout J.B., De Bruyn P.L. (1984) Formation of colloidal dispersions from supersaturated iron (III) nitrate solutions. IV. Analysis of slow flocculation of goethite. *Coll. and Surf.*, 11, 391-400.

Veyssy E. (1998) Transferts de matières organiques des bassins versants aux estuaires de la Gironde et de l'Adour (sud-ouest de la France). Thèse Univ. Bordeaux I 262 p.

Vilgé-Ritter A. (1997) Etude des mécanismes d'élimination de la matière organique des eaux de surface par coagulation-flocculation à l'aide de sels d'aluminium ou de fer. Thèse de l'Université de Droit d'Economie et des Sciences d'Aix-Marseille III 209 p.

Vilgé-Ritter A., Rose J., Masion, A., Bottero J.-Y., Lainé J.-M. (1999) Chemistry and structure of aggregates formed with Fe-salts and natural organic matter. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 147, 297-308.

Villiéras F. (1993) Mouillabilité des surfaces : relations avec la composition chimique et la distribution des sites superficiels, Rapport de fin de contrat Bourse CEE Capital Humain et Mobilité 55 p.

von Wandruska R. (1992) Luminescence of Micellar Solutions. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 23, 187-215.

W

Walling D.E. (1983) The sediment delivery problem. *J. of Hydrol.*, 65, 209-237.

Ward G.M., Aumen N.G. (1986) Woody debris as a source of fine particulate organic matter in coniferous forest stream ecosystems. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 43, 1635-1642.

Weber W.J., Huang W., Leboeuf E.J. (1999) Geosorbent organic matter and its relationship to the binding and sequestration of organic contaminants. *Colloids and Surfaces A/ Physicochemical and Engineering Aspects*, 151, 167-179.

Weber G., Teale F.W.J. (1957) *Trans Faraday Society*, 53, 646.

Wershaw R.L. (1986) A new model for humic materials and their interactions with hydrophobic organic chemicals in soil-water or sediment-water systems. *Journal of Contaminant Hydrology*, 1, 29-45.

Wetzel L R.G. (1992) Gradient-dominated ecosystems: sources and regulatory functions of dissolved organic matter in freshwater ecosystems. *Hydrobiologia*, 229, 181-198.

Whitcomb J.L., Bystol A.J., Campiglia A.D. (2002) Time-resolved laser-induced fluorimetry for screening polycyclic aromatic hydrocarbons on solid-phase extraction membranes. *Analytica Chimica Acta*, 464, 261-272.

Wojtkowiak B., Chabanel M. (1977) *Spectrochimie moléculaire. Technique et Documentation* Ed. 310 p.

Woodwell G. M., Whittaker R. H., Reiners W. A., Likens G. E., Delwiche C. C., Botkin D. B. (1978) The biota and the world carbon budget. *Science*, 199, 141-146.

Wu F.C., Evans R.D., Dillon P.J. (2002) High-Performance liquid chromatographic fractionation and characterization of fulvic acid. *Analytica Chimica Acta*, 464, 47-55.

X

Xing B. (2001) Sorption of naphalene and phenanthrene by soil humic acids. *Environmental Pollution*, 111, 303-309.

Y

Yasuda H., Sharma A.K., YASUDA T.(1981) Effect of orientation and mobility of polymer molecules at surfaces on contact angle and its hysteresis. *J.Polymer Sci.*, 19, 1285-1291.

Z

Zaccheo P., Cabaniss G., Ricca G., Croppa L. (2002) Decomposition of organic residues in soil : experimental technique and spectroscopic approach. *Organic Geochemistry*, 33, 327-345.

Zang X., Brown J.C., van Heemst J.D.H., Palumbo A., Hatcehr P.G. (2001) Characterization of amino acids and proteinaceous materials using online tetramethylammonium hydroxyde (TMAH) thermochemolysis and gas chromatography-mass spectrometry technique. *Journal of Ananalytical and Applied Pyrolysis* , 61, 181-193.

Zang X., van Heemst J.D.H., Dria K.J., Hatcher P.G. (2000) Encapsulation of protein in humic acid from a histosol as an explanation for occurence of organic nitrogen in soil and sediment. *Organic Geochemistry*, 31, 679-695.

Zhou J.L., Rowland S.J. (1997) Evaluation of the Interactions between hydrophobic organic pollutants and suspended particles in estuarine waters. *Wat. Res.*, 31, 1708-1718.

Zsolnay A., Baigar E., Jimenez M., Steinweg B., Saccomandi F., (1999) Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere*, 38, 45-50.

Des acides humiques de synthèse de différentes tailles moléculaires, obtenus par oxydation de catéchol et de glycine ou de triglycine, ont été caractérisés et comparés à des extraits naturels d'acides humiques associés aux matières en suspension aquatique (rivière Moselle). Le suivi cinétique de leur synthèse, par spectrofluorimétrie et spectroscopie infra-rouge, a permis d'appréhender le rôle des différents groupements fonctionnels dans l'organisation structurale finale des macromolécules. La nature des groupements azotés joue un rôle non négligeable dans leur comportement en fluorescence et à l'échelle de l'interface eau/air. Différents représentants de polluants anthropiques ont été choisis afin de déterminer leur capacité d'interaction avec la matière organique. Les herbicides atrazine et sulcotrione, ainsi que les tensio-actifs de type Nonyl-Phénols Ethoxylés (NPE) ne présentent pas d'interaction quantifiables par fluorescence avec les molécules organiques. En présence du polluant « pyrène » (Hydroxy Aromatique Polycyclique, HAP), les macromolécules semblent interagir de façon essentiellement photophysique avec la matière organique, notamment grâce à ses caractéristiques moléculaire hydrophobe en solution. Les molécules de tensio-actifs Sulfate Dodécyl de Sodium (SDS) et Bromure de Cétyl Triméthyl Ammonium (CTAB) présentent des interactions avec la matière organique pouvant être suivies en fluorescence et par des mesures de tension de surface à l'interface air/solution. Le mécanisme de coagulation des molécules organiques synthétiques par le nitrate ferrique a été comparé avec celui de la matière organique naturelle par des techniques de microscopie électronique à transmission (MET). Un mécanisme similaire d'élimination a été établi de façon systématique par la spectroscopie de perte d'énergie au seuils K du carbone et L du fer respectivement (CEELS et FeEELS). Les fonctions carboxyliques sont directement concernées dans le mécanisme. L'élimination successive de différents types de matière organiques est suspectée dans les échantillons naturels. Le degré d'oxydation du fer reste globalement inchangé lors de l'élimination de la matière organique, cependant, différents sites d'interaction avec la matière organique sont décelables par comparaison des résultats obtenus par spectroscopie de perte d'énergie avec ceux de spectroscopie Mössbauer. Enfin, l'optimum de coagulation ne correspond pas toujours à l'élimination maximale du pyrène. Suivant le type de matière organique concernée, le polluant peut être relargué en solution. Des reconformations des macromolécules organiques pourraient être à la source du mécanisme.

Mots clefs : *Substances humiques synthétiques et naturelles • Polluants • Fluorescence • Tensions de surface • Coagulation • Microscopie Electronique à Transmission • Mössbauer*

Several molecular weights humic-like compounds were synthesised by oxidation and polymerisation of catechol and glycine or triglycine, and compared to natural suspended matters extracts (Moselle River). The reaction kinetics were monitored by infra-red and fluorescence. This showed the role of the incorporated nitrogen in the overall fluorescence spectra. Furthermore, it has been correlated to their air/water interface behaviour. The binding capacity of several priority pollutants with these organic molecules was quantified using fluorescence derived methods. Atrazine and sulcotrione (herbicides), as well as a non-ionic nonyl phenol (surfactant) present no significant fluorescence quenching with humic substances. An entrapment of pyrene (Hydroxy Aromatic Polycyclic, HAP) was shown using fluorescence and interfacial tension measurements. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) and Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) interact with these molecules as well. This was shown at the molecular level, using fluorescence quenching of the humic like material. Also, this interaction was pointed out using air/water interfacial tension measurements. The coagulation mechanism between ferric nitrate and natural as well as synthetic organic molecules has been developed thanks to this technique. Iron status remains unchanged as far as its oxidation status is concerned. However, different organic matter complexation sites could be discriminate by iron loss-spectroscopy (EELS) coupled with Mössbauer technique. Finally, optimum conditions for pyrene removal seem to be independant of the optimum coagulation dose. Conformational changes of organic structures could be involved in the mechanism.

Key-words : *Synthetic and natural humic substances • Pollutants • Fluorescence • Interfacial tension measurements • Coagulation • Transmission Electron Microscopy • Mössbauer spectroscopy*

Des acides humiques de synthèse de différentes tailles moléculaires, obtenus par oxydation de catéchol et de glycine ou de triglycine, ont été caractérisés et comparés à des extraits naturels d'acides humiques associés aux matières en suspension aquatique (rivière Moselle). Le suivi cinétique de leur synthèse, par spectrofluorimétrie et spectroscopie infra-rouge, a permis d'appréhender le rôle des différents groupements fonctionnels dans l'organisation structurale finale des macromolécules. La nature des groupements azotés joue un rôle non négligeable dans leur comportement en fluorescence et à l'échelle de l'interface eau/air. Différents représentants de polluants anthropiques ont été choisis afin de déterminer leur capacité d'interaction avec la matière organique. Les herbicides atrazine et sulcotrione, ainsi que les tensio-actifs de type Nonyl-Phénols Ethoxylés (NPE) ne présentent pas d'interaction quantifiables par fluorescence avec les molécules organiques. En présence du polluant « pyrène » (Hydroxy Aromatique Polycyclique, HAP), les macromolécules semblent interagir de façon essentiellement photophysique avec la matière organique, notamment grâce à ses caractéristiques moléculaire hydrophobe en solution. Les molécules de tensio-actifs Sulfate Dodécyl de Sodium (SDS) et Bromure de Cétyl Triméthyl Ammonium (CTAB) présentent des interactions avec la matière organique pouvant être suivies en fluorescence et par des mesures de tension de surface à l'interface air/solution. Le mécanisme de coagulation des molécules organiques synthétiques par le nitrate ferrique a été comparé avec celui de la matière organique naturelle par des techniques de microscopie électronique à transmission (MET). Un mécanisme similaire d'élimination a été établi de façon systématique par la spectroscopie de perte d'énergie au seuils K du carbone et L du fer respectivement (CEELS et FeEELS). Les fonctions carboxyliques sont directement concernées dans le mécanisme. L'élimination successive de différents types de matière organiques est suspectée dans les échantillons naturels. Le degré d'oxydation du fer reste globalement inchangé lors de l'élimination de la matière organique, cependant, différents sites d'interaction avec la matière organique sont décelables par comparaison des résultats obtenus par spectroscopie de perte d'énergie avec ceux de spectroscopie Mössbauer. Enfin, l'optimum de coagulation ne correspond pas toujours à l'élimination maximale du pyrène. Suivant le type de matière organique concernée, le polluant peut être relargué en solution. Des reconformations des macromolécules organiques pourraient être à la source du mécanisme.

Mots clefs : Substances humiques synthétiques et naturelles • Polluants • Fluorescence • Tensions de surface • Coagulation • Microscopie Electronique à Transmission • Mössbauer

Several molecular weights humic-like compounds were synthesised by oxidation and polymerisation of catechol and glycine or triglycine, and compared to natural suspended matters extracts (Moselle River). The reaction kinetics were monitored by infra-red and fluorescence. This showed the role of the incorporated nitrogen in the overall fluorescence spectra. Furthermore, it has been correlated to their air/water interface behaviour. The binding capacity of several priority pollutants with these organic molecules was quantified using fluorescence derived methods. Atrazine and sulcotrione (herbicides), as well as a non-ionic nonyl phenol (surfactant) present no significant fluorescence quenching with humic substances. An entrapment of pyrene (Hydroxy Aromatic Polycyclic, HAP) was shown using fluorescence and interfacial tension measurements. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) and Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) interact with these molecules as well. This was shown at the molecular level, using fluorescence quenching of the humic like material. Also, this interaction was pointed out using air/water interfacial tension measurements. The coagulation mechanism between ferric nitrate and natural as well as synthetic organic molecules has been developed thanks to this technique. Iron status remains unchanged as far as its oxidation status is concerned. However, different organic matter complexation sites could be discriminate by iron loss-spectroscopy (EELS) coupled with Mössbauer technique. Finally, optimum conditions for pyrene removal seem to be independant of the optimum coagulation dose. Conformational changes of organic structures could be involved in the mechanism.

Key-words : Synthetic and natural humic substances • Pollutants • Fluorescence • Interfacial tension measurements • Coagulation • Transmission Electron Microscopy • Mössbauer spectroscopy