



HAL
open science

Biodisponibilité des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques dans les écosystèmes aquatiques : Influence de la matière organique naturelle et anthropique

Catherine Gourlay-Francé

► To cite this version:

Catherine Gourlay-Francé. Biodisponibilité des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques dans les écosystèmes aquatiques : Influence de la matière organique naturelle et anthropique. Sciences of the Universe [physics]. ENGREF (AgroParisTech), 2004. English. NNT: . pastel-00000945

HAL Id: pastel-00000945

<https://pastel.hal.science/pastel-00000945v1>

Submitted on 17 Dec 2004

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ECOLE NATIONALE DU GENIE RURAL, DES EAUX ET DES FORÊTS

N° attribué par la bibliothèque
/ / / / / / / / / / / / / / / /

THESE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'ENGREF

Spécialité :
Géosciences et Ressources Naturelles

présentée et soutenue publiquement par
Catherine GOURLAY

Le 24 novembre 2004

à l'Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et Forêts
Centre de Paris

**BIODISPONIBILITE DES
HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES
DANS LES ECOSYSTEMES AQUATIQUES :
INFLUENCE DE LA MATIERE ORGANIQUE
NATURELLE ET ANTHROPIQUE**

devant le jury suivant :

| | |
|---------------------------------------|--------------------|
| Alain SALIOT | Rapporteur |
| Philippe GARRIGUES | Rapporteur |
| Véronique LOIZEAU | Examineur |
| Jacques BORIES | Examineur |
| Claude MILLIER | Examineur |
| Jean-Marie MOUCHEL | Directeur de thèse |
| Marie-Hélène TUSSEAU-VUILLEMIN | Co-directrice |

**Biodisponibilité des
hydrocarbures aromatiques polycycliques
dans les écosystèmes aquatiques :
influence de la matière organique
naturelle et anthropique**

Rapport de thèse

Catherine Gourlay

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été mené au CEREVE (Centre d'Enseignement et de Recherche sur l'Eau, la Ville et l'Environnement), laboratoire commun à l'Ecole Nationale des Ponts et Chaussées, à l'Ecole Nationale du Génie Rural des Eaux et Forêts et à l'Université Paris XII-Val de Marne. Il a été réalisé dans le cadre de l'Ecole Doctorale Géosciences et Ressources Naturelles.

Cette thèse a pu avoir lieu grâce à l'autorisation de la commission des spécialistes du corps du Génie Rural, des Eaux et des Forêts, et au soutien de Claude Millier, directeur scientifique de l'ENGREF et Gérard Degoutte, directeur de l'ENGREF Paris. Je leur suis reconnaissante de m'avoir permis de réaliser ce travail.

Jean-Marie Mouchel, directeur de recherches à l'ENPC, et directeur du CEREVE a dirigé cette thèse. Je le remercie d'avoir accepté mon projet et de m'avoir accueillie au CEREVE. Je le remercie aussi d'avoir suivi, guidé, soutenu, et fait confiance à mon travail.

J'adresse tous mes remerciements à Jeanne Garric, directrice du laboratoire d'écotoxicologie du Cemagref de Lyon, qui a suivi et co-encadré ma thèse, et y a apporté la touche « biologique ».

Je remercie Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin, au Cemagref d'Antony qui a monté ce projet avec moi, l'a co-encadré et soutenu sur ces quatre années. Travailler avec Marie-Hélène a été un véritable plaisir, et je suis ravie de pouvoir continuer encore quelques années.

Mon comité de thèse m'a beaucoup aidé, en m'apportant à chaque réunion des regards extérieurs et critiques sur mon travail. Je suis très reconnaissante à Hélène Budzinski, Jean-Philippe Croué et Eric Vindimian pour ces réunions très fructueuses et aussi re-motivantes quand il y en avait besoin.

Je remercie les professeurs Alain Saliot et Philippe Garrigues d'avoir accepté le rôle de rapporteurs, ainsi que Véronique Loizeau, Jean-François Férard et Jacques Bories pour leur participation au jury de la thèse.

Cette recherche a été possible grâce aux soutiens financiers du Programme National /ACI-FNS « Ecosphère continentale, Processus, et modélisation ; Volet écotoxicologie et écodynamique des Contaminants », du PIREN-Seine, et du Département Gestion des Milieux Aquatiques du Cemagref.

Au CEREVE, je remercie Mohammed Saad pour son aide et sa disponibilité au laboratoire, et pour avoir invariablement gardé le sourire devant mes demandes ou mes contraintes. Grâce à Catherine Lorgeoux, j'ai découvert certains des secrets de la chimie analytique. Pour toute son

aide au laboratoire, ses nombreux conseils, et sa bonne humeur permanente, je lui dit un grand merci.

Au Cemagref de Lyon, je remercie Bernard Vollat qui m'a appris toutes les ficelles pour un élevage de daphnies réussi et Cécile Miège qui a contribué largement à ce travail, d'abord pour les analyses de HAP dans les daphnies, puis pour son investissement dans le projet SPMD.

Les résultats obtenus ici sont aussi le travail de plusieurs stagiaires à qui j'adresse ma reconnaissance : Yan Trinh, Sylvie de Almeida, Laïla El Jouhari et Dan Wang. Je remercie aussi Aurélien Noir, doctorant au Cemagref de Lyon, pour notre collaboration dans la comparaison SPMD daphnies

J'ai une pensée pleine de reconnaissance pour Catherine Charleux qui m'a encouragée et forcée à la bonne humeur, ainsi que pour les « déjà » ou « bientôt » docteurs que j'ai côtoyés avec beaucoup de plaisir: Claire, Claire, Laurence, Nassima, Jérôme, Bruno et Assem ont permis que l'ambiance soit chaleureuse et m'ont encouragée pendant toute ma thèse.

Enfin, merci à Marc-Eric pour toutes les attentions du quotidien pendant ces quatre ans, et à Alice qui nous rend tous les jours un peu plus heureux.

Pour finir, je dois dire un grand merci à mes parents qui m'ont toujours soutenue pendant tout mon parcours jusqu'à aujourd'hui.

RESUME

Les écosystèmes aquatiques sont un récepteur privilégié des micro-polluants. Ils contiennent aussi des matières organiques (MO), d'origine naturelle ou anthropique. Les interactions entre les contaminants et les MO déterminent en grande partie la biodisponibilité des polluants dans le milieu aquatique. Ce travail s'intéresse à l'influence des MO des milieux anthropisés sur la biodisponibilité des polluants organiques hydrophobes. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), présents principalement dans les milieux urbains, ont été choisis comme modèles de contaminants.

Dans les milieux anthropisés, certaines MO sont sujettes à la dégradation bactérienne. Alors que de nombreux travaux par le passé ont été consacrés à l'étude des interactions entre les contaminants et les MO humiques, essentiellement non dégradables, en caractérisant les MO d'un point de vue physico-chimique, la biodégradabilité a été choisie comme point d'entrée pour ce travail. Nous faisons en effet l'hypothèse que l'affinité des contaminants pour la MO évolue au cours de sa dégradation, et qu'ils sont susceptibles d'être relargués sous forme biodisponible dans le milieu durant la biodégradation, puis d'être à nouveau fixés le cas échéant sur les sous-produits de la biodégradation.

Au laboratoire, la biodisponibilité des HAP a été évaluée par mesures de bioaccumulation dans *Daphnia magna*. L'influence de la matière organique sur la biodisponibilité des HAP, l'évolution de cette influence au cours de la minéralisation bactérienne et le fort potentiel de fixation des sous-produits de dégradation ont été mis en évidence. Une modélisation de ces phénomènes a été proposée. Ces résultats concernant l'effet des MO urbaines et naturelles ont ensuite été confrontés aux mesures de la biodisponibilité des HAP *in situ*, dans le bassin de la Seine., obtenues par l'usage de membranes Semi-perméables (SPMD).

Mots-clés

Biodisponibilité - HAP - Matière Organique - Biodégradation – rejets urbains – algues - modèle de qualité de l'eau - SPMD

Abstract

Aquatic ecosystems receive micro-pollutants. They also contain organic matter (OM) of natural and anthropogenic origins. The contaminant bioavailability in aquatic media is determined by the interactions between contaminants and OM.

This work deals with the influence of organic matter from anthropogenic media on the bioavailability of hydrophobic organic pollutants. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) have been used as model contaminants, since they are widely spread in urban media.

In anthropogenic media, some OM may be biodegraded. Up to now, most researches focused on the interactions between contaminants and humic OM that are mostly non-degradable, using physico-chemical characterizations of OM. On the contrary, in this work, the biodegradability of OM was deliberately taken into account. Indeed, we assume that the contaminant affinity for OM evolves during OM biodegradation, so that pollutants may be released in a bioavailable form and then may be bound again by biodegradation sub-products.

In laboratory evaluation, PAH bioavailability was assessed through the measurements of the bioaccumulation in *Daphnia magna*. The influence of organic matter on the bioavailability of PAHs and the evolution of this influence along OM bacterial mineralization were proved, as well as the strong binding efficiency of degradation by-products. A model of observed phenomena was elaborated.

These observations about urban and natural OM effect were compared to in situ PAH bioavailability measurements in the river Seine basin. In this case, the bioavailability was estimated using Semi-Permeable Membrane Device (SPMD) sampling technique.

Key-words

Bioavailability – PAHs – Organic matter – Biodegradation – urban effluents – algae – Water quality model – SPMD

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| REMERCIEMENTS | 3 |
| RESUME | 5 |
| SOMMAIRE | 7 |
| LISTE DES ABBREVIATIONS..... | 11 |
| INTRODUCTION | 13 |
| ETAT DES CONNAISSANCES | 17 |
| 1 LES POLLUANTS ORGANIQUES HYDROPHOBES..... | 17 |
| 1.1 Présentation et généralités..... | 17 |
| 1.2 Biodisponibilité des polluants organiques hydrophobes dans l'eau..... | 22 |
| 2 COMMENT CARACTERISER LA MATIERE ORGANIQUE ? | 26 |
| 2.1 Concentration en matière organique | 26 |
| 2.2 Fractionnement physico-chimique de la matière organique | 27 |
| 2.3 Caractérisation chimique..... | 29 |
| 2.4 Méthodes spectroscopiques..... | 30 |
| 2.5 Biodégradabilité de la matière organique..... | 32 |
| 3 INFLUENCE DE LA MATIERE ORGANIQUE SUR LA BIODISPONIBILITE DES POLLUANTS ORGANIQUES HYDROPHOBES | 36 |
| 3.1 Interactions entre matière organique et polluants dans le milieu aquatique..... | 36 |
| 3.2 Influence des interactions matière organique/ polluants organiques hydrophobes sur leur biodisponibilité..... | 43 |
| 3.3 Variabilité des interactions entre matière organique et polluants organiques hydrophobes 46 | 46 |
| 3.4 Conclusion | 48 |
| PROBLEMATIQUE..... | 51 |
| QUANTIFICATION DE L'INFLUENCE DE LA MATIERE ORGANIQUE SUR LA BIODISPONIBILITE DES HAP..... | 55 |
| 1 MESURE DES HAP BIOACCUMULES DANS <i>DAPHNIA MAGNA</i>..... | 57 |
| 1.1 Protocole | 58 |
| 1.2 Validation de la méthode | 58 |
| 1.3 Conclusion | 63 |
| 2 MESURE DE L'INFLUENCE DE LA MATIERE ORGANIQUE SUR LA BIOACCUMULATION DES HAP | 64 |
| 2.1 Principe..... | 64 |
| 2.2 Validité de la méthode..... | 66 |

| | | |
|--|--|------------|
| 2.3 | Conclusion | 69 |
| INFLUENCE DES MATIERES ORGANIQUES SUR LA BIODISPONIBILITE : IMPORTANCE DE LA BIODEGRADABILITE 71 | | |
| 1 | ETUDE EXPERIMENTALE..... | 72 |
| 1.1 | Matériels et méthodes..... | 72 |
| 1.2 | Résultats..... | 74 |
| 1.3 | Conclusion | 80 |
| 2 | MISE EN PLACE D'UN MODELE D'EXPOSITION DES POLLUANTS | 81 |
| 2.1 | Objectif et Démarche | 81 |
| 2.2 | Fractionnement du substrat en MOD biodégradable et réfractaire | 81 |
| 2.3 | Fractionnement du substrat en plusieurs classes de biodégradabilité | 83 |
| 2.4 | Conclusions et perspectives..... | 89 |
| APPROCHE IN SITU DE L'EFFET DE LA MO SUR LA BIODISPONIBILITE DES HAP EN MILIEU AQUATIQUE 91 | | |
| 1 | DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE SPMD. | 92 |
| 1.1 | Principe de la SPMD | 92 |
| 1.2 | Utilisation pratique de la SPMD | 94 |
| 1.3 | Conclusion : intérêts et limites de la SPMD | 97 |
| 2 | LES SPMD MESURENT-ELLES LES HAP BIODISPONIBLES ? | 98 |
| 2.1 | Contexte | 98 |
| 2.2 | Comparaison des HAP bio- et SPMD-disponibles en présence de MOD..... | 99 |
| 2.3 | Conclusion | 104 |
| 3 | BIODISPONIBILITE DES HAP IN SITU : PEUT-ON OBSERVER L'INFLUENCE DES MATIERES ORGANIQUES ? | 105 |
| 3.1 | Objectifs | 105 |
| 3.2 | Matériels et méthodes..... | 105 |
| 3.3 | Résultats..... | 107 |
| 3.4 | Discussion : peut-on évaluer le rôle des matières organiques ?..... | 110 |
| 3.5 | Conclusion et perspectives | 112 |
| CONCLUSION 115 | | |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....119 | | |

Liste des articles en annexe

Article 1

Gourlay C, Miège C, Tusseau-Vuillemin MH, Mouchel JM, Garric J. (2002). The use of spectrofluorimetry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons bioaccumulation and biotransformation in *Daphnia magna*. *Polycyclic Aromatic Compounds*. Volume 22, 3-4, pp 501 - 516

Article 2

Gourlay C, Tusseau-Vuillemin MH, Garric J, Mouchel JM. (2003). Effect of non-humic dissolved organic matter from various origins and biodegradabilities on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 22, n°6, pp 1288-1294.

Article 3

Gourlay C, Tusseau-Vuillemin MH, Garric J, Mouchel JM. (in press). The ability of dissolved organic matter (DOM) to influence benzo[a]pyrene bioavailability increases along DOM mineralization.

A paraître dans *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

Article 4

Gourlay C, Mouchel JM, Tusseau-Vuillemin MH, Garric J. (in press). Role of algal and bacterial particulate organic matter on benzo[a]pyrene bioaccumulation in *Daphnia magna*.

A paraître dans *The Science of the Total Environment*

Article V

C. Miège, C. Gourlay, M.-H. Tusseau-Vuillemin, D. Wang, S. Durand, J. Garric, J.-M. Mouchel (2004). Semipermeable membrane device-availability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in river waters and wastewater treatment plant effluents. *Polycyclic Aromatic Compounds*, Volume 24, pp 805-824

LISTE DES ABBREVIATIONS

| | |
|----------------|--|
| POH | Polluant Organique Hydrophobe |
| STEP | Station d'épuration |
| IHSS | International Humic Substances Society |
| US EPA | United States Environmental Protection Agency |
| K_{OW} | coefficient de partage eau/n-octanol |
| HAP | Hydrocarbure Aromatique Polycyclique |
| PCB | Polychlorobiphényles |
| BaP | Benzo[a]pyrène |
| MO | Matière Organique |
| MOD | Matière Organique Dissoute COD Carbone Organique Dissous [COD] concentration en COD |
| MOP | Matière Organique Particulaire COP Carbone Organique Particulaire [COP] concentration en COP |
| K_D | constante de partage d'un POH entre phase solide et phase liquide (en L/kg) |
| K_{OC} | coefficient de partition eau/ carbone organique dans les sédiments (en L/Kg) |
| K_{DOC} | coefficient de partition eau/ matière organique dissoute dans l'eau |
| K_{POC} | coefficient de partition eau/ matière organique particulaire dans l'eau |
| C_{libre} | concentration en POH dissous libre dans l'eau (ng/L) |
| C_{MOD} | concentration en POH dissous fixé sur les MOD dans l'eau (ng/L) |
| C_{MOP} | concentration en POH fixé sur les MOP dans l'eau (ng/L) |
| C_{part} | concentration en POH sur la phase particulaire (ng/g) |
| C_{total} | concentration en POH total dans l'eau (ng/L) |
| f_{libre} | fraction de polluant libre dans l'eau (C_{libre}/C_{total}) |
| C_S | concentration en POH dans les sédiments (ng/g) |
| C_{eau} | concentration en POH dans l'eau interstitielle (ng/L) |
| $C_{dissous}$ | concentration en POH dans l'eau filtrée ($=C_{libre}+C_{MOD}$) |
| BAF | Facteur de bioaccumulation |
| BCF | Facteur de Bioconcentration ($C_{organisme}/C_{milieu}$) BCF_{MOD} : BCF en présence de MOD BCF_0 : BCF dans une solution sans MOD |
| $C_{daph, OM}$ | concentration en POH dans la daphnie exposée dans un milieu contenant des MO |
| $C_{daph, 0}$ | concentration en POH dans la daphnie exposée dans un milieu sans MO |
| k_i | taux d'accumulation du polluant par voie trophique (h^{-1}) |

| | |
|-----------------|---|
| k_U | taux d'accumulation par contact (h^{-1}) |
| k_d | taux d'excrétion du polluant ($h^{-1}g.L^{-1}$) |
| SPMD | Semi-Permeable Membrane Device |
| PET | Polyéthylène |
| C_{SPMD} | concentration en POH dans la SPMD (en ng/g SPMD) |
| $C_{SPMD-disp}$ | concentration en POH dans l'eau accumulable par la SPMD (en ng/L) |
| R_S | taux d'échantillonnage ($L.h^{-1}$) |
| K_{SPMD} | constante de partage entre l'eau et la SPMD. |

INTRODUCTION

La Directive Cadre Européenne sur l'Eau du 23 octobre 2000 impose aux pays membres d'améliorer l'état écologique des cours d'eau. La première étape de ce travail a consisté à faire le bilan de l'état des eaux et à définir l'objectif de bon état écologique en termes de variables physiques, chimiques et biologiques. L'amélioration de l'état de cours d'eau fixée dans la Directive passe par l'élaboration de programmes de réduction des rejets, qui nécessitent de définir de normes de concentrations et/ou de flux de polluants rejetés adaptées à la sensibilité du milieu aquatique récepteur. Dans ce but, il est fondamental de connaître l'impact des rejets à court et long termes sur le milieu.

Les efforts se sont beaucoup axés sur l'étude de la contamination de l'écosystème aquatique par la charge organique et les éléments majeurs (phosphates, nitrates) (par exemple Meybeck et al., 1998; Tusseau-Vuillemin, 1998). Le devenir et l'impact de ces substances dans le milieu aquatique sont aujourd'hui relativement bien compris, et les efforts de limitation des apports au milieu par la réduction des sources et le traitement des effluents bien avancés. En revanche, la contamination des milieux par les micro-contaminants (ou micro-polluants) reste moins bien appréhendée. Les micro-polluants sont des molécules présentes à l'état de trace (du ng/L au µg/L dans le milieu) mais qui sont susceptibles d'avoir une action toxique forte pour les organismes. On distingue deux types de micro-polluants :

- les éléments métalliques, dont certains sont essentiels à l'organisme en faibles doses et toxiques en plus grande quantité (Zn, Fe, Cu), et d'autres sont complètement étrangers aux organismes (Pb, Hg...).
- Les micro-polluant organiques. Cet ensemble est constitué de molécules très diverses et est en constante évolution, puisque l'on dénombre une nouvelle molécule organique toutes les 30 secondes. Ces molécules sont produites pour l'activité humaine industrielle (hydrocarbures, solvants, teintures, PCBs dioxines, etc...), agricole (pesticides), humaine (médicaments) sont générées indirectement par ces activités (résidus de combustion, intermédiaires de synthèse), ou encore peuvent exister naturellement dans l'environnement. Une grande partie des polluants organiques est persistante dans l'environnement et fortement bioaccumulable dans les cellules lipidiques des organismes (Jones et de Voogt, 1999)

Dans le cadre de la Directive Cadre Européenne sur l'eau, une liste de trente-deux substances prioritaires « présentant un risque significatif pour ou via l'environnement aquatique » a été établie. Cet ensemble contient des métaux et plusieurs types de micro-polluants organiques : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), benzènes chlorés, pesticides... Cette liste illustre la prise de conscience du danger pour l'écosystème et l'enjeu environnemental que représentent les micro-polluants. Pour l'ensemble de ces molécules, des objectifs de réduction et d'élimination des rejets et des concentrations environnementales doivent être prises. Ce travail

passer par l'acquisition de connaissances concernant leur devenir et leur potentiel toxique dans l'environnement.

La toxicité aiguë des micro-polluants est souvent connue depuis longtemps grâce à des essais de laboratoire normalisés et aujourd'hui rendus obligatoires pour la mise sur le marché de nouvelles substances. L'impact sur le milieu de ces produits dispersés dans l'écosystème est en revanche beaucoup plus difficile à appréhender. D'une part, les très faibles teneurs les rendent difficiles à détecter et ne conduisent pas à des effets toxiques aigus « spectaculaires » (au contraire d'une désoxygénation, d'une eutrophisation ou d'une pollution accidentelle par exemple). D'autre part, les organismes du milieu subissent une exposition prolongée à de faibles doses qui est susceptible d'engendrer des effets chroniques irrémédiables, difficilement observables rapidement, et surtout plus difficiles à relier aux concentrations en polluants dans le milieu.

La biodisponibilité désigne « la fraction de produit chimique présent dans le milieu environnemental qui est disponible pour être accumulée par les organismes. L'environnement peut inclure l'eau, les sédiments, les particules en suspension et la nourriture » (Rand et al., 1995). Dans le milieu récepteur, des mécanismes physiques, chimiques et biologiques interagissent et transforment les contaminants en des formes plus ou moins biodisponibles pour les organismes de l'écosystème. Les concentrations totales rejetées ne reflètent donc que partiellement le risque lié à un contaminant, la biodisponibilité étant très étroitement liée aux caractéristiques de l'environnement (Hamelink et al., 1994). L'évaluation de l'impact d'un contaminant sur le milieu nécessite l'estimation des concentrations biodisponibles et des facteurs environnementaux qui les affectent.

Les milieux aquatiques contiennent par ailleurs des matières organiques (MO) d'origines très variées. Le terme « matière organique » regroupe l'ensemble des composés carbonés issus de la biogénèse. Elle est constituée de molécules très diverses, souvent polymérisées et agrégées. Les matières organiques naturelles sont produites dans l'écosystème aquatique par l'activité algale, bactérienne et de l'ensemble de la chaîne trophique, et des processus de transformation la MO détritique (MO autochtone) ou atteignent le milieu par érosion physique et chimique des sols (MO allochtone). Certaines MO peuvent être d'origine anthropique et provenir des rejets directs d'effluents, domestiques ou industriels, bruts ou traités, et du lessivage des sols pollués, des routes...

L'impact direct des MO sur la qualité du milieu et sur le développement des chaînes trophiques est aujourd'hui bien connu (Wetzel, 1983; Thurman, 1984). Son impact indirect, comme facteur d'influence de la biodisponibilité des polluants est aussi fondamental mais reste beaucoup moins connu. En particulier, la MO a généralement une grande capacité d'interaction avec les micro-polluants métalliques ou organiques (Buffle, 1990; Suffet et al., 1994), ce qui peut modifier leur biodisponibilité (Campbell, 1995; Haitzer et al., 1998). La matière organique est donc un des facteurs du milieu déterminants pour la définition de la fraction biodisponible des contaminants.

Les milieux aquatiques subissant une pression anthropique forte reçoivent la plus grande partie des micro-polluants rejetés issus de l'activité humaine et industrielle. Ces milieux sont aussi

chargés en MO autochtones ou allochtones, qui sont susceptibles d'interagir avec les micro-polluants présents dans le milieu. Par ailleurs, ces MO anthropiques peuvent subir une biodégradation dans le milieu aquatique (Servais et al., 1998) et leur affinité pour les micro-polluants peut en être affectée : ceux-ci peuvent être relargués sous forme libre dans le milieu, sont susceptibles d'être eux-mêmes biodégradés, de se lier à d'autres MO plus réfractaires, etc.... La biodisponibilité des contaminants présents peut donc évoluer au cours du temps. Ces interactions et leur évolution au cours du vieillissement des MO restent encore très largement méconnues.

L'objectif de ce travail est de contribuer à la compréhension de l'influence de la matière organique sur la biodisponibilité des micro-polluants, en particulier dans les milieux urbains chargés en MO anthropique et biodégradable. Nous nous restreindrons aux micro-polluants organiques hydrophobes, pour lesquels la biodisponibilité dans les milieux aquatiques est largement définie par leurs interactions avec la MO. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques sont choisis comme modèle de polluants organiques hydrophobes.

Notre travail consiste en la mise en évidence expérimentale, la compréhension, et la modélisation de la modulation de la biodisponibilité des HAP par la matière organique et son évolution dans les eaux urbaines.

ETAT DES CONNAISSANCES

1 LES POLLUANTS ORGANIQUES HYDROPHOBES

1.1 Présentation et généralités

1.1.1 Quelques définitions

L'ensemble des micro-polluants organiques hydrophobes (POH) regroupe un très grand nombre de molécules. Parmi les POH se trouvent certains groupes de molécules bien connus pour leur toxicité comme les Polychlorobiphényles (PCB), les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), les pesticides organochlorés (DDT, atrazine), les dioxines... Cet ensemble, bien que très divers, possède des caractéristiques chimiques communes (hydrophobie, solubilité, persistance) qui leur confèrent des « traits de comportement » similaires dans l'environnement.

Hydrophobie

L'hydrophobie d'une molécule organique est quantifiée au moyen de son coefficient de partage entre l'octanol et l'eau (K_{OW}), rapport des concentrations du composé à saturation dans le n-octanol et dans l'eau.

La solubilité dans l'eau d'une molécule dépend de sa capacité à créer des interactions fortes intermoléculaires avec l'eau. La solubilisation d'une molécule nécessite d'abord de rompre les interactions hydrogène entre les molécules d'eau de façon à créer des « cavités » pour les molécules. Les molécules doivent ensuite créer des interactions avec les molécules d'eau (solvation), en « concurrence » avec les liaisons hydrogène des molécules d'eau entre elles. Les molécules organiques qui présentent des structures polaires capables créer des liaisons hydrogène (de type O-H) seront donc plus facilement solubilisées que des structures apolaires qui interagissent avec leur environnement par des interactions plus faibles dipôle-dipôle de type Van der Waals. Les molécules organiques sont donc d'autant moins solubles dans l'eau qu'elles sont très apolaires, condensées et de grande taille. A l'inverse, ces molécules seront facilement miscibles dans un solvant organique peu polaire (alcanes, ou n-octanol par exemple).

Pour les polluants organiques hydrophobes K_{OW} est supérieur à 100. Ce sont donc des molécules apolaires et peu solubles dans l'eau (solubilité de quelques ng/L à 1 mg/L). La faible solubilité des POH et leur hydrophobie conduisent ces molécules à se fixer préférentiellement sur les particules du milieu.

Le n-octanol possédant des propriétés structurales analogues aux tissus lipidiques des organismes, K_{OW} permet une estimation du caractère lipophile du contaminant (Schwarzenbach et al., 1993), et donc indirectement de sa capacité à être accumulé dans les tissus lipidiques des organismes vivants.

Persistance.

La persistance d'une molécule dans un environnement désigne sa capacité à ne pas être dégradée. La dégradation peut être bactérienne, chimique, voire photo-chimique, ou encore induite par la métabolisation dans les organismes contaminés. Les POH sont en général très peu dégradés par l'action bactérienne du milieu aquatique. Leur hydrophobie les conduit à s'accumuler dans les sédiments où ils se trouvent piégés et protégés de la biodégradation et d'une éventuelle photo-dégradation (les HAP et certains pesticides sont photo-sensibles).

Certains composés sont plus facilement métabolisés par les organismes (HAP par exemple), alors que d'autres s'accumulent dans les tissus, et se concentrent le long de la chaîne alimentaire (PCB).

Les POH sont regroupés en catégories, selon leur structure chimique ou selon leur utilisation. Les propriétés physico-chimiques des composés jouent un rôle fondamental pour leur devenir dans l'environnement. Elles déterminent leur spéciation dans le milieu et leur capacité à être accumulés par les organismes aquatiques. Le Tableau 1 montre les propriétés chimiques de POH regroupés par classes.

| | Hydrophobie log K_{ow} | Solubilité aqueuse C_{eau}^{sat} (g/L) | Volatilité Constante de Henry (L.atm.mol ⁻¹) |
|--|-----------------------------|--|--|
| Benzènes substitués | 1,5 à 5,5 | | |
| Fluorobenzène | 2,3 | 1,56 | 6,2 |
| Bromobenzène | 3,0 | 0,36 | 2,6 |
| Hexachlorobenzène | 5,5 | 5,8x10 ⁻⁶ | 1,5 |
| Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques | 3,4 à 8,2 | | |
| Naphtalène | 3,4 | 0,031 | 0,43 |
| Phénanthrène | 4,5 | 1,1x10 ⁻³ | 2,6x10 ⁻² |
| Pyrène | 5,3 | 1,4x10 ⁻⁴ | 8,9x10 ⁻³ |
| Benzo(a)pyrène | 6,3 | 1,5x10 ⁻⁶ | 1,2x10 ⁻³ |
| Polychlorobiphényles (BCP) | 4,1 à 8,2 | | |
| 2-DCB | 4,5 | 5,1x10 ⁻³ | 0,8 |
| Déca-DCB | 8,2 | 1,4x10 ⁻⁸ | 1,9x10 ⁻² |
| Pesticides | | | |
| Atrazine (herbicide) | 2,6 | 3,3x10 ⁻² | |
| Malathion (insecticide) | 2,9 | 0,14 | |
| Lindane (insecticide) | 3,8 | 9,4x10 ⁻⁴ | 3,2x10 ⁻³ |
| DDT (insecticide) | 6,4 | 5,0x10 ⁻⁶ | 9,6x10 ⁻³ |
| Dioxines | 4,3 à 8,2 | | |
| Tetra-dichloro-dibenzo-dioxine | 6,6 | 1,6x10 ⁻⁸ | 5,2x10 ⁻² |

Tableau 1 : Caractéristiques de quelques polluants organiques hydrophobes (Schwarzenbach et al., 1993)

1.1.2 Enjeu écotoxicologique

La plupart des POH présentent des effets toxiques sur l'homme. Les dioxines sont ainsi classées parmi les substances cancérigènes pour l'homme par le Centre International de la Recherche sur le Cancer. Suivant cette classification, les PCB, certains HAPs ou pesticides font partie des

substances cancérigènes probables. Ces molécules affectent *a fortiori* les organismes aquatiques. Les pesticides, qui sont créés pour avoir une action toxiques sur certains organismes peuvent aussi évidemment impacter l'ensemble des organismes du milieu, leur spécificité ne pouvant être totale. On a ainsi pu relier l'utilisation du DDT comme insecticide neurotoxique à la réduction de fertilité des poissons exposés via la chaîne trophique par un mécanisme endocrinien différent du mécanisme d'action neurotoxique (Rand et al., 1995).

La toxicité de certaines molécules a été depuis longtemps mise en évidence et l'utilisation de ces produits interdits ; c'est le cas par exemple des PCBs, qui ne sont plus produits depuis les années 80, ou encore du DDT, interdit dans les pays industrialisés depuis les années 1970. Cependant, leur très grande persistance dans l'environnement, leur transfert dans tous les compartiments de la biosphère (Kurtz, 1990) (par voie atmosphérique notamment, Halsall et al., 1998) et leur fixation sur les particules font que l'on retrouve ces molécules encore aujourd'hui sur l'ensemble du globe (Chiuchiolo et al., 2004 ; Bard, 1999), sans doute pour de très nombreuses années encore. On a ainsi pu montrer la présence de pesticides, dioxines et de PCB dans les graisses des animaux supérieurs des zones arctiques (Nyman et al., 2002), ou les poissons des zones de l'Antarctique (Weber et Goerke, 1996). Pour l'ensemble des POH, les effets toxicologiques et écotoxicologiques à plus long terme pour des expositions longues à de faibles doses restent encore peu connus.

Le Tableau 2 fournit des exemples de données d'écotoxicité aiguë et chronique pour quelques POH, ainsi que les ordres de grandeur des concentrations dans les eaux douces de surface.

| Molécules | Toxicité aiguë | | Toxicité chronique | | Conc. ubiquitaire eau de surface ou recommandation OMS |
|---------------------------------|--|-------------|---------------------------------------|-------------|--|
| | Type | Conc (µg/L) | Type | Conc (µg/L) | |
| Anthracène | <i>D. magna</i> CL ₅₀ (48h) | 93 | <i>D. magna</i> NOEC 21j | 0,63 | ~10 ng/L |
| Fluoranthène | | | <i>C. dubia</i> NOEC 7j | 1 | < 50 ng/L |
| BaP | <i>D. magna</i> CL ₅₀ (48h) | 1,5 | <i>C. dubia</i> CE ₁₀ | 0,5 | ~1 ng/L |
| Indéno[.]pyrène | <i>D. magna</i> CL ₅₀ (48h) | > 375 | <i>C. dubia</i> CE ₁₀ | 0,27 | < 100 ng/L |
| trichlorobenzène | <i>D. magna</i> CL ₅₀ (48h) | 1452 | <i>D. magna</i> , NOEC 21j | 30 | ~10 ng/L |
| Pentachlorophénol | <i>D. magna</i> CL ₅₀ (48h) | 19-76 | <i>P. promelas</i> (poisson) NOEC 28j | 760 | 0,1 – 1 µg/L |
| DDT | <i>D. magna</i> CL ₅₀ (24h) | 0,36 | | | 1 µg/L* |
| Hexachlorocyclohexane (lindane) | <i>D. magna</i> CL ₅₀ (24h) | 700 | | | 3 µg/L* |
| | Truite (<i>S. trutta</i>) CL ₅₀ (96h) | 1,7 | | | |

* recommandation OMS pour l'eau potable

CL₅₀(x h) concentration létale pour 50% des organismes exposé en x heures.

CE₁₀(xh) concentration ayant un effet de 10% (réduction de la reproduction dans les exmples cités ici)

NOEC non-observed effect concentration : concentration maximale sans effet observé sur les organismes exposés.

Tableau 2 : données d'écotoxicité de quelques POH, à rapprocher des ordres de grandeur de concentrations environnementales (source : fiches toxicologiques et environnementales établies par l'INERIS, disponibles sur www.ineris.fr et Ministère Allemand de la Coopération économique et du Développement : <http://www.gtz.de/uvp/publika/French/Vol346.htm>).

1.1.3 Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

1.1.3.1 Caractéristiques physico-chimiques

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des composés organiques constitués de deux ou plus noyaux aromatiques condensés. Les molécules sont planes, rigides, non polaires. Les noyaux aromatiques rendent les HAP très hydrophobes. leur hydrophobie augmente avec le nombre de cycles aromatiques, alors que leur solubilité et leur volatilité diminuent. Les HAP susceptibles d'être présents dans le milieu aquatique ont entre deux et dix noyaux aromatiques. Au delà, leur solubilité est trop faible pour qu'ils soient détectés dans des environnements aqueux.

Les HAP constituent une classe de POH étudiée et recherchée dans l'environnement depuis les années 70. L'ensemble des HAP appartiennent aux substances prioritaires définies dans la Directive Cadre Européenne sur l'eau (2000/60/CE). Le Tableau 3 présente les seize HAP principalement étudiés et recherchés dans l'environnement car déclarés comme substances prioritaires par l'Environmental Protection Agency américaine (US EPA).

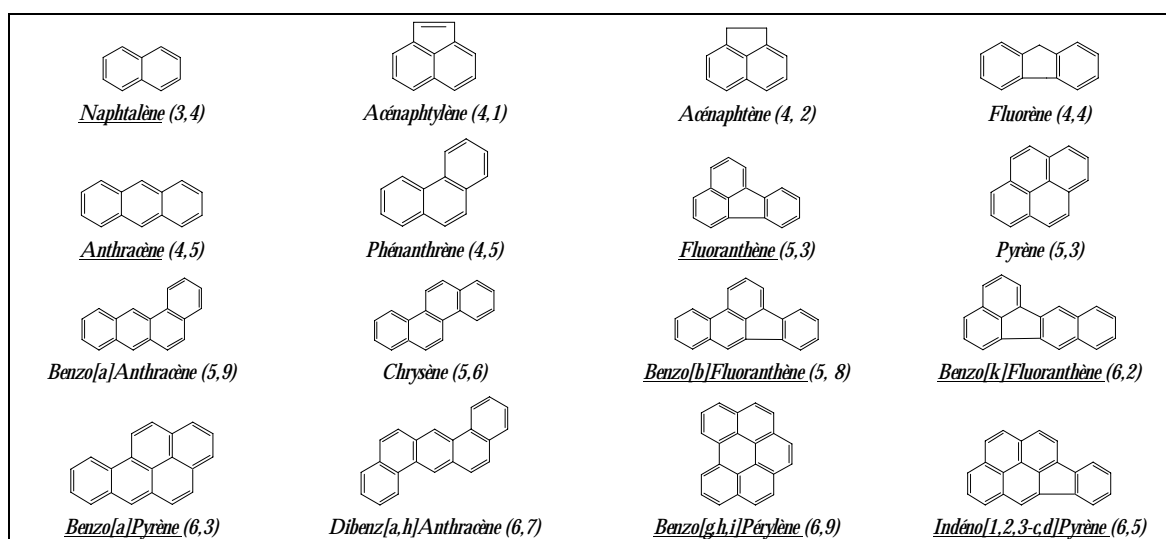


Tableau 3: les 16 HAP prioritaires définis par l'USEPA ($\log K_{OW}$). Souligné : molécules citées explicitement dans la liste des substances prioritaires de la DCE 2000/60/CE sur l'eau

Origines

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) peuvent avoir plusieurs origines, naturelles ou anthropiques (Neff, 1979). Ils sont principalement générés par la combustion incomplète de la matière organique (origine pyrolytique). Ils sont ainsi formés lors des feux de forêts (naturels ou brûlage volontaire) et de la combustion des produits pétroliers, du charbon, du bois. Les HAP sont aussi présents dans le pétrole brut (origine pétrolière). Dans ce cas, ils sont diffusés dans l'environnement lors de fuites de pétrole lors du transport routier et fluvial.

La généralisation de la combustion des produits pétroliers fait que les HAP constituent une pollution semi-diffuse de l'environnement. Ils sont prédominants dans les zones urbaines où se concentrent les usages de produits pétroliers (automobiles, industrie, chauffage).

Citons encore certaines sources très minoritaires mais importantes pour leur impact sur la santé humaine comme la fumée de cigarettes ou la fumaison des aliments.

1.1.3.2 Mécanisme de toxicité des HAP

En raison de leur caractère lipophile, les HAP s'accumulent dans les organismes vivants, préférentiellement dans les tissus lipidiques. La plupart des organismes ont la capacité de métaboliser les HAP par action de l'enzyme cytochrome P450 (Varanasi, 1989 ; Luch et al., 2002). La re-mobilisation des HAP métabolisés permet leur excrétion de l'organisme mais aussi les rendent toxiques. En effet, les HAP deviennent toxiques principalement lorsque les métabolites hydrophiles se fixent sur les structures cellulaires (protéines, ADN). La modification de l'ADN induit alors des effets cancérogènes et mutagènes (Baird et al., 2002).

D'autre part, les HAP sont photodégradables, ce qui peut aussi induire une photo-toxicité. Certains HAP sont particulièrement photo-toxiques sous lumière UV (Clément et al., 2000 ; Bleeker et al., 2002).

1.1.3.3 Les HAP dans le milieu aquatique

La multiplicité des sources fait que les HAP sont présents dans tous les compartiments de l'environnement : air, eau, sols. Le milieu aquatique constitue le réceptacle privilégié des HAP qui l'atteignent par la pluie, le ruissellement et le lessivage des routes. En 1979, on estimait à 230 000 tonnes la quantité de HAP atteignant chaque année le milieu aquatique (Neff, 1979). Les concentrations sont très variables selon les milieux et les HAP considérés, les plus légers ayant des teneurs de l'ordre du $\mu\text{g/L}$ alors que les plus lourds de l'ordre du ng/L .

De plus, en raison de leur hydrophobie, les HAP se fixent préférentiellement sur les particules et se concentrent dans les sédiments (concentrations en HAP du $\mu\text{g/kg}$ au mg/kg). Ce phénomène est d'autant plus accentué que les HAP sont lourds et hydrophobes et que les HAP sont souvent déjà fixés sur des particules au moment de leur émission (particules dans les fumées d'échappement par exemple).

Normes pour les HAP dans les milieux aquatiques

En Europe, les seuils de concentrations en HAP dans l'eau potable sont de 100 ng/L pour la somme de tous les HAP, et de 10 ng/L pour le benzo[a]pyrène (BaP). L'Organisation Mondiale pour la Santé définit les limites pour l'eau potable à 5 $\mu\text{g/l}$ pour le fluoranthène et 0,7 $\mu\text{g/L}$ pour le BaP.

En France, seuls six HAP sont recherchés dans les milieux aquatiques : le fluoranthène, le benzo[a]pyrène, le benzo[k]fluoranthène, le benzo[k]fluoranthène, le benzo[g,h,i]pérylène et l'indéno[1,2,3-c,d]pyrène. Dans le cadre de la mise en place des Seuils d'Evaluation de la Qualité physico-chimique des eaux (SEQ-eau), des normes pour les HAP ont été définies pour pouvoir déterminer l'état chimique de l'eau. Ainsi, les concentrations en HAP (entre autres) sont prises en compte pour le classement des cours d'eau selon leur « aptitude à la biologie » (i.e capacité des milieux à permettre l'équilibre biologique). Pour un classement en zone « jaune » au moins (qualité moyenne), les teneurs en BaP dans l'eau brute ne doivent pas dépasser 80 ng/L . Pour un

classement en zone « bleue », (très bonne qualité), les normes sur chaque HAP de trois cycles au moins sont inférieures à 25 ng/L, et inférieures à 0,03 ng/l pour le BaP (Agences de l'eau, 1999).

1.2 Biodisponibilité des polluants organiques hydrophobes dans l'eau

1.2.1 Comment mesurer la biodisponibilité ?

La notion de biodisponibilité se situe à l'interface entre le milieu et l'organisme. Elle dépend à la fois du polluant, de son devenir dans l'environnement et de la physiologie de l'organisme exposé (Figure 1). On peut distinguer trois manières complémentaires d'estimer la biodisponibilité d'un polluant :

- l'une, chimique, consiste à estimer la répartition du contaminant dans le milieu (« spéciation » pour les métaux) et à faire une hypothèse de biodisponibilité sur chacune des formes chimiques que prend le contaminant.
- La seconde, biologique, consiste à mesurer la concentration en polluant accumulé dans un organisme au cours de l'exposition. La bioaccumulation reflète la concentration biodisponible dans le milieu.
- La troisième, biologique, consiste en la mesure de la réponse toxique d'un organisme (ou d'une population) à une exposition. Cette réponse biologique est alors le reflet de la concentration biodisponible du polluant. Selon le mode d'action et la quantité de polluant dans le milieu, deux formes de toxicité peuvent être observées : *la toxicité aiguë* conduit à une mortalité des organismes. Le réponse mesurée est le pourcentage d'organismes tués ou immobilisés dans le milieu. Le couple « milieu/ effet » est donc résumé par une concentration létale (CL) à x% après une exposition de durée déterminée (par exemple CL₅₀(48h) comme indiqué dans le Tableau 2). Les organismes utilisés sont le plus souvent des invertébrés. La *toxicité chronique* conduit à des effets à plus long terme. Elle est évaluée par différentes mesures d'effets (reproduction, déformations, retard de croissance...) adaptés selon les organismes étudiés.

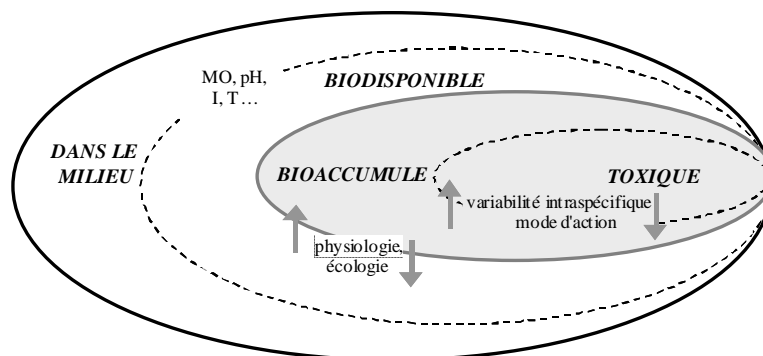


Figure 1 : relation schématique entre la biodisponibilité, l'accumulation et la toxicité d'un contaminant dans l'environnement.

Selon la mesure effectuée, l'estimation de la biodisponibilité intègre plus ou moins de facteurs de variabilité. Ainsi, la mesure chimique de spéciation sera plus précise car elle ne tient pas compte

de la variabilité liée à l'organisme. Le biotest à l'inverse permet d'avoir une meilleure estimation du risque réel lié au polluant car il intègre tous les facteurs environnementaux et biologiques (physiologie, réponse interne), mais est aussi beaucoup plus variable et difficile à interpréter.

De plus, selon le mode d'action toxique du polluant, les effets aigus sont visibles ou non à de faibles concentrations environnementales (Rand et al., 1995). Ainsi, s'il est possible d'observer une réduction de la croissance algale en présence de cuivre à des concentrations dans le milieu très faibles (Seidl et al., 1998), la toxicité aiguë des HAP est rarement observable dans les milieux aquatiques en deçà de leur solubilité, car ces molécules ont principalement des effets cancérigènes et mutagènes de long terme. Pour ces molécules, il faut envisager des mesures d'effets plus sensibles, ou une estimation de la biodisponibilité par la bioaccumulation.

1.2.2 Mesures de la bioaccumulation

1.2.2.1 Voies d'accumulation dans un organisme

Afin de comprendre les facteurs qui gouvernent la biodisponibilité d'un polluant pour un organisme, il est important de comprendre comment ce polluant peut pénétrer dans l'organisme. Les modes d'accumulation pour les POH sont divers :

- Respiration. Beaucoup d'organismes aquatiques respirent par un mécanisme de filtration de l'eau à travers les branchies. L'oxygène dissous est alors retenu. Les molécules de poids moléculaire inférieur à 600 D peuvent aussi traverser par diffusion la membrane des branchies (Björk, 1995). Les polluants organiques dissous dans l'eau peuvent donc pénétrer dans l'organisme ainsi et être ensuite absorbés sur les tissus
- Diffusion passive à travers les membranes biologiques. En comparant l'accumulation d'un PCB et d'un HAP chez les daphnies mortes et vivantes, Granier et al. (1999) montrent que cette voie est négligeable : la bioaccumulation chez les organismes morts est très faible et représente environ 6% de la bioaccumulation dans les daphnies vivantes. En revanche, cette voie d'accumulation est principale pour les micro-organismes : Weber et al. (1983) montrent que les algues ou les bactéries mortes et vivantes accumulent à peu près autant de HAP.

Diffusion passive et respiration sont des modes d'accumulation dits « par contact ». Dans ce cas, la bioaccumulation est appelée *bioconcentration*.

- Ingestion : La plupart des organismes aquatiques se nourrissent par ingestion de matière organique (MO) en suspension dans l'eau, ou dans les sédiments (herbivores, détritivores, bactériovores...). Les POH fixés sur la MO sont alors aussi ingérés. Le polluant ingéré sera en partie assimilé et pourra être retenu dans les tissus de l'organisme (Penry, 1998). Cette voie d'accumulation est importante pour les organismes benthiques (Lotufo, 1998; Leppanen et Kukkonen, 2000) qui ingèrent les sédiments contaminés ou les organismes filtreurs tels que les bivalves (Björk, 1995; Baumard et al., 1999).
- Bioamplification : les polluants persistants qui ne sont pas métabolisés sont stockés dans les réserves lipidiques des animaux et sont transmis le long de la chaîne alimentaire ; la concentration dans les organismes augmente donc avec leur niveau trophique. Pour les polluants les plus persistants et faiblement métabolisés (cas des PCB et des dioxines par

exemple), cette voie d'accumulation est prédominante chez les animaux aquatiques supérieurs (Mackay, 1994).

1.2.2.2 Approche cinétique ou étude à l'équilibre

La capacité d'accumulation d'un polluant dans un organisme peut s'exprimer par l'estimation du facteur de bioaccumulation (Bioaccumulation Factor, *BAF*), ou facteur de bioconcentration (*BCF*) quand l'organisme est seulement exposé au polluant par contact et respiration. Il est défini comme le rapport des concentrations en polluant dans l'organisme et dans le milieu d'exposition, quand l'équilibre entre organisme et milieu est atteint :

$$BAF = \frac{\text{concentration dans l'organisme (g/g)}}{\text{concentration dans le milieu d'exposition (g/L)}} \quad \text{Equ. 1}$$

Pour la mesure du *BAF* d'un polluant, la durée de l'exposition est fondamentale. De nombreuses études limitent l'exposition à 24 h (Kukkonen et al., 1990; Garnier et al., 1998; Akkanen et Kukkonen, 2003) afin de pouvoir observer l'accumulation dans l'organisme sans avoir besoin de le nourrir et tout en limitant les perturbations physiologiques liées au jeûne. Pour certains organismes et contaminants cependant, 24 h ne suffisent pas pour atteindre un équilibre (par exemple la bioaccumulation des HAP par des poissons, (McCarthy et Jimenez, 1985) ou par les œufs et larves de poissons, (Petersen et Kristensen, 1998). Pour les expériences de plusieurs jours, il est souvent nécessaire de nourrir les organismes, ce qui implique de modifier l'environnement (en particulier d'introduire de la MO dans le milieu), et par conséquent de modifier la biodisponibilité du polluant.

L'approche cinétique de la bioaccumulation permet de s'affranchir de la contrainte de l'équilibre. Divers modèles peuvent décrire la bioaccumulation des contaminants dans les organismes vivants (Newman, 1995). Dans le modèle le plus simple, l'organisme est considéré comme un seul compartiment, l'accumulation est du premier ordre (taux d'accumulation k_u) et les phénomènes de métabolisation et d'excrétion décrits comme une simple élimination du contaminant (taux d'élimination k_d).

$$\frac{dC_{org}}{dt} = k_u C_{eau} - k_d C_{org} \quad \text{Equ. 2}$$

avec C_{org} la concentration dans l'organisme (généralement en ng/g)

C_{eau} la concentration biodisponible du POH dans l'eau (généralement en ng/L)

Les hypothèses implicites sont celles de la linéarité des processus d'accumulation et d'élimination et l'homogénéité/unicité du compartiment accumulateur dans l'organisme. Ce modèle est couramment utilisé pour décrire l'accumulation de POH dans divers organismes : poissons (McCarthy et Jimenez, 1985), daphnies (Nikkilä et Kukkonen, 2001; Akkanen et Kukkonen, 2003), ou encore larves de poissons (Petersen et Kristensen, 1998).

A l'équilibre, on a alors :

$$\frac{C_{org}}{C_{eau}} = BAF = \frac{k_u}{k_d} \quad \text{Equ. 3}$$

Il est donc possible, par le suivi de la bioaccumulation de déterminer les constantes k_u et k_d et d'obtenir une valeur de *BAF*. Cette méthode pour déterminer le *BAF* requiert cependant le choix d'un modèle toxico-cinétique d'accumulation, et donc une hypothèse sur la cinétique de

bioaccumulation. Il est donc nécessaire au préalable de trouver le modèle de toxico-cinétique adapté à l'organisme étudié.

Néanmoins, Nikkilä et Kukkonen (2001) montrent la bonne concordance pour les daphnies des estimations de facteurs de bioconcentration (BCF) à partir des teneurs à équilibre et à partir du suivi de la cinétique en supposant un modèle du 1^{er} ordre (Equ. 2)

1.2.2.3 Quelques difficultés pour la mesure de la bioaccumulation

Métabolisation des POHs

Les organismes peuvent avoir la capacité de métaboliser le polluant accumulé, afin de l'excréter. Très schématiquement la métabolisation des polluants organiques hydrophobes consiste en une hydrolyse enzymatique de la molécule, la rendant plus soluble, ce qui permet de l'éliminer via la bile et les urines (Krahn et al., 1984; Ruddock et al., 2002). La capacité de métabolisation varie très largement d'un organisme à l'autre (Driscoll et McElroy, 1996). Les mécanismes enzymatiques mis en jeu sont complexes et spécifiques à la fois aux groupes d'organismes et aux types de polluants (Varanasi, 1989).

La mesure de la bioaccumulation dans un organisme peut être affectée par sa capacité à métaboliser le polluant. En effet, selon les méthodes analytiques employées pour mesurer la bioaccumulation, ce phénomène est ou non pris en compte. Ainsi, les mesures « classiques » des polluants organiques dans l'organisme (extraction puis analyse par chromatographie) ne mesurent en général pas la quantité de polluant qui a subi une transformation dans l'organisme. En revanche, l'étude de la bioaccumulation par marquage radioactif des molécules tient compte de l'ensemble des molécules dans l'organisme, ayant subi ou non une métabolisation. Selon la méthode employée, les valeurs de bioaccumulation pourront donc largement varier.

De plus, si le polluant est rapidement métabolisé et excrété, les concentrations dans les organismes ne reflètent que partiellement l'exposition et la biodisponibilité. *In situ* en particulier, où les durées d'exposition ne sont pas connues, on peut observer une très grande variabilité d'accumulation selon l'organisme-cible étudié (Ruddock et al., 2002).

Rendement d'extraction

La mesure d'une concentration en un POH dans un organisme est liée au protocole utilisé pour l'extraction du composé et à sa détection par l'appareil de mesure. A l'exception de l'utilisation de traceurs radioactifs, dont la mesure peut être très bien contrôlée, il n'est pas possible théoriquement de connaître la vraie contamination, mais uniquement la concentration en polluants extractibles et mesurables par la méthode de traitement de l'échantillon utilisée. Les différences entre les protocoles d'analyses doivent être prises en compte lorsque plusieurs données de bioaccumulation sont comparées alors qu'elles n'ont pas été obtenues avec les mêmes méthodes.

Aujourd'hui, la mise au point de matrices de référence environnementales, et notamment biologiques (Chambers et al., 1996 ; Wise, 2002) permet de mieux approcher la représentativité des mesures faites, mais ces techniques ne sont pas encore utilisées en routine.

2 COMMENT CARACTERISER LA MATIERE ORGANIQUE ?

De par sa nature très variable, il est difficile de fournir une « carte d'identité » de la matière organique (MO) d'un milieu aquatique. Les méthodes de caractérisation de la matière organique sont diverses, et dépendent de l'objectif de l'étude. Ainsi, la matière organique sera plutôt étudiée du point de vue de sa biodégradabilité et/ou de sa composition moléculaire quand il s'agit de comprendre le fonctionnement écologique et dynamique de l'écosystème. Quand on s'intéresse à ses propriétés d'adsorption des polluants, les approches physico-chimiques de caractérisation sont privilégiées. Les relations qui peuvent exister entre les différentes voies d'études de la matière organique ne sont pas du tout évidentes et encore peu analysées.

Dans ce paragraphe sont présentées les principales méthodes d'analyse utilisées couramment dans les études environnementales pour caractériser la matière organique des milieux aquatiques. Nous tentons aussi d'évaluer les relations possibles entre les informations fournies par chaque type de méthode.

On distingue de façon pratique entre la matière organique particulaire (MOP) et la matière organique dissoute (MOD) par une filtration, communément à 0,7 μm ou 0,45 μm . Il convient donc de noter que la MOD contient principalement de petites particules (ou colloïdes).

2.1 Concentration en matière organique

La quantification de la MO dans le milieu aquatique se fait par la mesure des concentrations en carbone organique. Selon l'échantillon, on mesure le carbone organique total (COT, échantillon liquide brut), le carbone organique particulaire (COP, analyse du filtre) ou le carbone organique dissous (COD, échantillon après filtration)

Les concentrations en COD varient entre 0,1 mgC/L dans les eaux souterraines les moins concentrées, et jusqu'à plusieurs centaines de mgC/L dans les eaux usées brutes, en encore 50-100 mgC/L dans les tourbières. Dans les eaux de surface, le COD se situe généralement entre 2 et 10 mgC/L, pouvant aller jusqu'à 20 mgC/L dans les lacs forestiers (Peuravuori et Pihlaja, 1997). Pour un milieu donné, les concentrations sont très variables selon la saison et les conditions hydrologiques du milieu.

Les teneurs en COP sont encore plus variables selon la nature du milieu et la dynamique d'apport des particules et de re-suspension des sédiments. D'après Thurman (1984), le COP représente en général moins de 10 % du COT en rivière. Meybeck (1982) mesure des rapports entre COP et COT de 10% à 90% dans différentes rivières du monde. Dans les lacs, le COP représente aussi environ 10% du COT, mais cette fraction peut aller jusqu'à 50% en période forte poussée algale ou bactérienne (Wetzel, 1983).

Une estimation alternative des concentrations en MO est la mesure de la Demande Chimique en Oxygène (DCO) (norme NF T 90-101, Agence Française de Normalisation, 2001), qui correspond à la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder le carbone organique. Dans un milieu

donné, de très fortes corrélations entre DCO et carbone organique sont possibles, mais ces corrélations sont susceptibles de varier selon la nature de la matière organique. Cette estimation indirecte simple de la concentration en MO est largement utilisée par les industriels, traiteurs d'eau et gestionnaires du milieu aquatique.

2.2 Fractionnement physico-chimique de la matière organique

2.2.1 Selon la taille des molécules

Filtration et ultrafiltration

Outre la filtration qui permet de différencier la fraction particulaire de la fraction « dissoute », il est possible de séparer par filtrations successives les fractions de MO selon leur taille. Cette méthode permet d'obtenir une répartition discrète de la taille des particules (Buffle et al., 1992). Elle est utilisée pour caractériser la taille des particules de nombreux milieux aquatiques naturels : par exemple de lacs (Oikari et Kukkonen, 1990 ; Peuravuori et Pihlaja, 1997), de rivières (Guo et al., 2003) ou encore d'eau interstitielle de sédiments (Burdige et Gardner, 1998). Elle est aussi applicable sur des eaux plus chargées, comme les eaux usées (Vaillant et al., 1999).

Chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique permet d'obtenir la répartition « continue » des molécules dans l'échantillon selon leur taille (exprimée en poids moléculaire rapporté à une molécule modèle). De cette répartition, on peut extraire :

- le poids moléculaire moyen en nombre de molécules (M_n)
- le poids moléculaire moyen en taille (M_w)
- la « polydispersité » (M_w/M_n) qui fournit une idée de l'hétérogénéité de taille du pool de MO considéré.

Pour les eaux naturelles, le poids moléculaire moyen est très variable : Chin et al. (1997) mesurent les poids moléculaires moyens M_w de diverses eaux naturelles et substances humiques entre 585 et 2200 Daltons. Ravelet et al. (en préparation) utilisent diverses matières organiques naturelles de M_w entre 780 (MOD extraite de la Loire) et 1500 D (MOD extraite de la rivière Gartempe en Charentes). Imai et al. (2001) mesurent que les poids moléculaires moyens M_w de MOD d'effluents de différentes STEP sont entre 380 et 830 D ; la polydispersité de ces MOD est entre 1,4 et 2,3.

2.2.2 Selon l'hydrophobie et l'acidité

Le fractionnement de la MOD selon ses caractéristiques d'hydrophobie est basé sur le passage de la solution sur des résines retenant de façon sélective certains composants de la MO (Leenheer, 1981). Le protocole le plus couramment utilisé est celui de l'IHSS (International Humic Substances Society) (Leenheer et al., 2000) qui consiste en un fractionnement de la MO sur des colonnes contenant des résines de type XAD. La fraction hydrophobe de la MO est retenue sur la résine XAD 8, la fraction dite « transphilique » est retenue sur la résine XAD 4 et la fraction

hydrophile traverse les deux colonnes. Chaque fraction peut ensuite être séparée selon son acidité par élution sélective.

De façon opérationnelle, on définit la fraction hydrophobe retenue sur la résine XAD 8 comme les substances humiques. Elles peuvent être divisées en deux types selon leur acidité : les acides humiques sont précipités à pH 2 alors que les acides fulviques restent solubles. Théoriquement, les substances humiques correspondent aux molécules stables issues du vieillissement de la matière organique. Elles sont responsables de la coloration des eaux. Elles représentent entre 40 et 60 % de la matière organique naturelle dans les rivières et les lacs (Wetzel, 1983; Thurman, 1984).

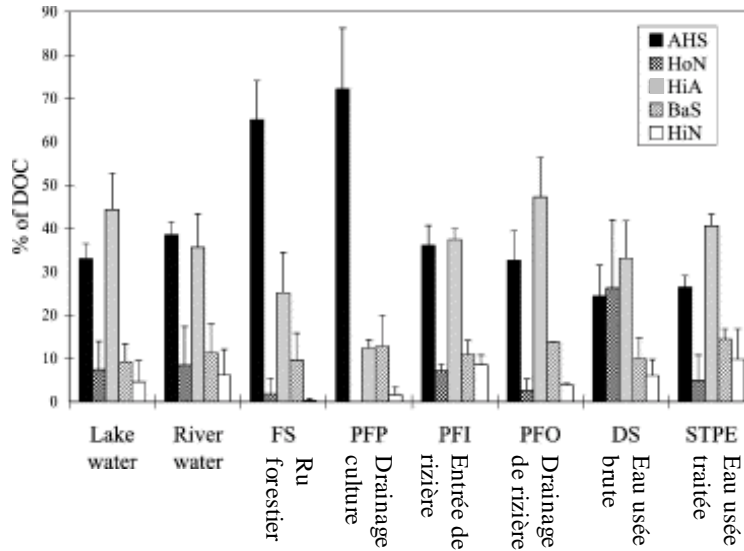


Figure 2 : Fractionnement de MOD d'origine variée (source : Imai et al., 2001). AHS : substances humiques, HoN : neutres hydrophobes, HiA : acides hydrophiles, BaS : bases (hydrophiles et hydrophobes), HiN : Neutres hydrophiles.

La Figure 2 illustre la grande variabilité de fractionnement de la MOD par ce critère selon son origine. Les substances humiques (27-78%) et les acides hydrophiles (15-50%) représentent les fractions majoritaires.

| Fractions | Types de composés |
|---------------------|--|
| Acides hydrophobes | Acide fulviques (solubles à pH 2) Acides Humiques (précipitent à pH 2) |
| Neutres Hydrophobes | Hydrocarbures, détergents, pigments (dont chlorophylle.) acides carboxyliques, esters, cétones, aldéhydes et alcools à longues chaîne aliphatique (>C ₅), |
| Bases hydrophobes | Amines aromatiques, protéines. |
| Acides hydrophiles | Sucres, acides aminés, acides carboxyliques courts (<C ₅) |
| Neutres hydrophiles | Oligosaccharides, polysaccharides, carbohydrates esters, cétones, aldéhydes et alcools courts (<C ₅) |
| Bases hydrophiles | Amino-acides, aminosucres |

Tableau 4 : Composés dans chaque fraction de MOD (Barber et al., 2001; Imai et al., 2001)

Notons qu'il peut exister différentes variantes de ce protocole, en fonction de la nature et du nombre de colonnes utilisées (par exemple Martin-Mousset et al., 1997; Namour et Müller, 1998; Ma et al., 2001).

Le Tableau 4, issu des données de Imai et al. (2001) et Barber et al. (2001), indique les principaux types de composés présents dans les fractions de MO séparées selon ce protocole.

2.3 Caractérisation chimique

2.3.1 Analyse élémentaire.

L'analyse élémentaire de la matière organique permet d'obtenir sa composition relative en C, H, O, N, et S et cendres minérales. Cette mesure fournit des informations sur la nature saturée et polaire de la MO : la polarité de la MO peut être évaluée par le rapport (N+O)/C ou encore H/O et la saturation des chaînes de carbone (traduisant un caractère aromatique) s'estime via les rapports O/C et C/H.

Ainsi, Ma et al. (2001) observent que le ratio H/C est de l'ordre de 1 pour les acides humiques hydrophobes, et de 1,5 pour les acides hydrophiles. De même, le rapport O/C est deux fois plus élevé pour les molécules hydrophiles que pour les substances humiques, traduisant le caractère aromatique insaturé de celles-ci.

2.3.2 Analyses chimiques.

Analyse moléculaire

Plusieurs composés ou groupes de composés sont identifiables dans l'ensemble de la MO. Par exemple, les protéines, les polysaccharides, les lipides, sont quantifiables par des dosages colorimétriques, ou des hydrolyses. Cependant, selon les milieux étudiés et les protocoles employés, l'ensemble de la caractérisation moléculaire chimique de la MO permet de caractériser entre 30 et 90 % de l'ensemble de la MO. Une très grande proportion de la MO naturelle reste « irrésolue » par analyse chimique et cette proportion augmente avec l'âge et le degré de biodégradation et de transformation de la MO (Hedges et al., 2000).

Les techniques chimiques de caractérisation moléculaire sont encore aujourd'hui en cours d'étude. Notons par exemple les méthodes de pyrolyse couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse ; ces techniques très précises mais aussi très lourdes à mettre en œuvre, permettent d'étudier la composition moléculaire de la MO pour des composés à très haut poids moléculaire (Dignac, 1998).

Analyse fonctionnelle

Par dosage colorimétrique simple, il est possible de mesurer les concentrations en Carbone constituant des groupes fonctionnels phénoliques et carboxyliques de la MOD (Akkanen et al., 2001).

Les groupes carboxyliques se retrouvent dans 90% de la matière organique naturelle. Ils sont très liés au caractère acide et soluble de la MO (Thurman, 1984). Les groupes phénoliques traduisent un degré de vieillissement et d'humification de la MO.

2.4 Méthodes spectroscopiques

2.4.1 Spectres infrarouge et ^{13}C -MNR

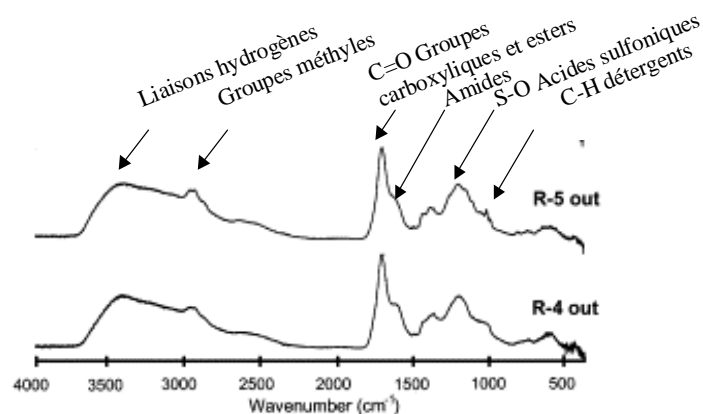


Figure 3 : Spectres infrarouge de substances humiques extraites d'une station de lagunage (source : Quanrud et al., 2004)

L'interprétation du spectre infra-rouge de la solution de MO permet d'obtenir des informations intéressantes sur la présence de certains groupes fonctionnels de la MO (Aiken et al., 1985), comme le montre la Figure 3.

Le spectre de Résonance Magnétique Nucléaire du ^{13}C (RMN- ^{13}C) fournit des informations sur la structure et la conformation des molécules, et sur la nature des atomes de carbone dans le pool de MO. Cette méthode est plus précise que la spectroscopie infrarouge, mais plus difficile à mettre en œuvre. Le Tableau 5 résume les zones du spectre de RMN- ^{13}C associées à chaque type d'atome de carbone. En particulier, l'intégration de certaines parties de spectre permet d'évaluer quantitativement la fraction aromatique ou la fraction aliphatique.

| Région (ppm) | Molécules impliquées |
|--------------|---|
| 0-50 | Carbones alkylés et aliphatiques |
| 50-70 | Alcool, carbohydrates, protéines |
| 90-110 | Carbohydrates, sucres |
| 110-160 | Carbones aromatiques, oléfiniques |
| 160-190 | Groups carboxyliques, ester et amides Acides humiques, protéines |
| 190-220 | Acides humiques, cétones, aldéhydes |

Tableau 5 : Localisation des pics de Résonance Magnétique Nucléaire du ^{13}C pour l'analyse de la matière organique (source : Aiken et al., 1985)

2.4.2 Mesures d'absorption de lumière

La mesure de l'absorption (ou absorbance) d'une solution permet aussi de recueillir des informations sur la conformation de la MOD présente. L'absorbance spécifique, qui est la

normalisation de la mesure d'absorbance par la teneur en carbone organique de la solution, est un paramètre « intensif » (indépendant de la quantité) de qualité de la MO.

En particulier, l'absorption dans l'UV est liée à l'existence des transitions π - π' dans les cycles benzéniques et plusieurs polyènes et est donc reliée à l'aromaticité des MO (Traina et al., 1990). L'absorption UV est la mesure d'absorption la plus courante pour la caractérisation de la MO. Le caractère aromatique de la MO est ainsi estimé par la mesure de l'absorbance spécifique (souvent noté SUVA, Specific UV Absorbance). La longueur d'onde utilisée se situe dans la gamme 254-280 nm.

L'absorption des solutions de MO dans le visible est aussi parfois étudiée. Chen et al (1977) ont montré que le degré d'humification de la MOD pouvait être estimé par le rapport des absorbances E_{465}/E_{665} . Cependant, cet indicateur est surtout valide pour les matières organiques des sols et plusieurs études récentes montrent le manque de relation claire entre ce rapport d'absorbance et le degré d'humification de la MOD aquatique (Peuravuori et Pihlaja, 1997; Chen et al., 2002).

Aujourd'hui la mesure de SUVA est utilisée en routine pour l'estimation simple et rapide de l'aromaticité de la MO (Leenheer et Croué, 2003).

2.4.3 Mesure de la fluorescence « 3D ».

Il s'agit de mesurer les spectres d'émission pour toute une série de longueurs d'ondes d'excitation. On obtient donc un spectre en 3D (Coble et al., 1990). Les substances humiques sont principalement étudiées avec cette méthode

La fluorescence apparaît par excitation des électrons sur les doubles liaisons et est donc due surtout aux sites aromatiques des composés. L'interprétation des spectres obtenus reste difficile. On distingue principalement deux types de chromophores : les substances de type humique et de type protéique (Marhaba et al., 2000). Cette méthode est encore à l'état de recherche. Son principal intérêt par rapport aux mesures d'absorbance est sa sensibilité, ce qui peut expliquer qu'elle ait été appliquée à l'origine à la matière organique marine et côtière (Coble, 1996), qui sont des milieux faiblement concentrés en MOD.

2.4.4 Relation entre les méthodes physico-chimiques de caractérisation de la matière organique

Les indicateurs globaux tels que le SUVA, l'analyse élémentaire ou le poids moléculaire fournissent des informations souvent corrélées et liées au caractère hydrophobe et/ou acide des MOD. Ainsi, certains grands traits peuvent être synthétisés :

- le poids moléculaire de la MO est corrélé à l'aromaticité mesurée par SUVA ou par spectroscopie, comme l'observent Imai et al. (2002) sur des effluents de STEP, et Chin et al. (1997) ou Peuravuori et Pihlaja (1997) sur des substances humiques. Ainsi, les molécules plus aromatiques sont en général de plus grande taille.
- Les fractions hydrophobes (ou substances humiques) des MOD sont en général plus aromatiques que les autres composés de la MO. Kukkonen et Oikari (1991) montrent une

très bonne corrélation entre l'absorption spécifique à 280 nm et la fraction hydrophobe de la MOD à partir d'une vingtaine d'eaux de lacs. Imai et al. (2001) mesurent que les extraits hydrophobes des MOD de différentes origines (montrées sur la Figure 2) sont plus aromatiques que l'ensemble des MO à l'exception d'un échantillon d'eau souterraine.

- Les acides fulviques (substances humiques solubles à pH 2) sont de plus petite taille et en général moins aromatiques que les acides humiques issus du même pool de MOD (Chin et al., 1997; Haitzer et al., 1999).

L'aromaticité semble jouer un rôle clé pour la caractérisation des composés en particulier pour les substances humiques. De par sa simplicité, l'estimation du SUVA constitue le paramètre global pour l'aromaticité couramment employé, souvent aussi assimilé à une estimation indirecte du caractère humique des MO.

Il est en revanche difficile de relier les compositions moléculaires des MO à leurs caractéristiques chimiques macroscopiques. En effet, comme le montre Dignac (1998), les substances humiques sont surtout non déterminées par analyse moléculaire.

2.5 Biodégradabilité de la matière organique

La dynamique de la matière organique est un facteur fondamental du fonctionnement écologique d'un milieu aquatique ; la biodégradation microbienne des matières organiques du milieu est en effet, avec la photosynthèse, le processus clé du cycle du carbone dans l'écosystème.

2.5.1 Méthodes de mesure de la biodégradabilité

Analyse du carbone biodégradable et réfractaire.

La mesure de la fraction biodégradable de la matière organique la plus courante est la mesure de la Demande Biologique en Oxygène à cinq jours (DBO_5) (norme NF EN 1899-2, Agence Française de Normalisation, 1998). Elle consiste en la mesure de l'oxygène consommé dans un échantillon incubé pendant cinq jours. Elle permet d'avoir une estimation indirecte de la matière organique rapidement dégradable.

L'ensemble de la MO dégradable n'est cependant pas minéralisée en cinq jours. Servais et al. (1995) montrent que la biodégradation est à peu près complète en quarante-cinq jours de biodégradation. Ils proposent une méthode basée sur la mesure du carbone organique dans l'échantillon initial, puis après quarante-cinq jours d'incubation dans le noir en conditions oxiques (Servais et al., 1995) ou anoxiques (Tusseau-Vuillemin et al., 2003). Cette mesure permet de fractionner la MO en une partie biodégradable et une partie réfractaire.

Fractionnement théorique par classes de biodégradabilité.

Les besoins de gestion de la qualité de l'eau ont conduit au développement de modèles de dégradation de la MO dans différents milieux, basés sur la cinétique d'assimilation des matières organiques par la biomasse. Deux principaux types de modèles existent selon le milieu considéré :

- les modèles orientés sur la dynamique de la matière organique en station d'épuration, de type ASM (Activated Sludge Model), produits par l'International Water Association (IWA) (Henze et al., 1987 ; Henze et al., 1995 ; Gujer et al., 1999).
- les modèles orientés vers la description du fonctionnement écologique des cours d'eau, comme par exemple le modèle « HSB » (Billen et Servais, 1989).

Ces modèles sont basés sur la simulation de la croissance bactérienne comme moteur principal de la dégradation. Pour tous, la matière organique du milieu est divisée en fractions plus ou moins biodégradables dont une classe au moins pour la MO réfractaire, et une autre pour la biomasse bactérienne hétérotrophe. La matière organique n'est donc pas séparée selon des unités physiques ou chimiques, mais selon une unité fonctionnelle en rapport à la dynamique du carbone.

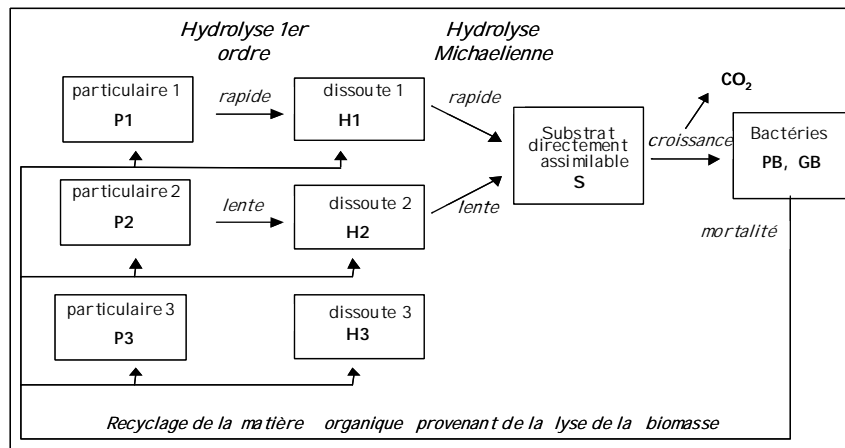


Figure 4 : schéma de principe du modèle de biodégradation de la matière organique HSB (Billen et Servais, 1989)

Pour le modèle ASM1 (Henze et al., 1987), la MO du milieu est fractionnée en quatre classes, (six pour le modèle ASM3). Pour le modèle de rivière HSB, neuf classes de MO sont définies, dont deux servent à décrire deux types de bactéries hétérotrophes. La Figure 4 schématise le processus de dégradation de la MO tel que simulé par le modèle HSB. La MO du milieu est divisée en quatre classes de MOD (S : substrat directement assimilable, H1, MOD rapidement biodégradable, H2, lentement biodégradable, et H3 réfractaire) et cinq classes de MOP (PB et GB deux types de biomasse vivante, P1, P2 et P3 les différentes MOP détritiques plus ou moins biodégradables).

Globalement, les particules biodégradables (P1 et P2) sont hydrolysées en MOD, elles-même hydrolysées en un substrat assimilable par les deux types de biomasse (« petites et grosses » bactéries). Enfin, la biomasse génère, par mortalité, un ensemble de MO recyclée dans les différents compartiments dissous et particulaires. Ce modèle comporte dix variables et trente deux paramètres Il a permis de décrire de façon correcte le fonctionnement de plusieurs milieux naturels et anthropisés (Meybeck et al., 1998).

Ce type de modèles peut aussi servir pour connaître le fractionnement selon les différentes classes de biodégradabilité d'un échantillon de MO donné (exemples pour ASM : Lagarde et al., soumis ; pour HSB : Mouchel et Dispan, 2003). Ce fractionnement est obtenu en effectuant le suivi contrôlé de la biodégradation de l'échantillon (en suivant en général l'oxygène dissous et le carbone organique ou la DCO) puis en calant le modèle décrivant la biodégradation afin de

retrouver théoriquement les conditions initiales qui caractérisent la dégradabilité de la matière organique étudiée.

Ainsi, comme illustré sur la Figure 5, le suivi en réacteur ouvert de la dégradation d'une eau usée (suivi du carbone, dissous, particulaire et de la consommation d'oxygène) permet d'estimer sa composition selon les différentes fractions d'un modèle de la famille ASM (Lagarde et al., soumis).

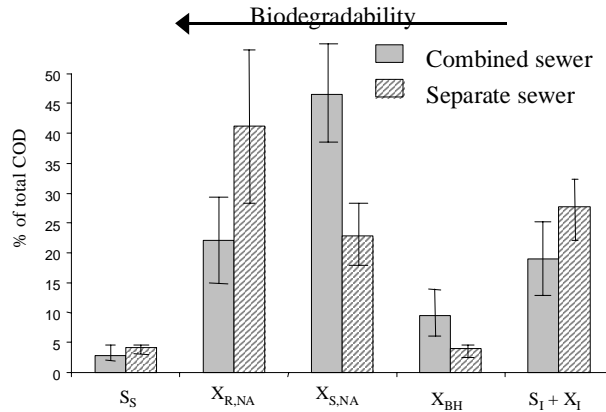


Figure 5 : fractionnement de deux eaux usées (réseau séparatif et réseau unitaire) en classes de biodégradabilité selon un modèle de la famille d'ASM (source : Lagarde et al., soumis)

2.5.2 Biodégradabilité et caractérisation physico-chimique de la matière organique

Les bactéries hétérotrophes assimilent uniquement les petites molécules simples (sucres, acides aminés...), qui sont aussi les plus solubles (Henze et al., 1987). C'est la raison pour laquelle les modèles de dégradation décrivent une fraction de substrat dite rapidement hydrolysable (ASM), ou assimilable (HSB). Les molécules plus complexes subissent une hydrolyse enzymatique plus ou moins longue afin d'être décomposées en structures plus simples pour l'assimilation par les bactéries (Henze et al., 1987; Billen et Servais, 1989). Les réactions enzymatiques sont principalement dues aux exoenzymes fixées sur les membranes des bactéries. Ainsi, les sites hydrophiles des MO seront vraisemblablement plus facilement en contact avec les exoenzymes en milieu aqueux alors que les macromolécules hydrophobes et/ou compactes seront plus résistantes à la biodégradation (Kalbitz et al., 2003). A contrario, l'humification de la matière organique est décrite comme un processus lent de dégradation et de vieillissement de la MO. Les substances humiques sont en général supposées être les produits réfractaires à la biodégradation (Aiken et al., 1985).

Cependant, si les processus moléculaires de dégradation sont bien compris, il reste difficile de les extrapoler à un ensemble complexe et non totalement défini qu'est le pool de matière organique d'un milieu. Expérimentalement, les analyses couplées de la matière organique aquatique (prise dans son ensemble) relatives à la biodégradabilité et à ses caractéristiques physico-chimiques restent peu nombreuses et sont le plus souvent réalisées sur des effluents urbains.

Biodégradabilité et fractionnement selon l'hydrophobie

Les effluents domestiques après traitement par boues activées contiennent des quantités très variables d'acides humiques (entre 5 et 30 % dans une étude de Imai et al., 2002), 40% chez Ma et al., 2001) et entre 40 et 60% chez Namour et Müller, 1998). Dans tous les cas, la fraction de substances humiques dans les rejets urbains est inférieure à la fraction observée en rivière (Ma et al., 2001 ; Imai et al., 2001).

En étudiant la composition en fractions hydrophobe et hydrophile de rejets de STEP « frais » et après vingt et un jours d'incubation, Namour et Müller (1998) observent une augmentation relative de la fraction des substances humiques après incubation. Initialement, les acides humiques représentent entre 40 et 60% de la MOD et cette fraction représente près de 70% de l'ensemble de la MOD réfractaire. Cette étude met aussi en évidence que les substances humiques telles que définies par l'IHSS sont partiellement biodégradables puisque les concentrations en acides humiques sont moindres après incubation (près de 50% de disparition).

Si une corrélation est possible entre l'hydrophobie et la biodégradabilité des effluents urbains, une telle relation n'a pas pu être observée au cours de l'étude de huit eaux de rivière (Martin-Mousset et al., 1997).

Biodégradation et indicateurs macroscopiques

Dignac (1998) en France, de même que Imai et al. (2001, 2002) au Japon observent que l'absorptivité dans l'UV des effluents de sortie de STEP est plus élevée que celle de l'eau usée brute, ce qui traduit une augmentation de l'aromaticité des effluents avec leur vieillissement. De même sur des milieux naturels, Hopkinson et al. (1998) observent aussi une anti-corrélation entre l'aromaticité de la MOD de rivière et sa biodégradabilité. A partir d'échantillons d'eau de rivière, Sun et al. (1997) ont mis en évidence la relation positive entre la biodégradabilité de la MOD et ses rapports élémentaires H/C (indicateur de la saturation des C de la MO) et O/C (indicateur de polarité).

Biodégradation et analyse moléculaire

Dignac (1998) montre que la fraction irrésolue par analyse chimique des eaux usées augmente après traitement. Si 55% de la MOD est identifiée en sucres, protéines, acides gras et volatils dans les eaux usées, cette fraction passe à seulement 22% pour l'eau traitée. De plus, la fraction non caractérisée est légèrement moins dégradée que les autres types de molécules au cours du traitement biologique.

3 INFLUENCE DE LA MATIERE ORGANIQUE SUR LA BIODISPONIBILITE DES POLLUANTS ORGANIQUES HYDROPHOBES

3.1 Interactions entre matière organique et polluants dans le milieu aquatique

D'une manière générale, la biodisponibilité d'un polluant dépend des formes chimique dans lesquelles il se trouve dans le milieu, ou des niveaux d'association qu'il a pu développer avec d'autres constituants du milieu, le rendant plus ou moins accessible aux organismes. Il est donc nécessaire de pouvoir décrire sous quelles formes le polluant se trouve dans le milieu.

En raison de leur hydrophobie, les POH sont évidemment peu enclins à demeurer sous forme dissoute libre dans l'eau, ils sont donc facilement adsorbés sur les différentes particules présentes (sédiments, matières en suspension), ou encore associés à des molécules organiques dissoutes lorsqu'ils restent en solution.

3.1.1 Modèles de partition

3.1.1.1 Partition eau-sédiment

Les premières études de répartition des POH dans le milieu aquatique ont été conduites dans les sédiments, où se concentrent la majorité des POH. Le plus simple des modèles proposés pour décrire les interactions entre particules et POH consiste à considérer que les polluants se partagent entre deux phases, l'eau et les sédiments. Dans un système à l'équilibre, on définit alors une constante de partage K_D :

$$K_D = \frac{C_s}{C_{eau}} \quad \text{Equ. 4}$$

où C_s : concentration en POH sur la phase solide mg/Kg,
 C_{eau} : concentration en POH dans la phase liquide mg/L.

Pour un même polluant et un seul type de particules, ce modèle est bien vérifié. En revanche, on observe une très grande variabilité selon les sédiments analysés (Figure 6). Pour Schwarzenbach et al. (1993), les POH non polaires ne se fixent pas sur les particules minérales, polaires, mais ont une plus forte tendance à se fixer sur les particules organiques, qui présentent des sites hydrophobes. Un moyen de mieux décrire les interactions entre particules et POH consiste donc à les rapporter à la teneur en MO des particules (exprimée en carbone organique), et de considérer le partage du polluant entre les sédiment et l'eau comme un équilibre de partage entre une phase aqueuse et une phase organique constituée par la MO des sédiments. On utilise donc

plus souvent le coefficient de partition K_{OC} qui résulte de la normalisation de K_D par rapport à la teneur en carbone organique du sédiment.

$$K_{OC} = \frac{K_D}{f_{OC}} \quad \text{Equ. 5}$$

K_{OC} : coefficient de partition eau/carbone organique L/Kg,

f_{OC} fraction de carbone organique des sédiments

Cette relation a permis de limiter une grande partie de la variabilité observée pour K_D , comme l'illustre la Figure 6 issue de Means et al. (1980). Cependant selon il reste une variabilité, qui peut être due à la nature de la MO présente dans les sédiments (Seth et al., 1999) ainsi qu'à la présence de matière organique dissoute dans l'eau interstitielle (McCarthy et Black, 1988; Lee et Kuo, 1999).

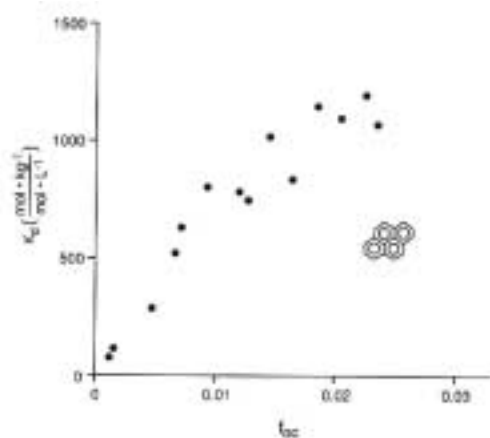


Figure 6 Constantes de partage K_D pour le pyrène selon la teneur en matière organique des sédiment ou des sols (d'après Means et al., 1980)

3.1.1.2 Partition eau-matière organique dissoute

Dans la colonne d'eau, comme pour les sédiments, il a été montré que la seule présence de particules en suspension ne pouvait pas rendre compte correctement de la répartition des POH. Pour les polluants très hydrophobes en particulier (McCarthy et Black, 1988) trois phases (1) particules organiques, (2) MO colloïdale ou dissoute, et (3) eau doivent être prises en considération (Sijm et al., 1995)

Ainsi pour un composé donné et un type de MOD, on peut définir le coefficient de partition K_{DOC} à l'équilibre de la fixation du POH sur le carbone organique dissous :

$$K_{DOC} = \frac{C_{MOD}}{C_{libre} \cdot [COD]} \quad \text{Equ. 6}$$

avec C_{MOD} concentration dans l'eau de POH fixés sur la MOD (en ng/L)

C_{libre} concentration dans l'eau de POH véritablement dissous (« libres ») (en ng/L)

$[COD]$ la quantité de matière organique (en kg C /L).

Ce modèle très simple peut être obtenu à partir de deux types d'hypothèses :

- soit en considérant la MOD comme une phase idéale dans laquelle le POH se partage (comme un solvant), K_{DOC} est alors le rapport entre la concentration dans une "phase" MOD, ($C_{MOD}/[COD]$) et la concentration dans l'eau
- soit en considérant la MOD comme porteuse de sites de fixation qui demeurent largement insaturés

3.1.1.3 Répartition dans le milieu

Dans un système multi-phase, les interactions entre MOD, MOP et les polluants peuvent être représentées par la Figure 7 ci-dessous : à l'équilibre, les interactions entre les différents compartiments sont représentées par des coefficients de partition (K_{DOC} pour la MOD et K_{POC} pour la MOP). D'un point de vue mécaniste, les interactions directes entre les différentes formes fixées (sur MOD et sur MOP) sont souvent négligées. McCarthy (1983) a observé que les interactions étaient effectivement négligeables pour le benzo[a]pyrène.

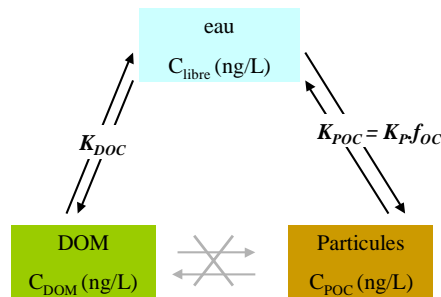


Figure 7 : schéma de répartition d'un POH dans l'environnement .

On a donc les concentrations du polluant dans l'eau sous formes libre (C_{libre}), dissoute fixée sur les MOD (C_{MOD}) et fixée sur les MOP (C_{MOP}) qui s'écrivent en fonction de la concentration totale dans le milieu C_{totale} :

$$\begin{aligned}
 C_{libre} &= \frac{C_{total}}{1 + K_{DOC}[COD] + K_{POC}[COP]} \\
 C_{MOD} &= \frac{C_{total} K_{DOC}[COD]}{1 + K_{DOC}[COD] + K_{POC}[COP]} \\
 C_{MOP} &= \frac{C_{total} K_{POC}[COP]}{1 + K_{DOC}[COD] + K_{POC}[COP]} \\
 C_{total} &= C_{libre} + C_{MOD} + C_{MOP}
 \end{aligned}
 \tag{Equ. 7}$$

Le modèle à trois phases peut être finalement généralisé en fractionnant chaque phase pour former n nouvelles phases (MO_i) (Suffet et al., 1994). Chaque classe de MO, de concentration $[CO_i]$ a une capacité à fixer les POH qui se traduit par une constante de partage K_r . Alors :

- chaque concentration en POH fixés sur la matière organique de type MO_i s'écrit :
- $$C_i = \frac{C_{total} K_{DOCi} [CO_i]}{1 + \sum K_{DOCi} [CO_i]}
 \tag{Equ. 8}$$

- la concentration en POH libre dans l'eau s'écrit :

$$C_{libre} = \frac{C_{total}}{1 + \sum K_{DOC,i} [CO_i]} \quad \text{Equ. 9}$$

- la constante de partage pour l'ensemble de la MO est la moyenne pondérée des $K_{DOC,i}$:

$$K_{DOC\ total} = \frac{\sum K_{DOC,i} [CO_i]}{\sum [CO_i]} \quad \text{Equ. 10}$$

Ce modèle a été vérifié par Kukkonen et al. (1990) après extraction et fractionnement de la matière organique en trois classes d'hydrophobie puis mesure du coefficient de partition K_{DOC} pour le benzo[a]pyrène et chaque fraction.

3.1.2 Détermination pratique des coefficients de partition

3.1.2.1 Modélisation

Les modèles d'évaluation du coefficient de partage sont les « *Linear-Free Energy Relationship* » (LFER). Ils sont fondés sur l'assertion que les propriétés structurales thermodynamiques des composés chimiques peuvent permettre de déterminer leur activité dans le milieu. Ainsi l'affinité d'un POH pour la matière organique peut s'évaluer à partir de ses propriétés telles que la solubilité ou K_{OW} . Par exemple : (Schwarzenbach et al., 1993) :

$$\log K_{CO(D)} = a \cdot \log K_{OW} + b \quad \text{Equ. 11}$$

a et b étant constants pour une classe de molécules donnée et une matière organique donnée. Théoriquement :

- a est le rapport des variations d'énergie libre des POH entre les formes fixée sur la matière organique et dans la phase octanol, et libre dans l'eau.

$$a = (G_{MO} - G_{dissous}) / (G_{octanol} - G_{dissous}) \quad \text{Equ. 12}$$

- b décrit l'affinité relative des POH pour la MO par rapport à l'octanol.

Pratiquement a et b sont estimés par régression linéaire pour un ensemble de POH de la même famille. Cette relation est très utilisée aujourd'hui dans les modèles écotoxicologiques. Seth et al. (1999) montrent la très grande variabilité autour de cette relation, due en grande partie à l'hétérogénéité de la matière organique qui n'est pas prise en compte ici.

3.1.2.2 Méthodes expérimentales

La détermination expérimentale des coefficients de partition K_{DOC} et K_{POC} est délicate, en particulier car il est nécessaire de pouvoir mesurer la quantité de polluant libre dissous dans l'eau d'une part, et la quantité de polluant fixé sur la matière organique d'autre part. Les méthodes de filtration sont en pratique peu applicables du fait de la présence de matières organiques colloïdales ou dissoutes non séparables.

Deux types de méthodes sont possibles : les méthodes d'extractions basées sur les techniques de séparation chimique, et les méthodes physiques qui n'influencent pas sur l'état du milieu.

Analyses chimiques

Les analyses chimiques pour évaluer les constantes de partition consistent à extraire du milieu les polluants dissous libres dans l'eau pour les mesurer (C_{libre}) et les comparer à l'ensemble des polluants du milieu (C_{total}).

- *Les extractions liquide-liquide* .

Les POH sont séparés et extraits avec un solvant organique. Selon le solvant utilisé, une fraction des molécules ou bien l'ensemble peut être extrait. Par exemple, Kukkonen et Pellinen (1994) utilisent le benzène pour extraire la fraction libre du benzo[a]pyrène alors que tout le composé est extrait de la solution avec des solvants plus efficaces (dichlorométhane par exemple).

- *Les extractions sur phase solide*

Elles consistent en l'échantillonnage sur une phase solide des polluants libres dans l'eau. Le choix de la phase et la vitesse de passage de la solution sont primordiales car la phase doit retenir uniquement les polluants libres. Une des plus anciennes méthodes est la séparation sur phase inverse (Landrum et al., 1984), qui consiste à faire passer la solution à travers un disque C-18 SepPak qui, sous réserve que la vitesse de percolation soit optimisée, retient uniquement les polluants dissous libres dans l'eau.

Ces dernières années ont été développées des échantillonneurs passifs pour la mesure des concentrations libres dans le milieu. Ainsi, la *Micro-Extraction en phase solide*: (SPME, Solid-Phase Micro-Extraction, Pörschmann et al., 1998) réalise l'échantillonnage des POH libres dans l'eau par une fibre très petite (1cm x 7 μ m de diamètre) enduite de polymères lipophiles plongée dans le milieu. La cinétique de la fixation est supposée grande devant celle de la fixation MO / POH, et la quantité de POH prélevés par la fibre assez faible pour que les équilibres ne soient pas modifiés (Freidig et al., 1998). Les membranes semi-perméables (Semi-Permeable Membrane Devices, Huckins et al., 1990) sont aussi des échantillonneurs passifs qui accumulent les POH dissous libres dans l'eau. Le dispositif est constitué d'un tube en polyéthylène contenant un lipide. La taille moyenne des pores de la membrane d'environ 10 Å implique une sélection par la taille des polluants accumulés : seuls les POH libres sont supposés traverser la membrane et être accumulés dans le dispositif.

Analyses physiques

- *Dialyse* (Kukkonen et Oikari, 1991)

Il s'agit de mettre dans une solution aqueuse de micro-polluant un « sac » de dialyse rempli d'une solution contenant les matières organiques. La membrane de dialyse (limite moléculaire d'environ 1000 Daltons) laisse passer uniquement les POH libres et est supposée retenir les MO. Après diffusion des POH et homogénéisation (durée de quelques jours), les concentrations en POH à l'extérieur du sac (POH libres uniquement) et à l'intérieur (POH dissous totaux) sont mesurées.

- *Extinction de fluorescence* (Gauthier et al., 1986)

La fluorescence des molécules est très dépendante de leur environnement direct. Pour les polluants organiques qui fluorescent dans l'eau, leur liaison à la MOD modifie leur propriétés de fluorescence ; en général, ceux-ci ne fluorescent plus. L'analyse de la réduction de l'intensité de fluorescence d'une solution par ajout de MOD permet d'évaluer la fraction de polluant fixé sur la MOD et d'estimer le coefficient de partage K_{DOC} . Cette méthode est rapide, puisque, l'équilibre

semble être atteint en quelques minutes après ajout de MOD (Schlautman et Morgan, 1993). Elle est néanmoins limitée aux molécules qui fluorescent (parmi lesquelles les HAP).

Notons enfin qu'il existe d'autres méthodes, moins employées, comme la complexation-flocculation (Laor et Rebhun, 1997) ou encore la mesure de l'augmentation de la solubilité apparente en présence de matière organique (Burnison, 1994).

Limites des méthodes de mesure

En mesurant K_{DOC} pour différents couples MOD-POH par cinq méthodes différentes, Kukkonen et Pellinen (1994) montrent des différences fortes qui peuvent aller jusqu'à un facteur douze selon la technique employée. Les méthodes chimiques basées sur des extractions (solides ou liquides) qui influent sur l'équilibre aboutissent à des estimations plus faibles de K_{DOC} que les méthodes physiques. Akkanen et Kukkonen (2003) confirment ces observations en comparant l'estimation de K_{DOC} par dialyse et par extractions solide et liquide. La principale raison réside dans le fait que les méthodes d'extraction sont susceptibles de briser certaines liaisons entre le POH et la MO, et par conséquent de surestimer la fraction réellement dissoute. A l'inverse, la méthode par dialyse nécessite une durée d'équilibre de quatre jours, ce qui peut favoriser les liaisons les plus lentes et/ou les plus faibles et par conséquent surestimer K_{DOC} .

Les différentes techniques expérimentales sont encore peu adaptées aux évaluations des constantes de partition directement dans les eaux naturelles. D'une part parce que les concentrations environnementales sont très faibles, ce qui implique des difficultés analytiques, et d'autre part parce que l'influence de facteurs environnementaux autres que la matière organique (température, turbulence...) est difficilement quantifiable (Zhou et al., 1999 ; Crunkilton et De Vita, 1997). Jusqu'alors, les estimations de K_{DOC} et de K_{POC} pour des matières organiques naturelles se font en laboratoire après dopage des solutions, soit en utilisant les eaux naturelles sans pré-concentration de la MO (Landrum et al., 1984 ; Backhus et Gschwend, 1990), soit après avoir extrait la MO et l'avoir re-dissoute en milieu contrôlé (Gauthier et al., 1987 ; Pörschmann et al., 1998 ; Kukkonen et al., 1990 ; Peuravuori, 2001).

3.1.3 Mécanismes de sorption

3.1.3.1 Association ou partition ?

Les constantes K_{DOC} et K_{POC} décrivent un équilibre de partage et non un mécanisme chimique unique. L'équilibre est une intégration de réactions physico-chimiques très variées et encore mal connues (Haitzer et al., 1998) : échange d'ions, transfert de charges, adsorption hydrophobe puis diffusion vers l'intérieur de la matière organique, liaisons covalentes, liaisons hydrogène... La contribution de chacune de ces interactions à la constante de partition n'est pas quantifiable du fait de la complexité et de la méconnaissance de la structure de la matière organique.

Un équilibre de partage entre POH et MO implique que K_{DOC} ou K_{POC} ne dépend pas des teneurs en POH ou en MO dans le milieu, ce qui a été vérifié dans de nombreux cas (revue dans Krop et al., 2001).

Récemment, cependant, Laor et Rebhun (2002) ont mis en évidence une non-linéarité de l'isotherme pour le pyrène, le fluoranthène et le phénanthrène, K_{DOC} décroissant avec la concentration en MOD, traduisant une saturation des sites. Les données obtenues dans cette expériences s'ajustent à un modèle Freundlich (Schwarzenbach et al., 1993) qui s'écrit :

$$C_{MOD} = K_F \cdot C_{libre}^n \quad \text{avec} \quad K_F : \text{coefficient de Freundlich} \quad \text{Equ. 13}$$

n : exposant traduisant la saturation

Cette équation présente l'intérêt de simuler la saturation des sites d'adsorption pour les fortes concentrations en polluant.

En pratique, la linéarité est le plus souvent observée et la validation de l'hypothèse de non-linéarité reste difficile, notamment du fait que l'estimation même des constantes de partage comporte une grande variabilité. Il semble aussi que la linéarité ou non dépende du couple POH-MO (Zhao et Lang, 1996).

3.1.3.2 Cinétique(s) de sorption

La question de la durée d'atteinte de l'équilibre entre les POH et la MO est sous-jacente à la détermination des constantes K_{DOC} ou K_{POC} . Cependant, les résultats expérimentaux divergent quant au temps d'atteinte de cet équilibre. Par exemple :

- Schlautman et Morgan (1993) observent que l'équilibre entre le pérylène et les acides humiques commerciaux Aldrich est atteint en quelques minutes,
- Kukkonen et al. (1990) estiment, sur la base d'expériences préliminaires, que quatre jours sont nécessaires à plusieurs HAP et PCB pour se fixer sur diverses MOD aquatiques humiques,
- Haitzer et al. (1999) observent que, pour le benzo[a]pyrène, selon l'origine de la MOD, l'état d'équilibre peut être atteint en moins d'une journée ou qu'au contraire douze jours ne suffisent pas.
- Lors d'une expérience sur des sédiments marins, Hellou et al. (1999) constatent que quatre mois d'expérience ne suffisent pas pour aboutir à un équilibre.
- Concernant la fixation de PCB sur des algues, certains observent une accumulation en moins de deux heures (Geyer et al., 1984; Koelmans et al., 1993), alors que d'autres études montrent une fixation sur plusieurs jours (Stange et Swackhamer, 1994).

Vérifier l'atteinte de l'équilibre est une opération extrêmement difficile, voire théoriquement impossible, car on ne peut jamais exclure l'existence de cinétiques plus lentes que prévu dans un milieu particulièrement hétérogène tel que la matière organique. Par ailleurs, certains phénomènes de fixation apparemment très lents pourraient en réalité être dus à une transformation de la matière organique.

Néanmoins, les fortes variations observées peuvent en partie être justifiées car l'équilibre dépend à la fois du POH et de la MO (Haitzer et al., 1999). De plus, plusieurs mécanismes interviennent dans la cinétique de liaison POH/MO (Seth et al., 1999) : une *adsorption* rapide (quelques heures à quelques jours) à la surface des matières organiques, puis une *migration* lente (plusieurs mois,

Pignatello et Xing, 1995) des POH au cœur de la MO. Après une première fixation à la surface, un premier palier est atteint pour le coefficient de fixation, et alors que le processus de migration débute, le système est dans un état apparent d'équilibre si il est observé à des échelles de temps courtes. On peut donc penser que la cinétique de fixation dépend de la taille des colloïdes ou particules organiques.

Il est donc important de connaître les conditions expérimentales dans lesquelles sont déterminées les constantes de partition (Krop et al., 2001).

3.2 Influence des interactions matière organique/ polluants organiques hydrophobes sur leur biodisponibilité

3.2.1 En présence de matière organique dissoute : modèle du « polluant libre »

Dans une revue bibliographique concernant l'effet de la MOD sur la bioconcentration des POH, Haitzer et al. (1998) observent que dans trois quarts des expériences, la présence de MOD dans le milieu induit une diminution de 2% à 100% de la bioconcentration. Dans un quart des cas, on observe une augmentation. Ces cas ne sont pas spécifiques de certaines MOD, de certains POH ou encore de certains organismes.

En reprenant certaines expériences dans lesquelles une augmentation a été observée, Haitzer et al. (2001) obtiennent un effet réducteur vis-à-vis de la bioconcentration, et suggèrent donc que l'augmentation observée précédemment peut être due à des conditions expérimentales inadaptées.

Dans l'eau, il est donc généralement admis que la présence de MOD réduit la biodisponibilité des POH. L'hypothèse explicative est que le complexe formé par l'association MO-POH est trop gros et trop polaire pour traverser les membranes biologiques (Landrum et al., 1985). Il est par conséquent rendu indisponible pour l'accumulation dans l'organisme.

On conceptualise cette hypothèse en écrivant que seuls les polluants organiques dissous libres dans l'eau sont biodisponibles pour les organismes. Nous choisissons d'appeler ce modèle « modèle du polluant libre », par analogie avec le modèle de « l'ion libre » développé dans le cadre de l'étude de la biodisponibilité des métaux (Campbell, 1995). Le facteur de bioconcentration BCF_{MOD} en présence de MOD est proportionnel à la fraction f_{libre} de polluant libre dans le milieu (Kukkonen et al., 1990, ou encore Haitzer et al., 1999) :

$$BCF_{MOD} = f_{libre} \cdot BCF_0 \quad \text{Equ. 14}$$

Avec BCF_0 le facteur de bioconcentration de l'organisme dans un milieu sans MOD.

Dans un milieu où l'équilibre est atteint pour les interactions entre MO et POH, on peut écrire :

$$f_{libre} = \frac{C_{libre}}{C_{libre} + C_{MOD}} = \frac{1}{1 + K_{DOC} \cdot [COD]} \quad \text{Equ. 15}$$

En combinant Equ. 14 et Equ. 15, on obtient une relation qui relie la spéciation physico-chimique du polluant dans le milieu et les variables biologiques de bioaccumulation :

$$BCF_{MOD} = \frac{BCF_0}{1 + K_{DOC} \cdot [COD]} \quad \text{Equ. 16}$$

Plusieurs études trouvent des relations hyperboliques de ce type entre la BCF et la concentration en matière organique : Akkanen et Kukkonen (2003) pour *Daphnia magna*, Freidig et al. (1998) pour un poisson, Haitzer et al. (1999) pour un nématode (Figure 8). La validation de ce modèle laisse donc penser que les POH fixés sur les matière organiques ne sont pas biodisponibles.

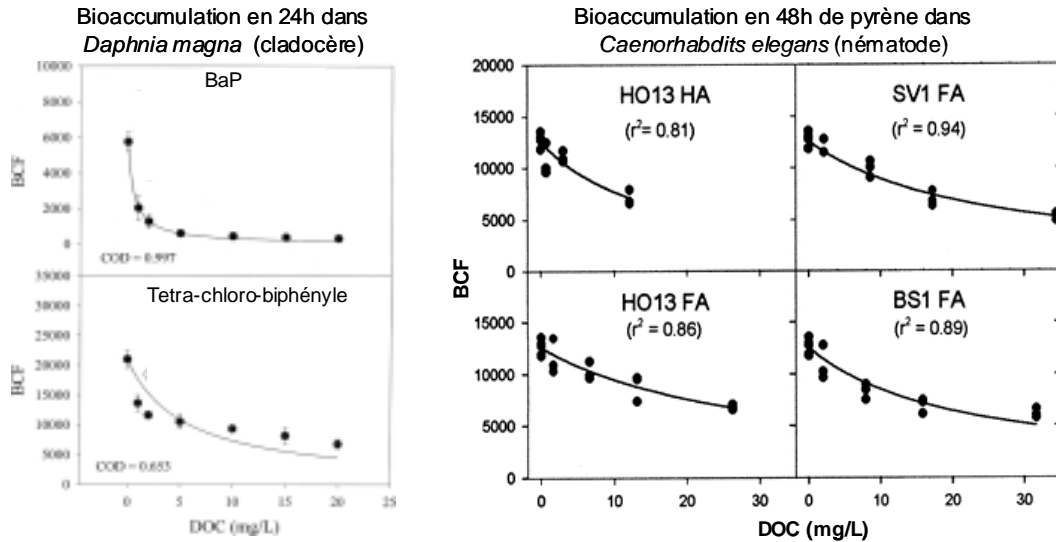


Figure 8 : Exemples d'ajustement du modèle du polluant libre sur des observations de réduction de la bioaccumulation par la MOD. MOD de lac et deux POH (Akkanen et Kukkonen, 2003) et pyrène et quatre MOD humiques différentes (Haitzer et al., 1999)

L'Equ. 16 ci-dessus peut être un moyen d'estimer la constante d'affinité des POH pour la MO. Kukkonen et Pellinen (1994) comparent les valeurs de K_{DOC} obtenues par différentes méthodes physico-chimiques avec la valeur de K_{DOC} déterminée par une régression non linéaire de BCF sur $[COD]$. Ils concluent que les méthodes physiques de mesure de K_{DOC} (dialyse et extinction de fluorescence) se rapprochent plus des valeurs estimées par une mesure de bioaccumulation que les méthodes de séparation.

Haitzer et al. (1999) se basent sur cette relation pour déterminer la constante de partition K_{DOC} . Cette constante estimée biologiquement devient l'outil de caractérisation de l'affinité entre MO et POH, la séparation entre les POH libres et fixés étant cette fois-ci la membrane biologique plutôt qu'une membrane physique (dialyse) ou une séparation chimique.

3.2.2 Rôle nutritionnel des matières organiques particulières. Impact sur la biodisponibilité

L'impact de la matière organique particulière sur la biodisponibilité des POH est plus ambigu. La MOP a une forte capacité de fixation des POH, et par conséquent peut avoir un rôle protecteur en limitant l'accumulation directe par respiration. A l'opposé, certaines MOP constituent la source de nourriture des organismes, ce qui peut conduire à une accumulation par voie trophique.

Beaucoup de données sont disponibles pour les organismes benthiques (par exemple Loonen et al., 1997; Kukkonen et Landrum, 1998; Lotufo, 1998). Ceux-ci ingèrent de très grandes quantités de sédiments peu chargés en MO nutritionnelles. Pour ces organismes, il a été montré que la quantité et la qualité de la fraction organique jouent un rôle primordial pour la bioaccumulation (Gunnarsson et al., 1999).

Des données sont aussi disponibles pour les organismes filtreurs, pour lesquels on observe aussi une tendance à l'augmentation de la bioaccumulation en présence de MOP (Baumard et al., 1999; Okay et al., 2000; Verrengia Guerrero et al., 2003).

Pour les organismes aquatiques supérieurs (notamment les poissons carnivores), la principale voie d'accumulation peut être la nourriture contaminée (bioamplification) lorsque les polluants sont persistants et peu métabolisés (cas des pesticides organochlorés ou des PCB par exemple, Loizeau et al., 2001; Gonzalez Sagrario et al., 2002).

Pour les organismes de la colonne d'eau en début de la chaîne alimentaire (zooplankton, invertébrés, poissons détritivores...), il est souvent admis que la bioaccumulation se fait principalement par contact direct. L'accumulation par ingestion est considérée comme négligeable, ce qui a conduit à un désintérêt *a priori* pour cette voie d'accumulation (Suffet et al., 1994).

Cependant, les quelques études relatives aux organismes de la colonne d'eau montrent des résultats plus nuancés. Ainsi, Schrap et Opperhuizen (1990) observent que la voie trophique n'est pas négligeable dans la contamination des poissons (guppies) par divers POH. Selon le POH et la MOP considérée, la bioaccumulation peut être augmentée quand il y a ajout de MOP, ou alors inchangée, la bioaccumulation par voie trophique « compensant » la réduction de bioconcentration par respiration. Les études sur les invertébrés dans la colonne d'eau sont très rares. McCarthy (1983) a étudié l'impact de la présence de cellules de levure sur la bioaccumulation du benzo[a]pyrène et de l'anthracène par les daphnies. Ces MOP ont une forte capacité à fixer les HAP ($K_D = 2.2 \times 10^5$ L/kg pour le BaP). Les résultats montrent une diminution de la bioaccumulation due à la MOP : en présence de 25 mg/L de levure, la bioaccumulation du BaP diminue de 72%.

Modélisation de l'accumulation en présence de MOP

Il existe plusieurs modèles toxico-cinétiques applicables en présence de MOP, pour lesquels les polluants fixés sur les particules sont disponibles pour l'accumulation par voie trophique (Newman, 1995). Le plus couramment employé et le plus simple reprend le modèle à un compartiment, avec deux voies d'accumulation possibles : les contaminants libres dans l'eau sont accumulés par contact direct (k_u en L/kg/h) et les contaminants fixés sur les particules sont accumulés par ingestion (k_i en L/kg/h).

$$\frac{dC_{org}}{dt} = k_u C_{libre} + k_i C_{MOP} - k_d C_{org} \quad \text{Equ. 17}$$

Ce modèle a été appliqué à la toxico-cinétique du BaP et de l'anthracène dans les daphnies (McCarthy, 1983) en présence de levure. Le suivi de la cinétique du BaP en présence de levure a permis d'estimer les constantes d'accumulation k_u et k_i .

Cette étude montre que l'accumulation par contact direct dans les daphnies est beaucoup plus rapide que l'accumulation par ingestion. Les rapports des constantes k_i/k_u varient entre 3 et 15%. Cependant, en présence de fortes teneurs en MOP, l'accumulation par voie trophique peut ne pas être négligeable. Ainsi, en supposant les teneurs en HAP et en MO dans le milieu constantes, suivant une répartition à l'équilibre comme décrite dans l'équation Equ. 7 ci-dessus, l'intégration de Equ. 17 donne :

$$\begin{aligned}
 C_{org} &= \frac{k_u C_{libre} + k_i C_{MOP}}{k_d} (1 - e^{-k_d t}) \\
 &= \left(\frac{k_u}{k_d} \frac{C_{total}}{1 + K_{POC}[COP]} + \frac{k_i}{k_d} \frac{C_{total} \cdot K_{POC}[COP]}{1 + K_{POC}[COP]} \right) (1 - e^{-k_d t}) \\
 &= \frac{C_{total}}{1 + K_{POC}[COP]} \frac{k_u}{k_d} \left(1 + \frac{k_i}{k_u} K_{POC}[COP] \right) (1 - e^{-k_d t})
 \end{aligned}
 \tag{Equ. 18}$$

Contact direct Voie trophique

La contribution relative de la voie trophique dans la contamination s'évalue donc par le produit $k_i/k_u K_{POC}[COP]$. Dans certains milieux contenant de fortes concentrations en MOP ayant une grande capacité de sorption des POH, la voie trophique peut être significative. Ainsi, alors que la bioaccumulation du BaP est globalement réduite de 72% avec 25 mg/L de levure, 50% de l'accumulation provient de la voie trophique (McCarthy, 1983).

3.3 Variabilité des interactions entre matière organique et polluants organiques hydrophobes

Si le rôle « protecteur » de la MOD vis-à-vis de la biodisponibilité des polluants est largement vérifié, l'intensité de cette protection est très variable, selon les organismes, les propriétés chimiques du milieu et surtout selon la quantité et la qualité de la matière organique (Haitzer et al., 1998).

3.3.1 Propriétés chimiques de l'eau

L'analyse thermodynamique de la solution permet d'établir certaines règles théoriques (Schwarzenbach et al., 1993) :

- l'augmentation de la température augmente la solubilité des POH, et par conséquent est susceptible de diminuer la constante de partage K_{DOC} . Ainsi, un mélange eau/ solide réchauffé de 10°C conduirait à une diminution de 30% de l'adsorption du pyrène.
- La salinité devrait faire augmenter très légèrement le coefficient de partage K_{DOC} .
- le pH modifie principalement la conformation de la matière organique, surtout lorsqu'elle comporte de nombreux sites acides faibles, et influence peu la solubilité des composés apolaires. Théoriquement, une augmentation du pH doit conduire à une déprotonation des surfaces des colloïdes, et donc une diminution des interactions hydrogène. L'augmentation du pH limite donc la fixation des POH sur la matière organique.

Encore très peu d'études expérimentales ont été développées pour confirmer ou infirmer ces analyses théoriques. Schlautman et Morgan (1993) ont analysé de façon expérimentale l'influence du pH et de la force ionique sur l'affinité de plusieurs HAP pour des acides humiques commerciaux. Ils observent qu'une augmentation de la force ionique ou du pH conduit à une baisse de l'affinité des HAP pour la MOD, ce qui, pour le cas de la salinité, est contraire au résultat théorique. De Paolis et Kukkonen (1997) montrent que le pH a un effet significatif sur l'adsorption des composés organiques polaires (pentachlorophénol étudié), mais que la fixation sur la MOD des molécules fortement apolaires (les HAP par exemple) est peu affectée par un changement de pH.

Akkanen et Kukkonen (2001) étudient l'influence de la force ionique sur la biodisponibilité de divers POH en présence de MOD et constatent que l'augmentation de la dureté de l'eau favorise légèrement la bioaccumulation en présence de MO. Ce résultat corrobore les observations de Schlautman et Morgan (1993).

Les propriétés chimiques de l'eau peuvent modifier les relations entre les POH et la MO ; elles sont aussi susceptibles de modifier de façon fondamentale la physiologie des organismes. L'influence d'une modification des propriétés physico-chimiques de l'eau sur la biodisponibilité est donc la somme de modifications à la fois du milieu et du biota, qu'il est encore difficile d'appréhender dans leur ensemble (Erickson et al., 1994).

3.3.2 Influence des caractéristiques de la matière organique

3.3.2.1 Hydrophobie de la MOD, importance des substances humiques

Les substances humiques qui constituent la partie hydrophobe de la MO ont une très grande capacité de sorption des polluants organiques hydrophobes (Caron et Suffet, 1989). Ainsi, Kukkonen et al. (1990) montrent que la fraction de la MOD naturelle retenue sur la résine XAD 8 est celle qui a la plus grande capacité à fixer certains POH.

C'est la raison pour laquelle les études ont jusqu'alors essentiellement porté sur la biodisponibilité des POH en présence de matières humiques dissoutes ou de MO provenant d'eaux naturelles fortement chargées en substances humiques, comme par exemple des rivières de forêts ou drainant des tourbières, des eaux de marais (Krop et al., 2001 ; Haitzer et al., 1998). De plus, cette MO est stable car réfractaire à la dégradation bactérienne et n'est pas ingérée pas les organismes aquatiques.

Des acides humiques commerciaux (Aldrich) existent et ont largement été utilisés depuis les années 80. Ils permettent de comparer les propriétés de complexation de différents micro-polluants en limitant la variabilité due à la MO. Cependant, les acides humiques commerciaux, qui sont extraits des sols, ont des comportements assez différents des MOD aquatiques naturelles (Malcom et MacCarthy, 1986 ; Grasso et al., 1990) et en particulier fixent toujours plus les POH (Schramm et al., 1998). Par exemple McCarthy et al. (1989) mesurent que K_{DOC} pour le benzo[a]pyrène est quinze fois plus grand pour les acides humiques Aldrich que pour les MOD de rivières naturelles.

Il a été montré que les acides humiques avaient en général une plus grande capacité de sorption des POH que les acides fulviques (Chin et al., 1997; De Paolis et Kukkonen, 1997). Cette différence se retrouve au niveau de l'impact de la MO sur la bioaccumulation des POH, les acides humiques réduisant la bioaccumulation plus que les acides fulviques (Haitzer et al., 1999).

Le pourcentage de substances humiques dans une MOD naturelle permet d'expliquer une grande partie de la variabilité observée sur les K_{DOC} et sur l'impact de la MO sur la biodisponibilité (Akkanen et al., 2001). Cependant, même en ne s'intéressant qu'aux substances humiques, on observe une grande variabilité des coefficients de partition K_{DOC} . D'autres critères doivent donc être étudiés pour expliquer cette variabilité.

3.3.2.2 Taille des molécules de la MO

En estimant le coefficient d'affinité K_{DOC} pour chaque fraction de matière organique après séparation par filtration successive, Kukkonen (repris dans Suffet et al., 1994) et Fan et al. (1997) montrent une relation positive entre la taille des colloïdes et K_{DOC} pour le benzo(a)pyrène et le fenvalérate. Cette relation est confirmée par Chin et al. (1997) pour le pyrène et diverses substances humiques.

3.3.2.3 Aromaticité et capacité de fixation

Dans de nombreuses études, une bonne corrélation est obtenue entre l'aromaticité de la matière organique humique (mesurée par absorbance UV, par spectre infra-rouge ou par RMN) et sa capacité à interagir avec les POH. (Kukkonen et Oikari, 1991; Chin et al., 1997; Haitzer et al., 1999). La même observation est faite dans plusieurs études utilisant des matières organiques naturelles, éventuellement non humiques (McCarthy et al., 1989; Akkanen et al., 2001). Cette corrélation est expliquée par la nature fortement hydrophobe des cycles aromatiques de la matière organique. Ce résultat a conduit à estimer les capacités de fixation des POH via l'aromaticité de la MO (Chin et al. (1997) par exemple).

Très récemment cependant a été mis en évidence le rôle de certains constituants non aromatiques de la MO dans la fixation des polluants. Ainsi, Salloum et al. (2002) ont analysé la capacité de sorption de matières organiques sédimentaires et ont montré que les matières organiques d'origine végétale (algues fraîches, dégradées, cellulose) avaient une très forte capacité de sorption du phénanthrène. De même, Chefetz et al. (2000) montrent que les extraits d'algues ont une capacité de fixation du pyrène plus forte que les acides humiques. La présence de longues chaînes carbonées aliphatiques originaires des parois cellulaires des algues peut expliquer cette forte capacité de sorption : les « alganeanes », macromolécules très hydrophobes et aliphatiques, ont ainsi été mises en évidence (Derenne et al., 1992; Allard et al., 1998). Mao et al. (2002) suggèrent que ces structures sont conservées au cours du processus d'humification et qu'elles forment des sites non aromatiques de fixation pour les POH au sein des substances humiques.

3.4 Conclusion

Les interactions entre les matières organiques et les POH constituent la principale source de variation de la biodisponibilité des POH dans le milieu aquatique. A l'exception des matières organiques particulières source de nourriture des organismes vivants, pour lesquelles très peu de

résultats sont disponibles dans le cas des organismes de la colonne d'eau, la matière organique a principalement une capacité de réduction de la biodisponibilité de polluants.

Le modèle du «polluant libre », qui traduit que les POH associés à la MO ne sont pas disponibles est aujourd'hui validé dans de nombreuses études. Il permet de prédire la bioaccumulation dans les organismes du milieu à partir des données physico-chimiques et en particulier à partir des constantes de partition K_{DOC} .

Pour un même polluant, l'intensité des interactions est très variable, les principaux facteurs de variation étant les caractéristiques chimiques et de conformation de la MO. Il apparaît clairement que l'hydrophobie de la MO constitue le principal facteur d'influence, les polluants se fixant préférentiellement sur les sites hydrophobes de la MO.

Peu de résultats sont encore disponibles sur la modélisation de la relation entre les POH et la MO. Une première approche a été suggérée par Haitzer et al. (1999). Elle consiste en une régression linéaire statistique des propriétés de la MO sur la constante K_{DOC} :

$$K_{DOC} = a \times (\text{hydrophobie de la MO}) + b$$

Cependant, cette relation théorique est limitée par la difficulté de prédire quantitativement l'hydrophobie de la MO. Son estimation via une mesure d'aromaticité a été souvent proposée, mais ne semble pas être généralisable à tous les types de matière organique. Il semblerait intéressant de pouvoir trouver d'autres critères quantitatifs plus pertinents.

Il convient aussi de noter que les études jusqu'à présent sont presque exclusivement tournées vers les matières organiques « naturelles », souvent humiques. Celles-ci ne sont pas polluées par des matières organiques anthropiques, contenant notamment des hydrocarbures aliphatiques, des détergents ou autres molécules présentes dans les effluents urbains, largement hydrophobes, et donc susceptibles d'avoir une grande affinité pour les micro-polluants organiques. Les études sur les interactions des POH avec les matières organiques de milieux anthropisés sont encore peu développées et très récentes (Kopinke et al., 1995; Gunnarsson et Rosenberg, 1996; Akkanen et al., 2001, par exemple).

PROBLEMATIQUE

Objectifs du travail

L'état des connaissances sur la biodisponibilité des polluants organiques hydrophobes permet de définir les axes prioritaires de recherche pour notre étude. Le chapitre précédent montre tout d'abord que la biodisponibilité des POH est très fortement modulée par la présence de MO dans le milieu. Les paramètres géochimiques jouent un rôle mineur, et modifient la physiologie et le comportement des organismes avant d'influencer réellement la spéciation et la biodisponibilité chimique des polluants organiques.

- *C'est donc à la matière organique comme facteur d'influence principal de la biodisponibilité que nous nous sommes intéressés pour ce travail.*

Dans la colonne d'eau il a très souvent été supposé que la voie trophique était négligeable par rapport à la contamination par contact. En présence de MOD, la modélisation du « polluant libre » basée sur la double hypothèse que seul le polluant dissous dans l'eau est biodisponible pour la bioconcentration et que le milieu est à l'équilibre semble être une approche simple qui reflète correctement les phénomènes observés dans de nombreux cas. Ce modèle a été testé et validé uniquement avec des matières organiques dissoutes et dans des expériences de laboratoire au cours desquelles les organismes ne sont pas nourris.

- *L'importance de la MOD dans les milieux naturels (10-90% du carbone organique total, Meybeck, 1982) ainsi que l'hypothèse généralement formulée de l'accumulation par contact pour les organismes de la colonne d'eau nous a conduit à nous intéresser principalement à cette forme de MO. Dans ce cas, nous avons repris a priori les hypothèses du modèle du polluant libre*

Cependant, le rôle global que peut jouer la MOP sur la biodisponibilité (piège ou vecteur) reste encore peu étudié, surtout pour les organismes de la colonne d'eau. Il semble dépendre fortement du comportement des organismes (en particulier de leur mode d'alimentation), à l'inverse du rôle protecteur de la MOD décrit dans le modèle du polluant libre qui semble vérifié pour tous les types d'organismes aquatiques étudiés.

- *Le rôle de la matière organique particulaire devra quand même être abordé afin d'avoir une représentation complète de la modulation de la biodisponibilité des polluants dans le milieu par la matière organique.*

Les caractéristiques physico-chimiques de la MO déterminent l'ampleur de sa capacité à modifier la biodisponibilité des POH. Le principal facteur est l'hydrophobie de la MO. Les substances humiques ont été privilégiées par le passé car (1) ce sont les MOD les plus hydrophobes, et qui, par conséquent, fixent préférentiellement les POH et (2) elles constituent la majorité des MOD dans les eaux naturelles. Peu de recherches ont été menées jusqu'alors sur la capacité d'autres MO à modifier la biodisponibilité des polluants.

Les MOD « anthropiques » présentes dans les eaux urbaines, issues de rejets urbains et formées dans les milieux eutrophes, à l'aval des rejets domestiques n'ont reçu aucune attention. Elles sont plus hydrophiles et moins stables que les MO naturelles. Ces matières organiques composent cependant la majorité des matières organiques des milieux aquatiques urbains, qui sont aussi les plus contaminés en de nombreux micro-polluants, métalliques ou organiques.

- *Dans un objectif d'estimation de la biodisponibilité de polluants organiques hydrophobes en milieu urbain, nous choisissons d'étudier particulièrement les matières organiques non stables et biodégradables issues des activités humaines.*

La biodégradabilité des matières organiques urbaines a un impact direct fort sur le milieu (désoxygénation, bouleversement des chaînes trophiques...). La biodisponibilité des polluants est aussi susceptible d'évoluer au fur et à mesure que la matière organique complexante évolue en se minéralisant et se recomposant. Cet aspect n'a encore jamais été abordé. Or l'estimation correcte de la biodisponibilité des polluants doit nécessairement intégrer la dynamique des matières organiques du milieu.

- *La biodégradabilité des matières organiques sera étudiée en particulier afin de pouvoir appréhender la biodisponibilité des POH d'un point de vue dynamique dans les milieux anthropiques.*

D'une manière générale, les facteurs de contrôle de la biodisponibilité (la MO en particulier) sont encore peu intégrés dans les modèles d'exposition des polluants (Mackay, 1994 ; Koelmans et al., 2001). Dans la plupart des modèles, la dynamique de la matière organique est décrite uniquement d'un point de vue physique (transport, déposition). Les aspects cinétiques concernant les cinétiques d'adsorption des POH sur les différentes MO ou la dynamique propre de la matière organique (croissance algale, bactérienne, biodégradation...) ne sont pas pris en compte

- *Nous tenterons de définir les bases pour une modélisation de la biodisponibilité des POH dans les milieux urbains qui s'appuie sur les dynamiques de la matière organique.*

Les approches *in situ* de la biodisponibilité des polluants organiques restent d'une manière générale peu développées, principalement à cause de la difficulté technique de réaliser ces mesures. De fait, les effets de la MOD sur la biodisponibilité des POH n'ont que très peu été observés *in situ*. Il est pourtant indispensable à terme de pouvoir valider les modèles développés à partir d'observations faites en laboratoire en les confrontant aux observations faites dans les milieux réels.

- *Nous aborderons dans ce travail l'étude *in situ* du rôle de la matière organique dans le contrôle de la biodisponibilité des POH en milieu aquatique urbain.*

Démarche employée

A partir des questions posées, notre démarche a été exploratoire.

- Notre premier travail a consisté à mettre en place les moyens expérimentaux d'observation et de quantification nécessaires à l'étude de la biodisponibilité des HAP. Nous avons dans un premier temps développé une méthode de mesure de la bioaccumulation des HAP dans les daphnies par spectrofluorimétrie. Cette méthode a ensuite été utilisée pour étudier et

quantifier l'impact de la matière organique sur la biodisponibilité (estimée via une mesure de bioaccumulation). Ces protocoles sont présentés dans la partie « *Quantification de l'influence de la matière organique sur la biodisponibilité* » ci-après. Ils font l'objet de l'Article 1 et de l'Article 2 en annexe.

- Les méthodes développées ont ensuite servi à étudier spécifiquement l'influence de matières organiques caractéristiques de milieux aquatiques urbains. La biodégradabilité de la matière organique dissoute a été choisie comme mode de caractérisation de la MO, dans la mesure où les MO urbaines sont susceptibles d'être fortement biodégradables, et où ce paramètre est central dans les modèles de qualité de l'eau. Ces observations sont présentées et discutées dans l'Article 3. Nous nous sommes aussi intéressés au rôle de la matière organique particulaire sur la biodisponibilité du benzo[a]pyrène. Les résultats sont présentés dans l'Article 4. Les résultats expérimentaux nous ont permis de définir une modélisation de l'exposition des polluants qui se base sur un modèle de biodégradation de la matière organique en rivière. L'approche expérimentale et la description du modèle d'exposition sont l'objet du chapitre « *Influence des matières organiques sur la biodisponibilité : rôle de la biodégradabilité* ».
- Enfin, nous avons abordé l'évaluation de la biodisponibilité *in situ*, dans l'optique de pouvoir analyser *in situ* le rôle de la MO sur la biodisponibilité des POH. Pour cette dernière étape, la technique de Semi-Permeable Membrane Device (SPMD) a été utilisée pour l'échantillonnage des HAP biodisponibles, le site d'étude a été le bassin de la Seine. Les résultats des campagnes de terrain sont présentés dans l'Article 5 en annexe. Nous avons aussi vérifié la validité de cette technique comme outil de mesure de la fraction biodisponible dans le milieu. L'ensemble de cette partie a été réalisé en collaboration avec le laboratoire des micro-polluants du Cemagref de Lyon. Ces travaux sont présentés dans la dernière partie du rapport intitulée : « *Approche in situ de l'effet des matières organiques sur la biodisponibilité des HAP en milieu aquatique* ».

QUANTIFICATION DE L'INFLUENCE DE LA Matière Organique sur la BIODISPONIBILITE DES HAP

Pour ce travail, le choix a été délibérément fait en faveur d'une estimation biologique de la biodisponibilité. Cela nous a semblé en effet plus pertinent dans un objectif d'évaluation de l'impact écotoxicologique sur le milieu et nous permettait d'éviter les difficultés techniques et analytiques relatives à la mesure de la répartition des HAP dans le milieu aquatique. La biodisponibilité des HAP a donc été évaluée au moyen de mesures de bioaccumulation dans des daphnies.

Les daphnies de l'espèce *Daphnia magna* ont été prises comme organisme modèle. Pour ces crustacés qui font partie du zooplancton de la colonne d'eau, la principale voie d'accumulation est le contact. Les daphnies sont couramment utilisées pour l'étude de la bioaccumulation (par exemple Munoz et al., 1996; Clément et al., 2000; Barata et al., 2002; Akkanen et Kukkonen, 2003). Elles ont une grande capacité à accumuler les POH (McCarthy, 1983; Kukkonen et al., 1990; Geyer et al., 1991). Enfin, l'élevage en laboratoire et la manipulation de ces organismes sont aisés. En favorisant les conditions de reproduction asexuée, et en éliminant les rares œufs sexués, on peut obtenir une population importante très homogène dans le temps.

Nous avons travaillé avec trois HAP différents, le fluoranthène, le pyrène et le benzo[a]pyrène. Ils font partie des seize HAP définis comme prioritaires par l'US EPA et des six HAP réglementés en France pour l'eau de consommation. Ils présentent des propriétés de solubilité et d'hydrophobie différentes (Tableau 6). Leur accumulation dans les daphnies a déjà été prouvée (Kukkonen et al., 1990; Granier et al., 1999; Clément et al., 2000).

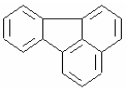
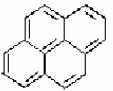
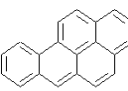
| | Fluoranthène | Pyrène | Benzo(a)pyrène |
|-----------------------------------|--|---|--|
| Formule | $C_{12}H_{10}$  | $C_{16}H_{10}$  | $C_{20}H_{12}$  |
| Masse moléculaire | 154 g/ mol | 202 g/L | 252 g/ mol |
| Solubilité dans l'eau | 240 µg/ L | 140 µg/ L | 1,5 µg/ L |
| Log K _{ow} (hydrophobie) | 5, 2 | 5,3 | 6,3 |

Tableau 6 : Propriétés chimiques des trois HAP étudiés

Ce chapitre présente les méthodologies mises au point pour permettre l'étude de l'effet des MO sur la bioaccumulation des HAP dans les daphnies.

- Nous avons dans un premier temps développé une méthode d'estimation des HAP bioaccumulés, qui limite le nombre de daphnies nécessaires pour l'analyse et évite les

protocoles analytiques lourds. Cette méthode est basée sur les propriétés de fluorescence des HAP.

- Pour estimer l'influence de la MO sur la biodisponibilité des HAP, nous avons repris et adapté le schéma expérimental développé par Kukkonen et al. (1990). Les daphnies sont exposées dans des milieux contenant une quantité fixée d'un HAP et des concentrations variables de MO ; la bioaccumulation dans les daphnies est étudiée en fonction de la teneur en MO dans le milieu.

1 MESURE DES HAP BIOACCUMULES DANS *DAPHNIA MAGNA*

La principale difficulté de la mesure de la bioaccumulation consiste en l'extraction et l'analyse des polluants dans une matrice biologique complexe. Si elles présentent le grand avantage d'être adaptées à tous les types de polluants et à tous les milieux, les techniques classiques d'analyse par chromatographie exigent en revanche une grande quantité de matière (et donc un très grand nombre d'organismes) et un protocole d'extraction lourd et coûteux (extraction par solvant organique, purification, changement de solvant, etc...). En laboratoire, l'utilisation de molécules marquées radio-actives permet de diminuer les limites de détection et donc le nombre d'organismes nécessaires à la mesure et les concentrations en polluants dans le milieu (concentrations de l'ordre de la dizaine de ng/L possibles). Cependant l'utilisation de molécules radioactives exige un équipement très spécifique et des agréments dont nous ne disposons pas au laboratoire.

Les méthodes citées ci-dessus, exigeantes en matériel et en temps, sont « surdimensionnées » pour le cadre de notre étude. En effet, pour l'étude en laboratoire que nous souhaitons mener :

- nous n'étudions qu'un seul HAP à la fois
- il n'est pas nécessaire formellement de mesurer la concentration en HAP dans les organismes ; seule une comparaison de la bioaccumulation dans un milieu avec et sans MO est nécessaire
- nous ne cherchons pas *a priori* à travailler nécessairement aux concentrations environnementales très faibles.

Sur ce dernier point, notre objectif est d'abord l'étude des interactions entre matière organique et POH et l'impact de ces interactions sur la bioaccumulation. Ces interactions sont nécessairement plus facilement observables en évitant les difficultés analytiques. L'extrapolation des résultats attendus aux processus dans les milieux réels, pour lesquels les concentrations en HAP sont très faibles supposent implicitement que :

- Les interactions entre MO et HAP ne dépendent pas des concentrations en HAP. Plus particulièrement, on suppose ici que les sites de fixation sur les MOD sont toujours en excès, même en présence de fortes teneurs en HAP. Cette hypothèse est généralement vérifiée dans les études de linéarité de l'isotherme de sorption (Krop et al., 2001).
- De manière plus générale, à conditions environnementales identiques par ailleurs, la fraction biodisponible des HAP pour les daphnies est indépendante de la concentration totale en HAP dans le milieu.

Ainsi, en se basant sur les propriétés de fluorescence des HAP, nous avons développé une méthode d'estimation semi-quantitative de la bioaccumulation des HAP qui requiert des quantités limitées de matériel biologique, de solvant et un traitement de l'échantillon simple et rapide. Cette méthode est présentée dans l'Article 1.

1.1 Protocole

Le principe repose sur la mesure du spectre de fluorescence du HAP analysé dans un extrait de daphnies. Les daphnies utilisées pour les expériences de bioaccumulation sont de jeunes adultes (5-8 jours). Pour une même série d'expériences, elles ont été élevées dans le même milieu et ont approximativement la même taille. Le traitement des daphnies après exposition est le suivant (Article 1):

- les daphnies sont récupérées, rincées et broyées au ultrasons dans 4 ml d'un mélange dichlorométhane/méthanol (4 :1)
- l'extrait est filtré et le filtrat est analysé en spectrofluorimétrie. Le spectre d'émission est enregistré entre 350 et 500 nm.

Une étude préalable a permis de déterminer les longueurs d'ondes d'excitation qui fournissaient les meilleures amplitudes d'intensités : pour le fluoranthène $\lambda_{exc} = 287$ nm, pour le pyrène $\lambda_{exc} = 275$ nm, pour le benzo(a)pyrène $\lambda_{exc} = 265$ nm.

Le nombre de daphnies par échantillon était généralement de quinze, et toujours entre dix et vingt. Quand le nombre de daphnies n'était pas de quinze, les intensités de fluorescence mesurées étaient corrigées et rapportées linéairement à quinze daphnies.

1.2 Validation de la méthode

1.2.1 Evolution des spectres de fluorescence des HAP bioaccumulés

1.2.1.1 Selon les conditions de bioaccumulation

Une observation au microscope à épifluorescence a permis de vérifier que l'accumulation des HAP avait bien lieu à l'intérieur de l'organisme et pas seulement à la surface des membranes biologiques (Photo 1)

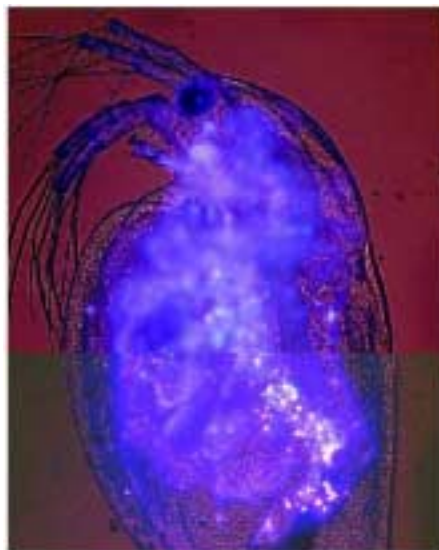


Photo 1 : Daphnie observée au microscope sous lumière UV. L'organisme a été exposé pendant quatre heures à une solution de fluoranthène (100 $\mu\text{g/L}$). Grossissement : $\times 10$.

La Figure 9 présente des spectres de chaque HAP dans les extraits de daphnies en fonction de la concentration en HAP dans le milieu et de la durée d'exposition. L'intensité de fluorescence a pu être reliée positivement à la concentration en HAP dans le milieu et à la durée d'exposition. Ces deux observations concordent avec la toxico-cinétique d'accumulation des HAP dans les daphnies : l'accumulation est proportionnelle à la concentration dans le milieu et une durée de 24 heures est généralement nécessaire pour atteindre l'équilibre entre daphnies et milieu (McCarthy, 1983; Akkanen et Kukkonen, 2003).

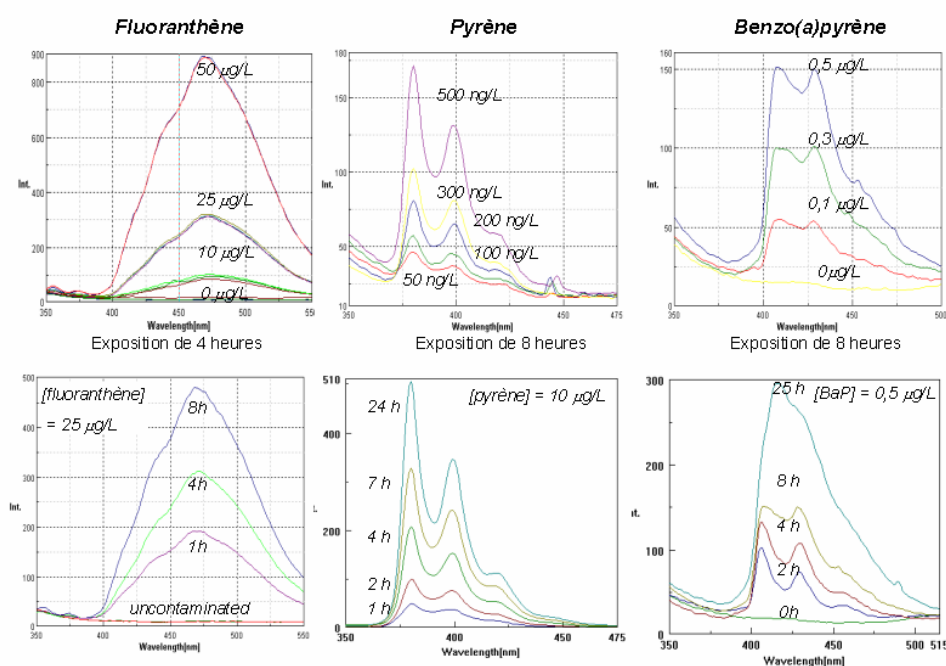


Figure 9 : spectres des HAP dans les extraits de daphnies. Haut : Concentration en HAP dans le milieu variable. Bas : Durée d'exposition variable.

1.2.1.2 Evolution de la forme des spectres de fluorescence

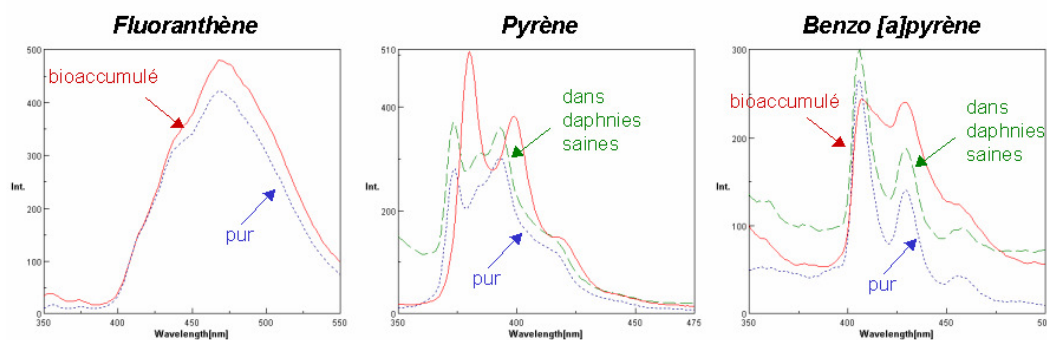


Figure 10 : Comparaison des spectres des HAP bioaccumulés, des HAP purs dans le solvant d'extraction et des HAP purs dans le solvant après extraction de daphnie saines

La Figure 10 présente les spectres de chaque HAP dans le solvant seul et dans un extrait de daphnies non contaminées (vérification de l'effet de matrice). En les comparant aux spectres des

HAP bioaccumulés indiqués aussi sur la Figure 10, nous observons trois comportements différents :

- Pour le fluoranthène, les spectres ont la même forme, quelles que soient les conditions de bioaccumulation testées,
- Pour le pyrène, le double pic du HAP pur dans le solvant existe toujours dans les extraits de daphnies, mais il est très différent. La forme du spectre du pyrène bioaccumulé est identique pour tous les extraits de daphnies analysés, quelles que soient les concentrations et les durées d'exposition (Figure 9).
- La forme du spectre du BaP bioaccumulé diffère de celle du BaP dans le solvant. Comme on peut l'observer sur la Figure 9, cette différence s'accroît au fur et à mesure que la durée d'exposition augmente.

Les spectres du pyrène et du BaP dans le solvant contenant des extraits de daphnies saines sont identiques à ceux des mêmes HAP purs dans le solvant, et ne ressemblent pas aux spectres des HAP bioaccumulés. Les déformations des spectres des HAP proviennent du phénomène de bioaccumulation. La principale hypothèse pouvant expliquer de telles transformations est la métabolisation des composés dans l'organisme.

1.2.1.3 Mise en évidence de composés hydrophiles néoformés

La métabolisation des HAP commence par l'hydrolyse enzymatique des cycles aromatiques. Ce processus rend les contaminants plus hydrophiles, ce qui permet leur excrétion (Varanasi, 1989). Sans développer un travail analytique complet visant à caractériser les éventuels métabolites produits, nous avons cherché à mettre en évidence l'apparition de composés hydrophiles par une extraction à l'eau des échantillons. Les deux phases, organique et aqueuse, sont ensuite analysées séparément en spectrofluorimétrie (Article 1)

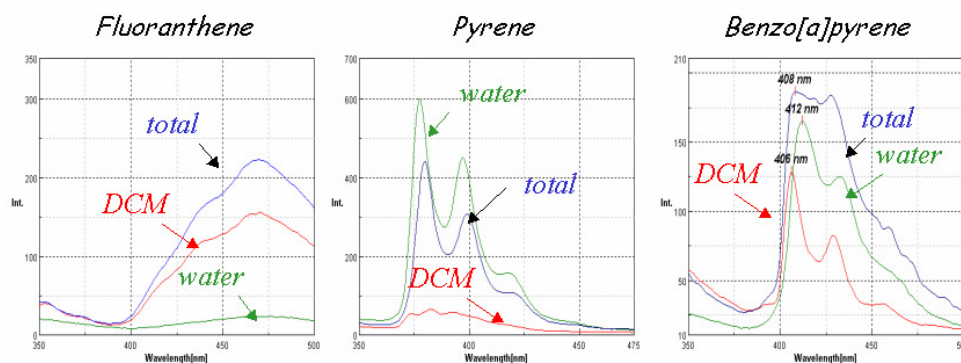


Figure 11 : spectres des HAP et autres composés extraits des daphnies : Total : spectre de l'extrait de daphnies avant séparation à l'eau. water : spectres de la phase aqueuse après extraction et séparation. DCM : spectre de la phase organique (dichlorométhane) après extraction.

Là encore, comme l'indique la Figure 11, les résultats sont très différents selon le HAP :

- pour le fluoranthène :

La phase aqueuse ne comporte pas de composé fluorescent, la fluorescence observée dans l'échantillon total avant extraction se retrouve presque totalement dans la phase organique.

- pour le benzo[a]pyrène

un composé fluorescent apparaît dans la phase aqueuse, son importance relative à celle du composé fluorescent dans la phase organique augmente avec la durée d'exposition (Figure 12). Son apparition progressive et la similarité de son spectre avec celui du BaP nous laisse penser qu'il s'agit d'un composé métabolite du BaP. Ce composé présente un pic de fluorescence à 412 nm dans la phase aqueuse et à 417 nm dans l'extrait total (comme on l'observe sur le spectre après 30 heures de bioaccumulation).

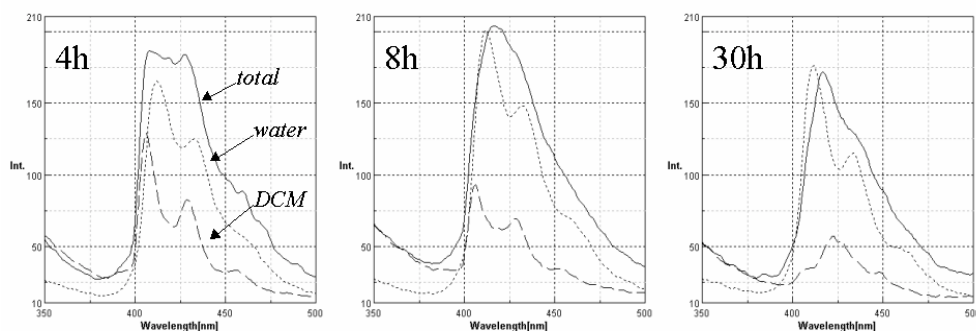


Figure 12 : spectres du BaP et des autres composés accumulés dans les daphnies : extrait total, phase aqueuse et phase organique (Article 1)

- pour le pyrène

Après extraction, la phase organique ne comporte plus de composé fluorescent, alors que la phase aqueuse est fortement fluorescente, avec un spectre identique, (bien que décalé vers le bleu) à celui du pyrène bioaccumulé. L'ensemble de la fluorescence observée dans l'échantillon brut est donc due à un composé hydrophile. Ce composé apparaît dès le début de la bioaccumulation. Contrairement au phénomène observé dans le cas de la bioaccumulation du BaP, ce composé est toujours présent, et n'évolue pas qualitativement avec le temps (au moins sur les 24 heures de bioaccumulation étudiées). Pour expliquer cette observation, nous formulons l'hypothèse de la conjugaison du pyrène avec un sucre ou une protéine dès son entrée dans la daphnie (Krahn et al., 1982; Varanasi, 1989; Lee et al., 1999).

1.2.2 Quantification

Pour le fluoranthène et le benzo[a]pyrène, l'accumulation des HAP dans les daphnies a été mesurée en parallèle par spectrofluorimétrie et par HPLC et détection en fluorescence. Cette comparaison a permis d'établir une relation linéaire entre les intensités de fluorescence et les concentrations en HAP dans les daphnies (Article 1).

- Le fluoranthène accumulé est relié linéairement à l'intensité de fluorescence à 470 nm :

$$[\text{fluoranthène}]_{\text{org}} = A_1 \cdot F_{470 \text{ nm}} + A_2 \quad (r^2 = 0,98, n=14)$$

où $A_1 = 0,115 (\pm 0,007)$

$A_2 = 3,52 (\pm 2,12)$ n'est pas significativement différent de 0.

- Concernant la bioaccumulation du benzo[a]pyrène, l'apparition du composé fluorescent dont le pic de fluorescence dans le solvant organique est à 417 nm implique une relation bilinéaire entre la fluorescence et la quantité de HAP dans les daphnies :

$$[BaP]_{org} = B_1 \cdot F_{407\text{ nm}} + B_2 \cdot F_{417\text{ nm}} = F_{407\text{ nm}} (B_1 + B_2/R) \quad (r^2 = 0.88, n=16)$$

où $B_1 = 3,66 \cdot 10^{-2} (\pm 0,35 \cdot 10^{-2})$

$B_2 = -1,62 \cdot 10^{-2} (\pm 0,32 \cdot 10^{-2})$

et $R = F_{407\text{ nm}} / F_{417\text{ nm}}$ est un indicateur de l'état de métabolisation du BaP dans les daphnies.

La comparaison entre les quantités de pyrène accumulé et les spectres de fluorescence n'a pas été menée.

1.2.3 Répétabilité et limite de détection liées à la mesure de fluorescence des HAP bioaccumulés

Répétabilité de la mesure de bioaccumulation

L'estimation de la bioaccumulation peut intégrer plusieurs facteurs d'erreur :

- variabilité biologique entre deux échantillons de daphnies
- incertitude sur le traitement de l'échantillon (mesures des volumes de solvant, intensité et durée de la sonication...).
- erreur sur la mesure des intensités de fluorescence (due au spectrofluorimètre).

La variabilité apportée par l'ensemble des incertitudes ci-dessus a pu être évaluée en comparant la variabilité des spectres de fluorescence de « pseudo-réplicats », c'est-à-dire d'échantillons de daphnies ayant été exposées dans le même milieu pour la même durée. Une étude statistique des écart-types observés sur l'ensemble des pseudo-réplicats effectués dans ce travail (entre deux et quatre réplicats par mesure) montre que l'ensemble de ces incertitudes conduit à une variabilité de moyenne 7 %. (Tableau 7).

En intégrant la variabilité due à la préparation du milieu d'exposition (dilution, dopage, etc...) nous obtenons un écart-type relatif moyen de 10% entre réplicats. On conclut à une bonne répétabilité de cette mesure.

| | Pseudo-réplicats | | Réplicats | |
|--|---------------------|---------------|-------------|--------|
| | Fluoranthène (n=27) | Pyrène (n=37) | BaP (n=150) | (n=15) |
| Ecart-type relatif moyen sur les réplicats | 7% | 7% | 7% | 10% |
| Ecart-type relatif maximal | 35% | 20% | 35% | 27% |
| 9 ^{ème} décile | 10% | 13% | 16% | 22% |

Tableau 7 : variabilité de la mesure de la bioaccumulation. Pseudo-réplicats : mesure d'échantillons de daphnies ayant été exposées au même milieu. Réplicats : mesures d'échantillons de daphnies ayant été exposées dans des milieux similaires et séparés.

Limites de détection

Les limites de détection des intensités des spectres de fluorescence sont données dans le tableau ci-dessous. Elles ont été déterminées à partir des mesures de spectres de fluorescence de daphnies saines. Les plus petites concentrations en HAP que nous avons utilisées au cours des tests étaient de 1 µg/L pour le fluoranthène, 20 ng/L pour le pyrène et 50 ng/L pour le BaP (exposition de

quatre heures, quinze daphnies par échantillon). Pour chacune de ces concentrations, le signal de réponse de HAP bioaccumulé était significativement différent des échantillons témoins (voir Tableau 8 ci-après). En revanche, les signaux obtenus pour le pyrène et le fluoranthène étaient inférieurs aux limites de quantification théoriques (i.e. 10 fois les écart-types des blancs).

| | Fluoranthène ($F_{470\text{ nm}}$) | Pyrène ($F_{380\text{ nm}}$) | Benzo[a]pyrène ($F_{407\text{ nm}}$) |
|--|---|-----------------------------------|---|
| Signal daphnies saines* (n=8) | $-2,7 \pm 1,8$ | $-4,2 \pm 2,7$ | $-0,2 \pm 0,8$ |
| <i>Limite détection (3x EcT)</i> | <i>6</i> | <i>8</i> | <i>2</i> |
| <i>Limite quantification (10x EcT)</i> | <i>18</i> | <i>27</i> | <i>8</i> |
| Signal daphnies contaminées (n=8) | $15,3 \pm 1,5$ | $21,7 \pm 4,2$ | $11,6 \pm 0,6$ |

* Les pics de fluorescence des extraits de daphnies contaminées sont corrigés du signal de base par soustraction d'une valeur minimale à la base du pic (voir détails dans l'Article 1). C'est pourquoi il est possible pour les blancs de daphnies d'obtenir des valeurs négatives de fluorescence.

Tableau 8 : limites de détection des HAP bioaccumulés, valeurs des signaux de fluorescence mesurés dans les extraits de daphnies contaminées aux plus faibles concentrations utilisées.

1.3 Conclusion

La méthode semi-quantitative de mesure des HAP bioaccumulés a fourni des résultats concluants. Il a été possible de relier les spectres de fluorescence aux quantités de polluant accumulés pour le benzo[a]pyrène et le fluoranthène. La déformation des spectres du BaP permet une estimation qualitative de la métabolisation.

L'étude des spectres du pyrène bioaccumulé reste à approfondir, à la fois pour pouvoir affirmer que la méthode par fluorescence permet de quantifier le pyrène bioaccumulé, et aussi pour mieux comprendre les réactions chimiques qui conduisent à l'apparition du « pyrène hydrophile » que l'on observe dans l'extrait de daphnie.

Il a été possible d'observer des accumulations en quatre heures dans des milieux moyennement contaminés. Il convient de noter qu'en augmentant la durée d'exposition ou le nombre de daphnies par échantillon, il serait possible de travailler à concentrations plus faibles.

2 MESURE DE L'INFLUENCE DE LA MATIERE ORGANIQUE SUR LA BIOACCUMULATION DES HAP

L'influence de la matière organique sur la biodisponibilité a été évaluée en comparant l'accumulation des HAP dans les daphnies dans des milieux contenant ou non des MO et toujours la même concentration totale en HAP. Ce protocole a été repris des expériences de Kukkonen et al. (1990). Pour l'étude des MO biodégradables, la durée d'exposition a du être limitée afin d'éviter au maximum l'évolution du milieu (et des matières organiques) au cours de l'exposition.

Le protocole a été initialement développé pour l'analyse des MOD. Il a aussi été appliqué à l'étude des matières organiques totales (MOD et MOP).

2.1 Principe

2.1.1 Protocole expérimental

Pour chaque couple MO-HAP, entre cinq et sept milieux avec des concentrations de MO différentes sont préparés. Nous avons fixé à 1 :2 la dilution minimale de la solution mère dans l'Evian[®], afin de limiter le changement des conditions géochimiques du milieu pour les daphnies. Les concentrations maximales en CO sont de 50 mg/L.

Les concentrations en HAP dans le milieu sont en général de : 1 µg/L pour le BaP, 2 µg/L pour le pyrène et 10 µg/l pour le fluoranthène. La durée d'équilibration entre MO et HAP avant exposition a été fixée à une heure. L'exposition dure quatre 4 heures, soit une durée suffisamment faible pour permettre l'étude des matières organiques biodégradables.

Après exposition, les spectres de fluorescence des extraits de daphnies sont mesurés.

Pour chaque MO testée, nous avons constaté que les spectres de fluorescence du BaP accumulé avaient la même forme quelle que soit la concentration en MOD dans le milieu, ce qui suggère un niveau de métabolisation équivalent pour les essais avec et sans MO. Il suffit alors de comparer l'intensité à 407 nm pour avoir une estimation relative de la bioaccumulation (Article 2).

Pour les trois HAP, nous avons donc choisi l'intensité maximale (notée F) comme estimation de la bioaccumulation. F_0 étant l'intensité de fluorescence de l'extrait de daphnies exposées dans un milieu sans MO, le rapport F/F_0 est utilisé comme mesure relative de la bioaccumulation des HAP.

Remarque : Influence du méthanol ajouté pour le dopage sur la dynamique de la MO

Le dopage des solutions induit un ajout de méthanol à hauteur de 1 ‰, soit environ 375 mg/L de COD. Le méthanol est susceptible d'être dégradé par la biomasse présente dans les matières

organiques dans le milieu d'exposition, et par conséquent d'induire une forte variation des teneurs et de la qualité des MOP et MOD (autre que le méthanol).

Nous avons vérifié l'impact de l'ajout de méthanol sur la dynamique de la MO de la solution en mesurant la concentration en biomasse bactérienne dans les solutions contenant les matières organiques (algues, MOD et MOP du réacteur), ainsi que du méthanol à hauteur de 1 ‰ après quatre heures et vingt-quatre heures de contact. Cette méthode indirecte a été nécessaire, car les mesures de COD et de COP ne nous apportaient pas d'information pertinente sur la formation de nouvelles MOD ou MOP éventuellement capables de fixer les HAP, à cause de la présence de fortes quantités de méthanol.

L'estimation des teneurs en biomasse a été réalisée par analyse d'image au microscope à épifluorescence, après marquage des échantillons au DAPI. (4,6-diamino-2-phénylindole), un fluorochrome spécifique de l'ADN, et fixation des bactéries marquées sur une membrane noire en polycarbonate de porosité 0,22 µm. La membrane est montée entre une lamelle et une lame couverte d'une pellicule d'huile d'immersion (Olympus-BH2 x 1250). Vingt à vingt-cinq images sont prises pour chaque filtre avec une caméra Kappa DX20. Des images numérisées sont ensuite traitées pour estimer la biomasse à partir des zones de fluorescence. Cette technique est décrite en détails dans Dispan (2003).

Nous avons pu vérifier que la présence de méthanol dans le milieu contenant aussi des matières organiques n'induisait pas de croissance bactérienne significative durant 24 heures d'exposition. Nous avons aussi vérifié que la présence de daphnies pendant 24 heures dans un milieu n'induisait pas de « d'ensemencement » de la solution, puisque les solutions ne contenaient pas de quantités mesurables de biomasse après 24 heures (biomasse < 0.03 mg C/L).

2.1.2 Quantification de l'effet de la matière organique sur la bioaccumulation

En présence de MOD uniquement

Pour quantifier l'effet de la MOD sur la bioaccumulation dans les daphnies, nous avons repris le modèle du polluant libre selon lequel le facteur de bioconcentration (*BCF*) est proportionnel à la fraction libre de POH :

$$BCF_{MOD} = \frac{1}{1 + K_{DOC}[COD]} BCF_0 \quad \text{Equ. 19}$$

Par analogie avec la méthodologie de (Haitzer et al., 1999), nous définissons un coefficient de partition estimé *biologiquement*, $K_{DOC}(biol)$, à partir du rapport des hauteurs des pics de fluorescence F mesurées avec (F) et sans MO (F_0).

$$\frac{F}{F_0} = \frac{1}{1 + K_{DOC}(biol).[COD]} \quad \text{Equ. 20}$$

Cette relation permet d'estimer $K_{DOC}(biol)$ par régression non linéaire des données F/F_0 en fonction du COD. Dans l'Article 2, nous montrons que cette définition de $K_{DOC}(biol)$ est équivalente à celle de Haitzer, bien que la mesure soit effectuée après seulement quatre heures d'exposition, pendant la phase d'accumulation, et non à l'équilibre entre l'organisme et le milieu.

En présence de MOD et de MOP

En présence de MOP, l'ingestion de particules contaminées peut être une voie de bioaccumulation. Les résultats de bioaccumulation en présence de MOD et MOP ont été interprétés en supposant une cinétique d'accumulation du premier ordre par contact direct et voie trophique (comme McCarthy (1983) l'a vérifié précédemment pour les daphnies).

$$\frac{dC_{org}}{dt} = k_u C_{libre} + k_i C_{MOP} - k_d C_{org} \quad \text{Equ. 21}$$

En supposant que le BaP dans le milieu est réparti à l'équilibre entre les formes libre, fixée sur les MOD (coefficient de partition K_{DOC}) et fixée sur les MOP (coefficient de partition K_{POC}), le rapport des concentrations bioaccumulées en présence ou non de matière organique s'exprime donc en fonction des constantes de partition K_{DOC} , K_{POC} et des coefficients d'accumulation par contact direct (k_d) et par voie trophique (k_i) :

$$\frac{C_{daph,OM}}{C_{daph,0}} = \frac{F}{F_0} = \frac{1 + \frac{k_i}{k_u} K_{POC} [COP]}{1 + K_{DOC} [COP] + K_{POC} [COP]} \quad \text{Equ. 22}$$

De façon similaire à l'étude du compartiment dissous, une régression non linéaire permet, à partir du rapport F/F_0 , d'estimer $K_{POC}(biol)$ et $K_{DOC}(biol)$, ainsi que le rapport des constantes d'accumulation par voie trophique et par contact k_i/k_r .

Les régressions non linéaires ont été effectuées à l'aide du logiciel XLStat, fonctionnant avec Excel. Il utilise la méthode de Levenberg-Marquadt. L'algorithme d'optimisation permet aussi de calculer les écart-types locaux sur les paramètres optimisés à partir des dérivées secondes de la fonction (en supposant la distribution des erreurs pour les données gaussienne).

2.2 Validité de la méthode

2.2.1 Exemple de résultats : en présence de matière organique dissoute

La Figure 13 montre deux exemples de résultats d'expérience. La matière organique étudiée dans ce cas est composée d'acides humiques commerciaux Aldrich, très hydrophobes et stables, ou d'extraits d'algues fraîches (MOD biodégradable). L'effet de réduction de la bioaccumulation par la matière organique est confirmé dans cette expérience. L'équation hyperbolique (Equ. 20) optimisée permet une bonne simulation de la réduction de la bioaccumulation.

La mesure de $K_{DOC}(biol)$ pour les acides humiques commerciaux Aldrich, largement utilisés, a permis de montrer une bonne concordance des valeurs obtenues par cette méthode aux valeurs de K_{DOC} obtenues dans d'autres études à partir de techniques physico-chimiques (Article 2).

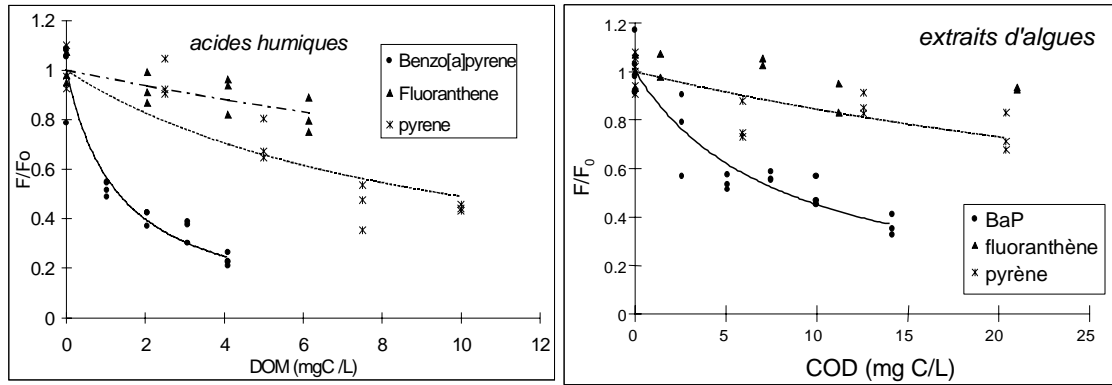


Figure 13 : bioaccumulation en présence d'acides humiques (gauche) et d'extraits d'algues (droite). Concentrations nominales en HAP dans le milieu : 1 µg/L (BaP), 2 µg/L (pyrène) et 25 µg/L (fluoranthène)

Divers modèles de MOD susceptibles d'être présentes dans les écosystèmes urbains ou anthropisés ont été testés. Les constantes de partition $K_{DOC}(biol)$ estimées à partir des données de bioaccumulation pour ces MO sont données dans le Tableau 9. Pour les MOD « anthropiques », l'effet de réduction est plus limité que l'effet des acides humiques, il peut être néanmoins significatif.

La diminution de la bioaccumulation est importante pour le BaP alors qu'elle est plus limitée pour le pyrène et le fluoranthène. Il est possible d'estimer $K_{DOC}(biol)$ pour le BaP et le pyrène et toutes les MO. Aux concentrations testées, la bioaccumulation de fluoranthène n'est affectée significativement que par les acides humiques.

| Valeurs de $K_{DOC}(biol)$ ($\times 10^4$ L/kg) | Fluoranthène | Pyrène | Benzo[a]pyrène |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|
| Acides Humiques Aldrich | 3,4 (\pm 1,1) | 10,4 (\pm 2,3) | 75,6 (\pm 3,2) |
| Substrat (Viadox) | 0,18 (\pm 0,5) | 2,8 (\pm 0,9) | 6,2 (\pm 1,7) |
| Eau extraite de boues de STEP | 1,0 (\pm 2,7) | 4,3 (\pm 1,7) | 33,2 (\pm 1,6) |
| Extraits algaux frais | 0,41 (\pm 0,7) | 1,8 (\pm 1,0) | 12,1 (\pm 1,6) |
| Extraits algaux dégradés | | 6,0 (\pm 1,5) | 34,4 (\pm 3,2) |

Tableau 9 : constantes de partition $K_{DOC}(biol)$ ($\times 10^4$ L/kg) estimées pour diverses MOD

2.2.2 Critique et limites de la mesure

2.2.2.1 Critique sur les hypothèses du modèle

Spéciation « écotoxicologique » des HAP

La méthode proposée ici ne permet pas exactement une spéciation entre un état dissous et un état fixé du polluant. L'interprétation de cette estimation en termes de partition dissous-fixé doit rester limitée. Elle est une méthode indirecte d'estimation de l'état de la biodisponible du polluant, basée sur l'hypothèse d'un équilibre de partage entre une « phase » biodisponible et une phase non biodisponible. Bien que moins rigoureuse d'un point de vue chimique, cette approche

permet cependant d'intégrer dans l'étude de la biodisponibilité les composantes biologiques liées à la physiologie de l'organisme étudiée.

Variation des concentrations en HAP dans les milieux d'exposition

Le modèle utilisé suppose que le milieu est stable, à l'équilibre, et que la bioaccumulation dans les daphnies ne modifie pas le milieu.

Une estimation de la quantité de BaP accumulée dans les daphnies sur vingt-huit solutions d'exposition sans MO à 1 µg/L de BaP montre que les daphnies accumulent en moyenne 5% (± 2%) du BaP initialement mis en solution. Cette faible valeur nous permet de valider l'hypothèse que la bioaccumulation par les daphnies ne modifie pas significativement l'équilibre du milieu.

Nous avons aussi pu mesurer qu'après quatre heures d'exposition, la concentration en BaP dans le milieu était de 61% (± 10%, n=17) la concentration initiale, indépendamment de la présence ou non de daphnies et de MOD. La teneur en HAP dans le milieu n'est donc pas constante au cours de l'exposition. Cette observation est très courante pour l'étude des HAP en solution aqueuse car une partie du HAP disparaît par absorption sur les parois des béchers ou volatilisation (McCarthy, 1983; Gauthier et al., 1986; Miller, 1999). La teneur en HAP en revanche ne semble pas varier d'un bécher à l'autre pour une même durée d'exposition. La variation de la bioaccumulation dans les daphnies n'est donc due qu'à la présence de MOD et non à une variation de la concentration totale en BaP d'un bécher à l'autre.

Linéarité de l'isotherme de sorption

Les concentrations en HAP utilisées dans ces expériences sont près de 100 fois supérieures aux concentrations environnementales. Ces fortes concentrations sont nécessaires pour pouvoir observer une bioaccumulation significative dans les daphnies même en présence de fortes quantités de MOD. Nous n'avons pas vérifié la variabilité de $K_{DOC}(biol)$ en fonction de la concentration en HAP.

De même, l'hypothèse d'un équilibre de partage du HAP entre eau et MOD suppose que la constante K_{DOC} est indépendante de la concentration en MOD. Cette hypothèse se traduit par l'ajustement des données de réduction de la bioaccumulation à un modèle hyperbolique.

Pour tester la validité de cette hypothèse nous avons calculé une constante de partage pour chaque concentration en MOD à partir des données de bioaccumulation de l'Article 2 :

$$K_{DOC} = \frac{F_0/F - 1}{[DOC]} \quad \text{Equ.23}$$

Comme l'illustre la Figure 14, la variabilité des $K_{DOC}(biol)$ estimés à partir d'un seul point de mesure est évidemment grande (écart moyen de 39%, médian de 27%, qui peut atteindre 151%), ce qui confirme l'intérêt d'utiliser plusieurs valeurs de COD et une procédure d'ajustement non-linéaire pour estimer correctement ce paramètre. Cependant, nous n'observons pas de tendance d'évolution de K_{DOC} en fonction de la concentration en COD, à l'exception de trois cas particuliers pour lesquels K_{DOC} diminue avec la teneur en COD (BaP et Viandox, pyrène et acides humiques ou effluent de pilote de STEP).

Un modèle de partage plus général de type Freundlich permettrait de prendre en compte une éventuelle non linéarité de l'isotherme. Cependant n'avons pas, dans cette étude, les données

nécessaires pour estimer le nouveau paramètre introduit et améliorer sensiblement la modélisation. Nous avons donc conservé pour la suite l'hypothèse de la linéarité de l'isotherme de sorption, et donc estimé un seul coefficient de partition $K_{DOC}(biol)$ à partir des réductions de bioaccumulation observées..

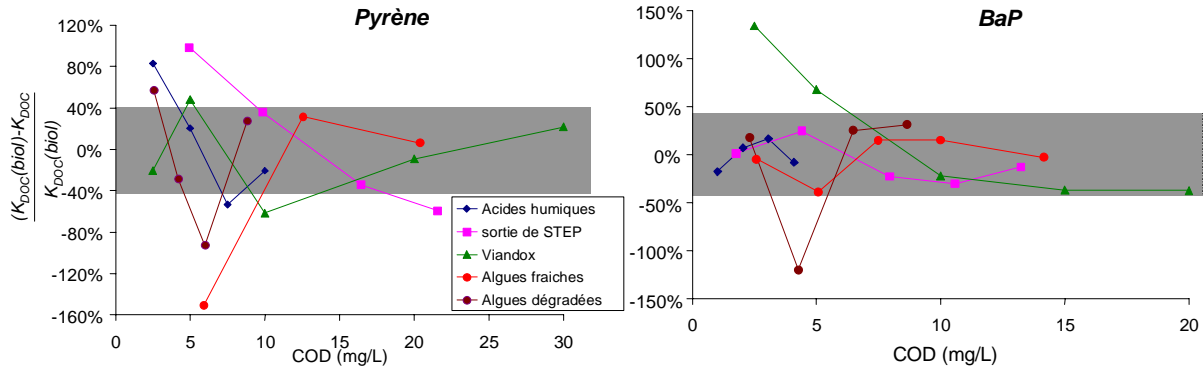


Figure 14 : Ecart relatif entre $K_{DOC}(biol)$ et K_{DOC} estimé à partir de F/F_0 pour chaque COD. En hachuré est indiquée l'erreur attendue, compte tenu de l'erreur de 15% sur la mesure de F/F_0 .

2.2.2.2 limites « numériques » de la méthode

La réduction de bioaccumulation doit être significative pour pouvoir estimer un coefficient de partage. Ainsi, une réduction minimale de la bioaccumulation de 20 % implique que le produit $K_{DOC}(biol).[COD]$ soit au minimum de 0.25. Les teneurs en COD dans les milieux d'exposition sont de l'ordre de la dizaine de mg/L, il faut donc un $K_{DOC}(biol)$ au minimum de $2,5 \times 10^4$ L/kg. Cette méthode est donc envisageable uniquement pour des constantes de partage élevées. Au cours de nos expériences, la réduction de la bioaccumulation (du fluoranthène en particulier) était parfois trop faible pour mesurer une constante de partage (Article 2).

D'autre part, le critère utilisé pour l'optimisation des paramètres est la minimisation des carrés des écarts entre observations et simulations, qui donne implicitement une importance plus grande aux fortes valeurs, obtenus ici pour les faibles concentrations en MOD. Le coefficient $K_{DOC}(biol)$ est donc largement défini par les points aux faibles valeurs de COD. L'estimation de $K_{DOC}(biol)$ sera donc d'autant plus fiable que l'on aura pu mesurer des effets de réduction de la bioaccumulation significatifs mais modérés (données F/F_0 entre 0.3 et 0.8).

2.3 Conclusion

La méthode développée pour l'étude de l'impact des matières organiques sur la biodisponibilité des HAP a permis de quantifier l'influence des MOD au travers de l'estimation de $K_{DOC}(biol)$. Cette méthode est compatible avec les particularités liées aux matières organiques anthropiques, biodégradables.

Cette première partie nous a aussi conduit à privilégier le benzo[a]pyrène comme molécule modèle pour la suite, car les matières organiques anthropiques testées sur ce composé avaient toutes un impact fort sur sa biodisponibilité.

INFLUENCE DES MATIERES ORGANIQUES SUR LA BIODISPONIBILITE : IMPORTANCE DE LA BIODEGRADABILITE

Les modèles de fonctionnement écologique des écosystèmes aquatiques et de qualité d'eau utilisent la biodégradabilité comme une des caractéristiques principales de la matière organique. La dégradation hétérotrophe est en effet un des premiers maillons de la chaîne trophique et un des processus qui affectent le plus la qualité de l'eau.

Dans le but de pouvoir modéliser la biodisponibilité des polluants dans le milieu aquatique en tenant compte de la dynamique de la MO, nous avons cherché à relier l'état de biodégradabilité de la matière organique à sa capacité à interagir avec les polluants organiques hydrophobes. L'objectif, à terme, est de prédire l'exposition des organismes aux POH, connaissant les caractéristiques du milieu et en particulier la qualité de la MO.

Nous nous intéressons surtout aux MO des milieux anthropisés, qui diffèrent des MO naturelles par leur origine, leur composition et leur biodégradabilité. Elles sont en général moins hydrophobes, et sont susceptibles d'évoluer dans le milieu. Leur impact sur la biodisponibilité des polluants doit être mieux évalué car les milieux anthropisés sont aussi les plus soumis aux rejets de micro-polluants divers.

Ce chapitre présente dans un premier temps l'étude expérimentale mettant en évidence une relation entre l'origine de la MO, sa biodégradabilité et sa capacité à interagir avec le BaP. Nous avons cherché à obtenir des MO de biodégradabilité décroissante, provenant d'un même substrat initial et d'analyser leur influence sur la biodisponibilité du BaP. Les résultats de ces études font l'objet de l'Article 3 (en ce qui concerne la MOD) et de l'Article 4 (résultats pour les MOP).

Dans une seconde partie, nous développons la modélisation de la biodisponibilité des polluants au fur et à mesure que la MO présente se dégrade. Cette modélisation est basée directement sur les résultats de la partie expérimentale.

1 ETUDE EXPERIMENTALE

1.1 Matériels et méthodes

1.1.1 Matières organiques utilisées

Deux substrats ont été testés. Ils ont été choisis comme modèles de MO présentes dans les eaux anthropisées : rejets domestiques et MO produite lors des phénomènes d'eutrophisation :

- matières organiques algales (modèle de MO autochtone) provenant de la souche *Selenastrum capricornutum* (ou *Pseudokirchneriella subcapitata*). Pour l'étude du compartiment dissous, les extraits d'algues ont été obtenus après lyse de cellules par passage à l'autoclave.
- matières organiques issues de la dégradation d'un substrat mimant un effluent domestique (Viandox[®] dilué, modèle de MOD allochtone). Le Viandox est un « jus de viande » de synthèse, composé principalement de sucres et de protéines. Le choix du Viandox a été fait en référence au protocole utilisé au Cemagref pour l'alimentation des pilotes de stations d'épuration (Pernelle et al., 2001; Tusseau-Vuillemin et al., 2002). C'est en effet un substrat dont la dégradation est proche de celle des eaux usées domestiques.

Plusieurs raisons justifient de travailler sur des substrats modèles plutôt que des matrices réelles :

- intérêt d'avoir des expériences reproductibles
- intérêt de séparer les deux sources de matière organique, algale et urbaine
- nécessité d'avoir des MO non contaminées par des produits pouvant induire des effets toxiques (présence de métaux lourds ou d'ammonium dans les eaux de STEP par exemple), tout en évitant les protocoles lourds d'extraction sur résine des MOD
- besoin d'avoir des solutions concentrées en carbone organique pour pouvoir effectuer des dilutions dans les milieux d'exposition tout en ayant des teneurs en COD ou COP assez élevées pour observer un effet sur l'accumulation (ce qui ne serait pas possible sur des effluents réels contenant de l'ordre de 10mg/L de COD seulement).

1.1.2 Protocole

L'étude s'est déroulée en deux étapes : nous avons d'abord étudié uniquement la MOD, afin de ne considérer que l'accumulation par contact direct et d'éviter la bioaccumulation par voie trophique. Puis nous avons pris en considération l'influence de la MOP sur la bioaccumulation, et par conséquent pris en compte la contamination via l'ingestion de particules.

Etude de la MOD (Article 3).

Pour obtenir des MOD de biodégradabilités décroissantes de la même origine, environ cinq litres de substrat ont été inoculés avec des boues de station d'épuration (quelques mL). Au préalable, un inhibiteur de nitrification (formule 2533, Hach, Floriffoux, Belgique) a été ajouté aux boues activées afin d'éviter l'oxydation de l'azote réduit dans le réacteur. La biodégradation a été suivie

en réacteur de 7 L thermostaté à 15°C pendant deux semaines. Le réacteur a été échantillonné régulièrement. Les échantillons issus du réacteur à différents temps de dégradation étaient filtrés, caractérisés par mesure de l'absorption spécifique à 254 nm (SUVA), et utilisés pour l'analyse de l'influence de la MOD sur la bioaccumulation du benzo[a]pyrène (mesure de $K_{DOC}(biol)$).

Etude de la MOP (Article 4).

Pour l'étude de l'influence de la MOP, des algues fraîches et des MOP d'origine bactériennes ont été utilisées. Les algues provenaient de la culture de *S. capricornutum* maintenue au laboratoire, alors que les échantillons d'origine bactérienne provenaient du réacteur contenant du Viadox en cours de dégradation. Dans ce dernier cas, la MO était donc constituée de bactéries de boues activées, de biomasse détritique et du substrat initial en cours de dégradation ; deux prélèvements ont été effectués : le 3^{ème} jour et le 7^{ème} jour de la dégradation.

A partir des échantillons, les constantes de partition $K_{POC}(biol)$ et $K_{DOC}(biol)$, ainsi que le rapport des constantes d'accumulation par voie trophique et par contact k_f/k_r ont été estimés (Equ. 22).

1.1.3 Caractérisation de la matière organique

La biodégradation de la MO dans le réacteur a été suivie par mesures du COD et du COP. L'absorbance spécifique à 254 nm (SUVA) a été évaluée sur les MOD.

La consommation d'oxygène (Oxygene Uptake Rate, OUR) par les bactéries hétérotrophes a aussi été suivie. Elle est calculée à partir des données de concentrations en oxygène dans le réacteur au cours des périodes d'arrêt de l'aération (Figure 15). L'homogénéisation du réacteur est faite par un agitateur dont la vitesse de rotation est optimisée de façon à ce que la solution en cours de dégradation soit homogène tout en limitant les turbulences qui favorisent la réaération de surface et perturbent le bilan d'oxygène. Afin d'éviter l'anoxie, le réacteur est réaéré quand la concentration en O_2 descend en dessous d'une valeur seuil (Figure 15) Ce protocole a été développé au Cemagref d'Antony et a été validé sur des substrats artificiels (Tusseau-Vuillemin et al., 2002) ou des effluents réels (Lagarde, 2003).

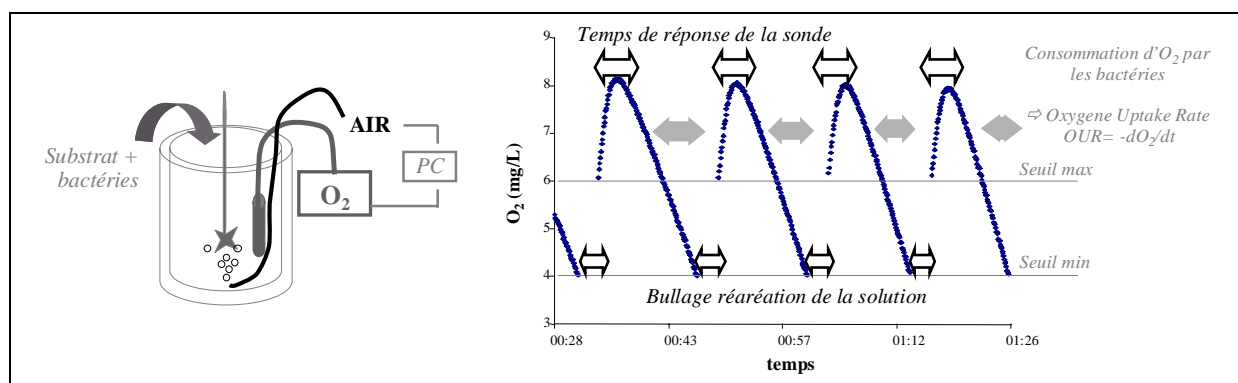


Figure 15 : Principe de fonctionnement du réacteur ouvert et méthode d'estimation de la consommation d'oxygène par les bactéries (Oxygène Uptake Rate, OUR)

Méthode numérique d'estimations des OUR

A partir des teneurs en oxygène mesurées dans le réacteur toutes les 5 secondes, les OUR ont été estimées en utilisant un programme qui effectue la dérivation point par point et le lissage des OUR obtenues.

L'estimation des OUR peut comporter plusieurs artéfacts liés au protocole. En particulier :

- *La ré-aération de surface* peut apporter un artéfact dans l'estimation des OUR. L'apport d'O₂ par la surface est proportionnel à la différence entre les concentrations actuelles et de saturation en O₂ : $dO_2/dt = K.(C_s-C)$. Une estimation expérimentale a conduit à une ré-aération de 1,2 mg/L/h dans réacteur contenant 2,5L d'eau claire à 4 mg/L d'O₂. Cette valeur est réduite de 50% pour les eaux usées chargées (Safronieva, 2001) et diminue aussi quand le volume dans le réacteur augmente. Dans l'estimation des valeurs d'OUR à partir des concentrations en O₂, la réaération de surface est prise en compte avec un coefficient de transfert K entre 0 et 0,1 h⁻¹ selon le volume dans le réacteur et une concentration de saturation de 10 mg/L (ce qui conduit à une correction des OUR entre 0 et 0,6 mg/L/h)
- *le temps de réponse des sondes à l'oxygène* peut aussi jouer un rôle important dans l'estimation des OUR. Il peut être estimé comme la durée nécessaire pour la sonde à passer d'une mesure de 0 mg/L à 90% de la mesure dans l'air à partir du moment où la sonde passe de la solution anoxique (solution de sulfite de sodium) à l'air. Pour l'appareil étudié, il est d'environ 2 minutes 30s. Ce temps de réponse élevé permet d'être peu sensible aux parasites mais implique aussi que la sonde ne mesure pas correctement l'oxygène quand les concentrations évoluent rapidement. Ainsi au cours de la ré-aération, les sondes ne peuvent pas mesurer correctement les teneurs en oxygène qui montent trop vite. C'est pourquoi les teneurs en O₂ mesurées continuent d'augmenter après l'arrêt de la ré-aération. Dans l'estimation des OUR, les cinq premières minutes d'enregistrement de chaque séquence étaient donc en général éliminées de l'analyse afin d'écarter les données d'oxygène biaisées par le temps de réponse de la sonde. Il est cependant arrivé que la dégradation soit si rapide que la durée entre deux ré-aération soit inférieure à cinq minutes. Ainsi, au plus rapide de la dégradation du Viandox, les teneurs en oxygène peuvent passer de 6 à 4 mg/L en moins de 2 minutes. Dans ce cas, seule la première minute de données après l'arrêt de la ré-aération a été écartée. Les OUR estimées pour ces pics de dégradation pourraient donc être biaisées (sous-estimées) par la réponse trop lente de la sonde.

1.2 Résultats

1.2.1 Caractérisation des matières organiques

Les profils de dégradation des deux substrats sont similaires (Figure 16). Après un palier, attribuable à l'adaptation des boues activées au substrat et à l'initialisation du processus de dégradation, la décroissance du COD est très rapide, et coïncide avec la croissance du COP et de la consommation d'oxygène. Cette phase correspond à la biodégradation de la matière organique rapidement dégradable couplée à une forte croissance bactérienne, observable par l'augmentation du COP et de la consommation d'oxygène.

Après cette phase de dégradation rapide, la consommation d'oxygène chute, la diminution du COD devient plus lente et le COP diminue. Cette deuxième phase correspond à la biodégradation des MOD plus lentement dégradables, et à la mortalité et au recyclage des bactéries. Les bactéries hétérotrophes s'alimentent des bactéries mortes (respiration endogène) et des matières organiques du substrat plus lentement biodégradables.

L'OUR pour les algues a été évaluée seulement sur les deux premiers jours. Au-delà, les OUR étaient trop faibles et la ré-aération de surface compensait la consommation d'O₂ par les bactéries hétérotrophes. Pour la dégradation du Viandox, les OUR ont été estimées pour les quatre premiers jours.

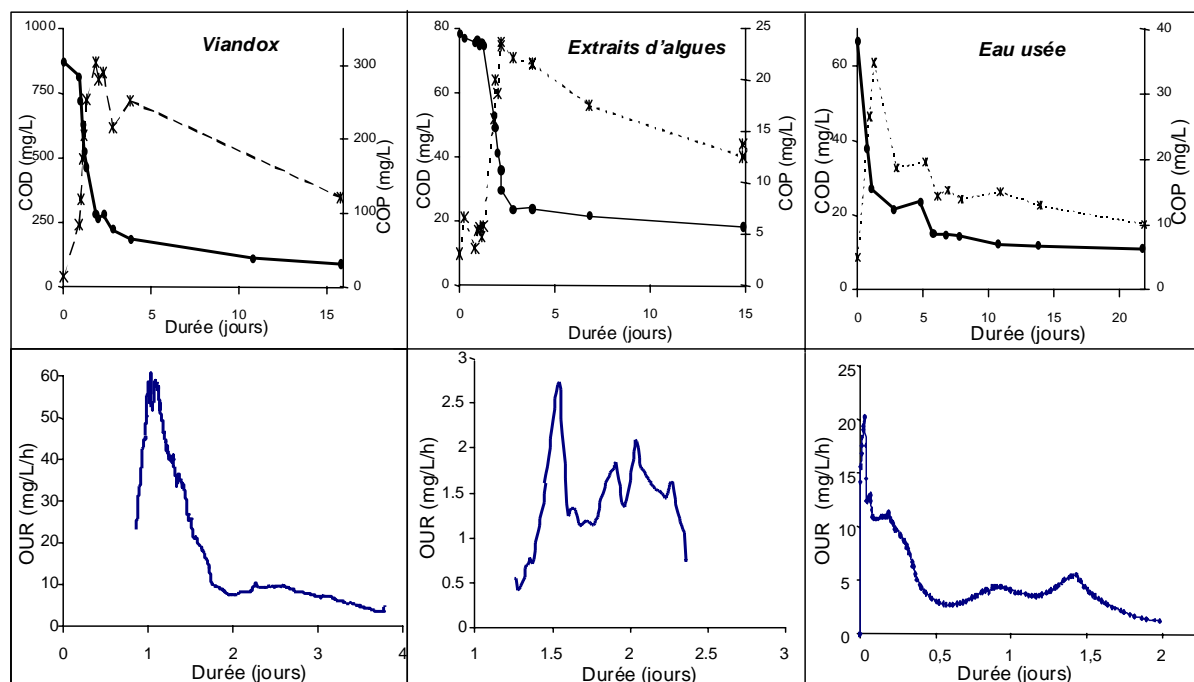


Figure 16 : dégradation du Viandox (gauche) des extraits d'algues (milieu) et d'une eau usée filtrée (droite): évolution des teneurs en carbone (haut) et de la consommation d'oxygène par les bactéries hétérotrophes (OUR, bas)

Les profils de dégradation des eaux usées filtrées réelles sont similaires pour les OUR et pour les concentrations en MO, à l'exception du palier en début d'expérience qui n'est pas présent pour les eaux usées. Les boues activées sont très vraisemblablement adaptées aux effluents domestiques et il est probable que, même filtrée, l'eau usée contient des bactéries hétérotrophes qui initient le processus de dégradation.

Aromaticité des matières organiques dissoutes

Le suivi de l'aromaticité des matières organiques dissoutes des eaux usées domestiques en cours de dégradation a confirmé que les rejets urbains devenaient de plus en plus aromatiques au fur et à mesure de leur dégradation (Figure 17). La même tendance a été observée avec le Viandox, ce qui renforce par ailleurs la similitude entre cet effluent artificiel et une « vraie » eau usée.

Au contraire, l'absorbance spécifique des extraits d'algues est très faible et diminue légèrement au cours de la biodégradation (Figure 17). Ces observations confirment le caractère peu aromatique de la MOD d'origine autochtone (Zumstein et Buffle, 1989; Sun et al., 1997; Imai et al., 2001). La

très faible absorbance des molécules algales réfractaires est en partie attribuable à la forte présence des molécules aliphatiques peu dégradables issues des parois algales (Derenne et al., 1992; Allard et al., 1998).

Les valeurs de SUVA de cette étude sont en accord avec les valeurs observées dans des eaux anthropiques : par exemple entre 8 et 24 $\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ pour divers effluents de STEP (Imai et al., 2002). Elles sont aussi globalement inférieures aux valeurs typiques des substances humiques très aromatiques : Haitzer et al. (1999) mesurent des SUVA entre 27 et 62 $\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ pour divers acides humiques ou fulviques.

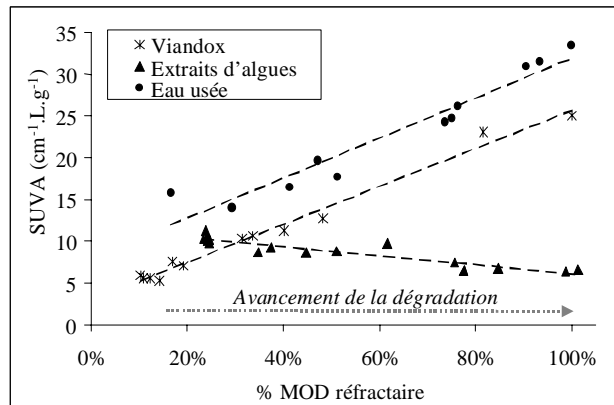


Figure 17 : évolution de l'absorbance spécifique UV (SUVA) des MOD en fonction de leur origine et de leur état de biodégradation. En abscisse est indiquée la fraction réfractaire restant dans la matière organique au fur et à mesure de biodégradation (détails de calculs dans l'Article 3).

Remarque : absorbance UV et nitrates.

La mesure d'absorbance à 254 nm peut être perturbée par la présence de nitrates (Leenheer et Croué, 2003). Nous avons pu mesurer que l'absorbance UV d'une solution de 44 mg/L de NO_3^- était de 0,0114 $\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{g}^{-1}$, ce qui conduirait à une surestimation d'une unité de SUVA pour un échantillon à 11,4 mg/L de COD. La présence de nitrates est donc susceptible de perturber significativement la mesure d'absorbance et de conduire à une surestimation du SUVA.

Au cours de nos expériences, nous n'avons pas mesuré la teneur en nitrates dans les réacteurs. Nous pouvons cependant faire une estimation grossière de ces teneurs, et du biais éventuel sur la mesure de SUVA, en supposant une relation linéaire et additive entre l'absorbance de la solution et les concentrations en NO_3^- et COD.

- Dans le Viandox, les nitrates sont d'environ 6 mg/L (J.M. Choubert, Cemagref, communication personnelle). Il est dilué 100 fois dans l'Evian (à env. 2 mg/L de nitrate). Les bactéries nitrifiantes dans les boues activées ayant été inhibées, les teneurs en nitrates dans le réacteur dégradant le Viandox restent très faibles par rapport au COD et ne doivent vraisemblablement pas influencer les mesures de SUVA.
- la concentration initiale en NO_3^- dans les milieux de culture des algues est de 124 mg/L. Une estimation des teneurs en nitrates dans la solution d'extraits algaux initiale peut être obtenue à partir du rapport de Redfield sur la composition des algues (C :N :P : = 106 :16 :1 molaire). Les teneurs en carbone organique d'origine algale dans la solution initiale sont d'au moins 78 mg C/L (COD initial dans le réacteur), les algues ont assimilé au moins 45 mg/l de nitrates du milieu. La teneur en nitrates dans la solution utilisée pour l'expérience peut donc être

évaluée à environ 80 mg/L. Par ailleurs, la concentration minimale en COD est de 18 mg/L. Par conséquent, les nitrates surestiment le SUVA d'au maximum $1,2 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{g}^{-1}$. Cette erreur renforce par ailleurs le caractère non aromatique des résidus algaux, puisque la très faible valeur de SUVA mesurée est en plus surestimée.

1.2.2 Influence des MOD sur la bioaccumulation (Article 3)

Pour les deux types de substrats, les matières organiques dissoutes fraîches ou dégradées réduisent significativement (de plus de 20%) la bioaccumulation de BaP par les daphnies à moins de 6 mg/L de COD. De plus, la capacité à influencer la biodisponibilité du BaP augmente avec l'état de dégradation de la MOD (Figure 18). Les coefficients de partage $K_{DOC}(biol)$ atteignent $35 \times 10^4 \text{ L/kg}$ pour le Viandox dégradé et $22 \times 10^4 \text{ L/kg}$ pour les algues (pour comparaison, $K_{DOC}(biol)$ pour les acides commerciaux Aldrich a été estimé à $76 \times 10^4 \text{ L/kg}$).

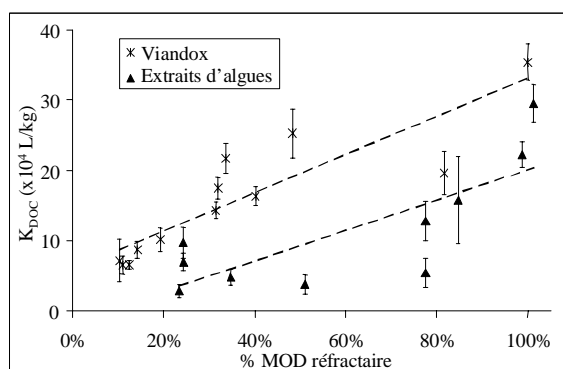


Figure 18 : Evolution de la capacité de la MOD à réduire la bioaccumulation ($K_{DOC}(biol)$) en fonction de son origine et de son état de biodégradation.

L'augmentation de l'affinité du BaP pour la MOD au cours de sa dégradation peut être expliquée par la relative résistance à la biodégradation des macro-molécules hydrophobes ayant une grande capacité de fixation du BaP comparativement aux molécules plus petites, plus facilement dégradables, et fixant moins le BaP. Les produits microbiens solubles (« Soluble Microbial Products », SMP) formés par l'activité de la biomasse qui apparaissent au cours de la dégradation (Rittmann et al., 1987; Barker et Stuckey, 1999) peuvent aussi expliquer l'augmentation des interactions. Nous avons montré que les SMP formés au cours de la biodégradation du glucose avaient une forte capacité à influencer la biodisponibilité du BaP ($K_{DOC}(biol) = 25 \times 10^4 \text{ L/kg}$, Article 3).

Nous n'avons pas pu montrer de relation univoque entre l'aromaticité de MOD et leur capacité à interagir avec le BaP. Pour les extraits algaux en particulier, nous obtenons une anti-corrélation entre $K_{DOC}(biol)$ et $SUVA$. Ces résultats peuvent être attribués à la présence dans les extraits algaux réfractaires de sites hydrophobes propices aux interactions avec les HAP, tout en ne présentant pas de structure aromatique. Ces résultats sur des MOD confirment les observations déjà faites pour les matières organiques particulières extraites de végétaux et d'algues (Chefetz et al., 2000; Salloum et al., 2002) et montrent les limites des relations entre les coefficients de

partage K_{DOC} et les caractéristiques d'aromaticité établies pour les substances humiques et les MOD des eaux naturelles (Chin et al., 1997; Haitzer et al., 1999).

1.2.3 Influence de la MOP (Article 4)

La présence d'algues induit une forte diminution de la bioaccumulation (Figure 19) : la bioaccumulation sur 24 heures est diminuée de 99% en présence de 6×10^5 cell/mL d'algues. Les algues étant par ailleurs quasi uniquement particulaires ($[COD] < 1$ mg/L dans toutes les solutions d'exposition, Article 4) nous avons négligé pour la suite la fixation du BaP sur la MOD dans les essais conduits en présence d'algues.

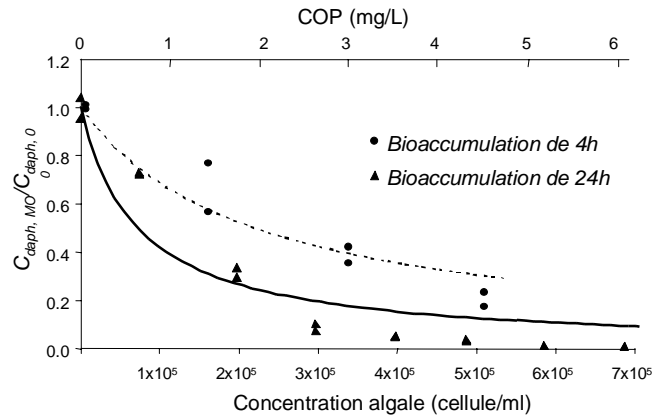


Figure 19 : bioaccumulation relative de BaP en présence de matière organique d'origine algale

Les échantillons provenant du réacteur contenant au départ du Viandox, contiennent finalement des MOD et des MOP. C'est pourquoi deux types d'essais de bioaccumulation (avec MOD seulement et avec des MO de l'ensemble de l'échantillon) ont été menés en parallèle, afin de pouvoir discerner l'influence des MOP de celle des MOD. Pour ces expériences, la présence de MOP accentue la diminution de bioaccumulation déjà observée en présence de MOD, comme le montre la Figure 20. Par exemple, la présence de 7,2 mg/L de COD induit une diminution de 45% de la bioaccumulation de BaP en quatre heures dans les daphnies. A partir de la même dilution de l'échantillon du réacteur non filtré, (qui amène 2,1 mg/L de COP dans le milieu), la diminution de la bioaccumulation atteint 69%.

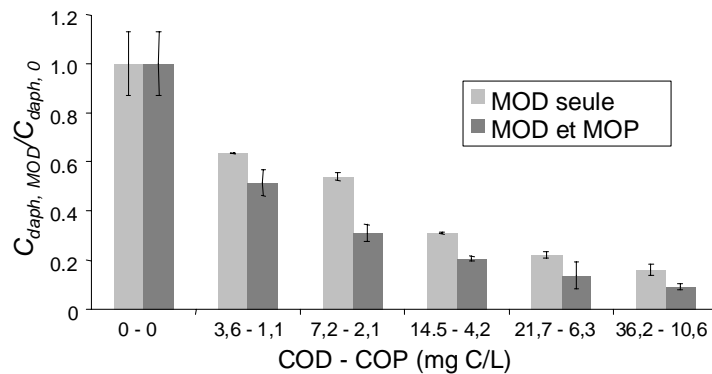


Figure 20 : bioaccumulation relative de BaP en présence de matière organique issue du réacteur dégradant du Viandox (échantillonné au 3^{ème} jour de dégradation). Gris clair : bioaccumulation en présence de MOD uniquement (dilution de l'échantillon filtré). Gris foncé : bioaccumulation en présence de MOD et de MOP (même dilution, échantillon brut)

Comme l'avait observé précédemment McCarthy (1983) en étudiant la bioaccumulation en présence de levures, nous confirmons ici que la MOP joue un rôle de piège du BaP pour les daphnies.

Il a été possible d'estimer les coefficients de partage à partir des données de bioaccumulation. La minimisation des écarts au modèle a conduit à estimer une constante d'ingestion k_i nulle pour toutes les régressions. Ainsi, nos données couplées au modèle prédisent qu'il n'y a pas d'accumulation mesurable de BaP par voie trophique. Le suivi des concentrations en algues sur 24 heures montre cependant que les daphnies ingèrent les particules. Il semble donc que le BaP ingéré ne soit pas assimilé par l'organisme. Cette conclusion est malheureusement difficilement comparable aux données bibliographiques. En effet, il apparaît que l'assimilation des HAP est très variable selon les organismes considérés (Wang et Fisher, 1999). Concernant l'assimilation des HAP dans les daphnies, nous n'avons pu relever qu'une seule étude (celle de McCarthy, 1983) dans laquelle l'assimilation du BaP ingéré était estimée à 20%.

Les constantes de partition $K_{POC(biol)}$ évaluées sont de 16×10^4 et 46×10^4 L/kg pour les MOP issues du réacteur dégradant du Viadox et prélevées au troisième et septième jour de dégradation (essentiellement de la biomasse plus ou moins auto-lysée) et de $49 - 149 \times 10^4$ L/kg pour les algues (selon que l'on considère l'accumulation en quatre ou vingt-quatre heures).

1.2.4 Validité et limites des estimations de K_{DOC} et K_{POC}

Nous avons vérifié que les concentrations en MOD et en MOP n'évoluaient pas significativement au cours des expositions de quatre heures (Article 3 et Article 4). Nous pouvons donc supposer que les milieux d'exposition sont à l'équilibre sur cette période (stabilité des MO, en équilibre avec le BaP). Les données de bioaccumulation en quatre heures sont bien modélisées par le modèle hyperbolique « du polluant libre », la MOD comme la MOP rendant le BaP moins biodisponible.

L'expérience de bioaccumulation en présence d'algues réalisée sur une durée de vingt-quatre heures est cependant plus difficile à interpréter. Pour ces résultats, le modèle hyperbolique ne semble pas adapté aux résultats expérimentaux, et l'on a observé une forte évolution des concentrations en matières organiques, en grande partie du fait de l'ingestion des algues par les daphnies.

Plusieurs hypothèses pouvant expliquer les résultats sur l'influence des algues sur la bioaccumulation en vingt-quatre heures sont proposées et discutées dans l'Article 4. Les expériences menées au cours de cette thèse ne permettent pas cependant de comprendre les phénomènes physico-chimiques qui modulent la répartition du BaP dans le milieu et la toxicocinétique du BaP au cours de la bioaccumulation en vingt-quatre heures en présence d'algues. L'évolution des concentrations et de la qualité de la matière organique au cours des vingt-quatre heures, et la répartition du BaP dans ce milieu doivent être plus approfondies. Le rôle apparemment négligeable de la voie trophique doit aussi être confirmé.

1.3 Conclusion

La partie expérimentale a permis de montrer que l'on pouvait quantifier l'impact de la MOD et de la MOP sur la biodisponibilité du BaP au moyen de constantes de partition déterminées biologiquement. La bioaccumulation du BaP est fortement influencée par des teneurs en matières organiques semblables aux concentrations environnementales de rivières ou de lacs. Nous avons aussi montré une relation entre l'état de biodégradabilité des MO et leur capacité à moduler la biodisponibilité du BaP. Les constantes de partition K_{DOC} augmentent systématiquement avec le vieillissement de la matière organique. Après quelques jours de dégradation seulement, la capacité de la MO à interagir avec les POH se rapproche déjà de celle des acides humiques ou fulviques, alors que ces derniers se constituent sur des échelles de temps beaucoup plus élevées.

La démarche employée pour cette étude donne une vision macroscopique des relations entre répartition et biodisponibilité. La répartition du polluant dans le milieu n'y est pas abordée d'un point de vue chimique, mais elle permet une estimation des formes biodisponibles du polluant dans le milieu en tenant compte pour partie de l'évolution des caractéristiques des matières organiques. Un exemple d'application est illustré dans la Figure 21 (Article 4). La répartition du BaP entre les phases aqueuse, MOD et MOP est estimée dans différents milieux modèles à partir des coefficients de partage obtenus. Cet exemple illustre que, selon les caractéristiques, l'origine et les concentrations en MO dans le milieu, la biodisponibilité du BaP pour les daphnies peut varier très fortement : 1% seulement du BaP total est biodisponible dans le réseau d'assainissement alors que 20% est biodisponible dans une rivière en fin de bloom.

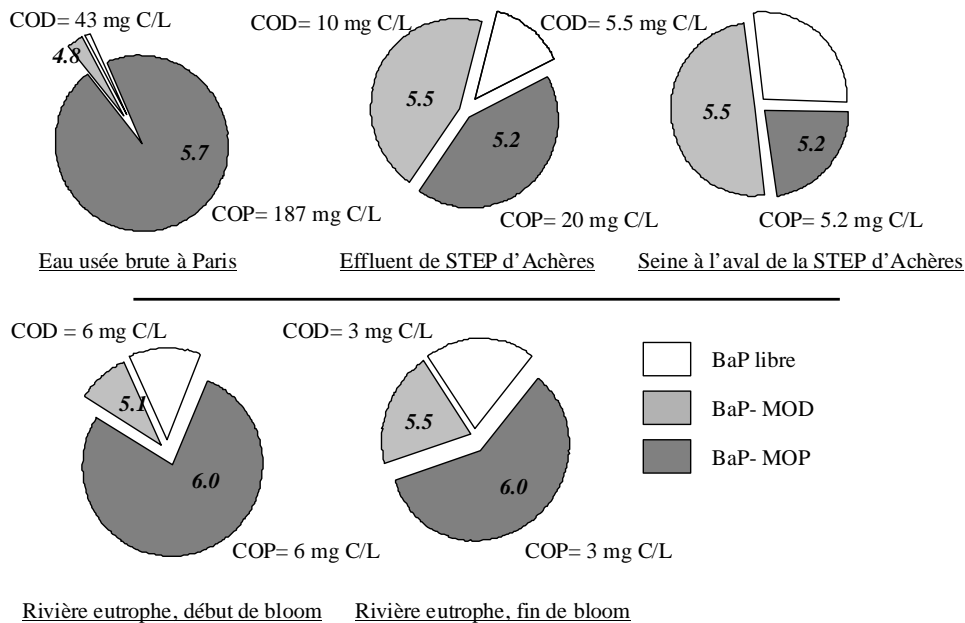


Figure 21 : répartition théorique du BaP entre les phases aqueuse, MOD et MOP, estimée à partir des coefficients de partition obtenus par les expériences de bioaccumulation. En italique sont indiquées les valeurs de $\log K_{DOC}$ et $\log K_{POC}$ utilisées pour l'estimation. Les concentrations en MOD et MOP dans les différents milieux sont indiquées et proviennent de Garnier et al. (1998), Seidl et al. (1998), Servais et al. (1998), Tusseau-Vuillemin et Le Réveillé (2001).

2 MISE EN PLACE D'UN MODELE D'EXPOSITION DES POLLUANTS

2.1 Objectif et Démarche

Après l'étape de mise en évidence expérimentale, nous avons cherché à tester s'il était possible de modéliser la relation entre la biodégradabilité de la MO et (1) sa capacité à interagir avec le BaP et (2) son aromaticité (SUVA) en utilisant un modèle de qualité de l'eau pour lequel la dynamique de dégradation de la MO se traduit explicitement par l'évolution de son fractionnement en classes de biodégradabilité.

L'hypothèse principale testée est que le fractionnement de la matière organique en classes de dégradabilité opéré par le modèle est également pertinent en ce qui concerne l'aromaticité et la capacité à fixer les polluants organiques hydrophobes. Pour cette approche, nous nous sommes limités au compartiment dissous, car nous avons un suivi de K_{DOC} et de SUVA au cours de la biodégradation pour les MOD uniquement.

Pratiquement, à chaque classe MOD_i de matière organique dissoute a été affecté un coefficient de partition pour le BaP « $K_{DOC,i}$ » et une absorbance spécifique « $SUVA_i$ ». A tout moment, la capacité de l'ensemble de la MOD à moduler la biodisponibilité d'un polluant peut s'exprimer par :

$$K_{DOC} = \frac{\sum K_{DOC,i} \cdot [COD]_i}{\sum [COD]_i} \quad \text{Equ. 24}$$

De même, l'absorbance spécifique de la MOD prise dans son ensemble s'écrit :

$$SUVA = \frac{\sum SUVA_i \cdot [COD]_i}{\sum [COD]_i} \quad \text{Equ. 25}$$

L'évolution de chaque fraction MOD_i au cours de la biodégradation doit donc permettre d'estimer l'absorbance spécifique et le coefficient de partition de l'ensemble du pool de MO.

2.2 Fractionnement du substrat en MOD biodégradable et réfractaire

Dans un premier essai (Article 3), le substrat initial a été simplement fractionné en deux classes : la MOD biodégradable et la MOD réfractaire. Dans le réacteur, s'ajoutent les produits microbiens solubles (SMP) au fur et à mesure de la biodégradation. Sur la base de nos essais de production de SMP par la dégradation du glucose, nous avons estimé que les SMP produits représentaient 5 % de la MOD biodégradée. La MOD réfractaire peut être estimée en fin d'expérience en tenant compte de la formation de SMP.

Une régression linéaire des données de $K_{DOC}(biol)$ (et de SUVA) sur « l'indice de biodégradation » de la MO (qui correspond à la fraction réfractaire de la MO présente à un instant donné au cours du processus de biodégradation) permet d'estimer $K_{DOC, biodeg}$ et $K_{DOC, ref}$ les coefficients de partage pour les MOD biodégradables et réfractaires respectivement. Le détail des régressions sont disponibles dans l'Article 3. Les valeurs $K_{DOC, SMP}$ et $SUVA_{SMP}$ sont celles mesurées pour les SMP issues de la biodégradation du glucose. Ces régressions correspondent aux droites des Figure 17 et Figure 18 ci-dessus. Les valeurs de SUVA et de K_{DOC} obtenues pour chaque fraction sont indiquées dans le Tableau 10.

| | Extraits d'algues | Viandox | Eaux usées filtrées |
|------------------------|-------------------|-------------|---------------------|
| SUVA _{biodeg} | 12.0 ± 0.3 | 3.8 ± 0.4 | 9.9 ± 1.9 |
| Ref | 2.9 ± 1.1 | 25.8 ± 1.3 | 32.7 ± 6.7 |
| r ² - n | 0,86 - 17 | 0,99 - 12 | 0,83 - 12 |
| $K_{DOC, biodeg}$ | -0.3 ± 3.9 * | 6.8 ± 2.0 | |
| Ref | 19.8 ± 12.3 * | 41.6 ± 11.7 | n.d. |
| r ² - n | 0,61 - 10 | 0,78 - 12 | |

* : les paramètres estimés ne sont pas significativement différents de 0 (test T, p>0.05)

Tableau 10 : Estimation des coefficients de partage K_{DOC} ($\times 10^4$ L/kg) et des absorbances spécifiques SUVA (en $cm^{-1}.L.g^{-1}$) des fractions biodégradables et réfractaires des différentes MOD testées.

La régression est très significative pour le SUVA. Elle met en évidence que les fractions réfractaires des extraits d'algues n'absorbent pas du tout dans l'UV, au contraire des résidus de dégradation du Viandox ou des eaux usées. La forte valeur de SUVA pour la fraction réfractaire des eaux usées est comparable au SUVA des acides humiques. Il semble donc que pour les trois substrats testés, il soit possible de définir une fraction biodégradable non ou peu aromatique, et une fraction réfractaire homogène du point de vue de l'aromaticité (très faible pour les MOD algales, forte pour les substrats de type urbain).

Les estimations des constantes de partage $K_{DOC}(biol)$ sont moins bonnes. Les constantes $K_{DOC, i}$ estimées ont une grande incertitude, mais restent significatives pour le Viandox, alors que la régression n'est pas significative pour les extraits d'algues.

Ce résultat peut en partie être attribué à la forte variabilité et aux incertitudes inhérentes à l'estimation des $K_{DOC}(biol)$, mais peut aussi provenir d'hypothèses de départ fausses :

- une mauvaise description de la dégradation de la MO. Il faut souligner que ce modèle simplifie extrêmement les processus de biodégradation, la MOD disparaissant sans subir de transformation intermédiaire. Seuls les SMP apparaissent, et sont liés à la biodégradation par une simple relation de proportionnalité.
- une hétérogénéité de K_{DOC} entre différentes MOD biodégradables, regroupées ici en une seule fraction. Il est très probable que le $K_{DOC, biodeg}$ évolue au cours du temps, certains composés de la MOD_{biodeg} étant plus facilement minéralisés que d'autres.

Ce modèle très simple et peu descriptif du point de vue de la mécanique de la dégradation ne permet pas de décrire les évolutions de $K_{DOC}(biol)$ pour les substrats testés. Nous avons donc cherché une autre modélisation de la dégradation de la MO qui permette de décrire les évolutions de $K_{DOC}(biol)$ et de SUVA.

2.3 Fractionnement du substrat en plusieurs classes de biodégradabilité

Dans une deuxième étape, nous nous sommes basés sur les modèles de fonctionnement écologique des milieux aquatiques, qui décrivent la dynamique de la matière organique en tenant compte explicitement du compartiment bactérien et en fractionnant la MO en plusieurs classes de biodégradabilité.

2.3.1 Description du modèle

Le modèle que nous avons utilisé (Figure 22) reprend le principe du modèle « HSB » de Billen et Servais (1989). L'ensemble de la MOD dans le réacteur est à chaque moment composé de MOD facilement biodégradable (H1), lentement biodégradable (H2), réfractaire à la dégradation (H3) ; ces trois fractions sont originaires du substrat. Par rapport au modèle de référence (Figure 4 de la partie « Etat des connaissances »), nous avons ajouté une dernière fraction de MOD, constituée des SMP (H4), qui n'est pas présente dans le substrat initial. Cette fraction est supposée lentement biodégradable. De même, la matière organique particulaire est composée des MOP du substrat initial biodégradables (P1 et P2) ou réfractaires (P3), des résidus bactériens (P4) et de la biomasse vivante (B). Les particules biodégradables P1, P2 et P4 sont hydrolysées en MOD de type H1, H2, et H4 respectivement. La matière organique et son évolution sont donc représentées ici par un modèle à dix variables et douze paramètres.

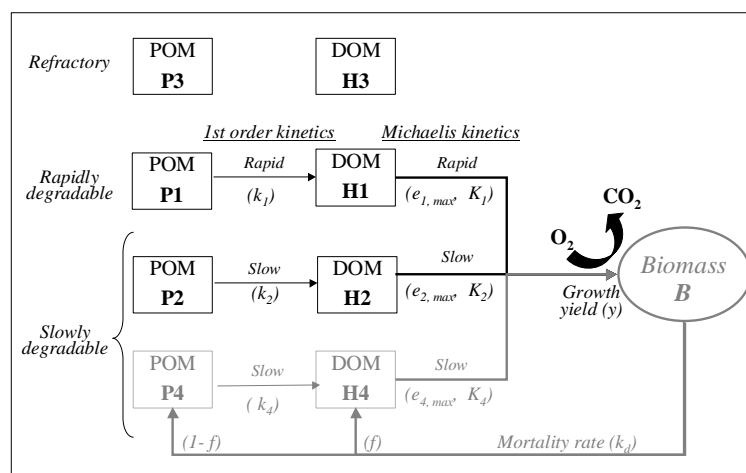


Figure 22 : Schéma du modèle de biodégradation de la MO.

L'originalité de ce modèle réside dans la prise en compte des résidus bactériens comme des fractions à part de la MO, au contraire du modèle HSB original. Ce choix a été fait car nous

avons mis en évidence le caractère particulier de ces résidus microbiens pour leur capacité à fixer les HAP.

Remarque : Le modèle HSB a pour objectif la description de l'évolution des matières organiques dans les milieux aquatiques, il est important de noter qu'il ne prend pas en compte spécifiquement l'origine de la MO.

2.3.2 Méthodes d'optimisation

A partir des mesures expérimentales de COD, COP et de consommation d'oxygène, les fractions de la MO sur toute la durée de la dégradation ont été estimées. L'optimisation des paramètres cinétiques de biodégradation et des conditions initiales (fractionnement du substrat) a été faite suivant une méthode d'optimisation numérique détaillée dans Dispan et al. (soumis).

L'optimisation des paramètres cinétiques et des conditions initiales se fait par minimisation de la fonction de coût, somme des carrés des écarts entre les valeurs observées et simulées. L'optimiseur est de type quasi-Newton (L-BFGS-B, Zhu et al., 1997), il permet de résoudre le problème avec des variables bornées. Le différenciateur automatique Odysées (développé par l'INRIA, Faure et Papegay, 1998) est utilisé pour construire le code adjoint pour l'évaluation du gradient de la fonction coût. Les programmes sont écrits en FORTRAN 77. Cette méthode permet l'ajustement des paramètres et des conditions initiales, ainsi que l'estimation de leur écarts-types.

Une fois les conditions initiales et les paramètres de biodégradation déterminés, les constantes K_{DOC_i} et $SUVA_i$ pour chaque type de MO sont optimisées par minimisation des moindres carrés par régression multilinéaire sous Excel[®].

Le pallier de très faible consommation d'oxygène observé en début de dégradation a été éliminé des données d'observations pour les optimisations. Il correspond à une biomasse trop faible pour être évaluée de façon fiable et peut être dû à l'adaptation des bactéries aux conditions du milieu, ce qui ne peut être représenté par le modèle. Ainsi, les données sont prises en compte à partir de 20 heures et 25 heures de dégradation respectivement pour le Viandox et pour les extraits algaux, soit au démarrage de la dégradation.

2.3.3 Ajustement du modèle aux données de COD, de COP et d'OUR

2.3.3.1 Paramètres et variables fixées

Les vitesses de dégradation des différentes fractions sont celles du modèle HSB telles que proposées par Billen et Servais (1989). Pour des soucis de stabilité numérique, les constantes de Michaelis dans les équations d'hydrolyse de H1, H2 et H4 ont été fixées à 10 mg/L et sont supérieures aux valeurs proposées dans le modèle initial (0.25 mg/l et 2,5 mg/l respectivement). Les simulations n'en sont que peu affectées car les concentrations en CO utilisées dans les

expériences sont élevées et donc pas limitantes. La cinétique de dégradation de H4 est assimilée à celle de H2. La répartition de la biomasse morte entre H4 et P4 a été fixée à 30 :70.

Deux variables ont été optimisées au cours des simulations :

- Le rendement de croissance des boues activées. Il a été en effet montré que le rendement de croissance des boues de STEP étaient plus élevé que celui des bactéries du milieu naturel, fixé à 0.25 dans le modèle HSB (Henze, 1992). Par ailleurs, nos essais montrent une forte production de COP, ce qui implique une valeur minimale de transformation du COD initial en biomasse.
- la mortalité bactérienne (nous avons constaté la nécessité de libérer ce paramètre pour pouvoir simuler les cinétiques plus lentes de dégradation)

Les fractions P1, P2 et P3 sont nulles au démarrage de l'essai car les substrats initiaux ne contiennent pas de MOP. H4 et P4 ont aussi été supposés nuls, bien que les boues activées qui servent pour initier la biodégradation contiennent une fraction de H4 et P4. Compte tenu du faible volume de boues inoculé, ces fractions sont négligeables devant la MO du substrat. Les variables initiales à optimiser sont donc H1, H2, H3 et B la biomasse.

2.3.3.2 Résultats : composition et évolution des substrats

Les Tableau 11 et Tableau 12 montrent les paramètres et les conditions initiales après optimisation à partir des données. La Figure 23 montre les résultats des simulations concernant les valeurs de COD, de COP, d'OUR et la répartition du substrat en fractions de biodégradabilité.

| | Paramètres | | Extraits algaux | Viandox |
|--------------------------|--------------------------------|--------------|-------------------------|------------------------|
| Assimilation de H1 | Vitesse | $e_{1 \max}$ | 0.75 h ⁻¹ | 0.75 h ⁻¹ |
| | Constante de Michaelis | K_1 | 10 mg C/L | 10 mg C/L |
| Assimilation de H2 | Vitesse | $e_{2 \max}$ | 0.25 h ⁻¹ | 0.25 h ⁻¹ |
| | Constante de Michaelis | K_2 | 10 mg C/L | 10 mg C/L |
| Assimilation de H4 | Vitesse | $e_{4 \max}$ | 0.25 h ⁻¹ | 0.25 h ⁻¹ |
| | Constante de Michaelis | K_4 | 10 mg C/L | 10 mg C/L |
| Dynamique de la Biomasse | <i>Rendement de croissance</i> | <i>Y</i> | <i>0.600 ± 0.007</i> | <i>0.563 ± 0.003</i> |
| | <i>Mortalité</i> | | <i>0.05 (borne inf)</i> | <i>0.241 ± 0.002</i> |
| | Fraction vers H4 | | 0.3 | 0.3 |
| | Hydrolyse de P4 | | 0.0025 h ⁻¹ | 0.0025 h ⁻¹ |

Tableau 11 : paramètres du modèle. En italiques sont indiqués les paramètres optimisés.

| | Substrat initial | | | Boues |
|-----------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------|
| | H1 | H2 | H3 | B |
| Extraits algaux | 8,0 ± 0,2 12 % | 37,5 ± 0,5 54% | 23,7 ± 0,4 34 | 0,037 ± 0,0034 |
| Viandox | 179,2 ± 1,1 22% | 619,0 ± 1,9 77% | 10 (borne inf) 1% | 13,0 ± 0,2 |

Tableau 12 : Compositions initiales des réacteurs (en mg C/L et en pourcentage de l'ensemble du COD du substrat)

Pour les deux substrats, le modèle permet de bien représenter les évolutions des teneurs en COD et en COP, surtout en début de dégradation. Les deux substrats contiennent une majorité de H₂, MO plus lentement biodégradable. Les extraits d'algues contiennent 34% de composés réfractaires alors que le Viandox semble biodégradable à 99%.

L'observation de l'évolution de chaque type de MO au cours de la dégradation montre que la partie biodégradable des extraits d'algues a totalement disparu après 3 jours de dégradation, alors que les composés du Viandox sont dégradés sur les deux semaines de l'expérience.

Les simulations des OUR permettent globalement de rendre compte des OUR calculées à partir des mesures de O₂. L'intensité simulée est souvent légèrement surestimée, mais les pics de consommation d'oxygène sont très bien simulés par le modèle dans les deux cas.

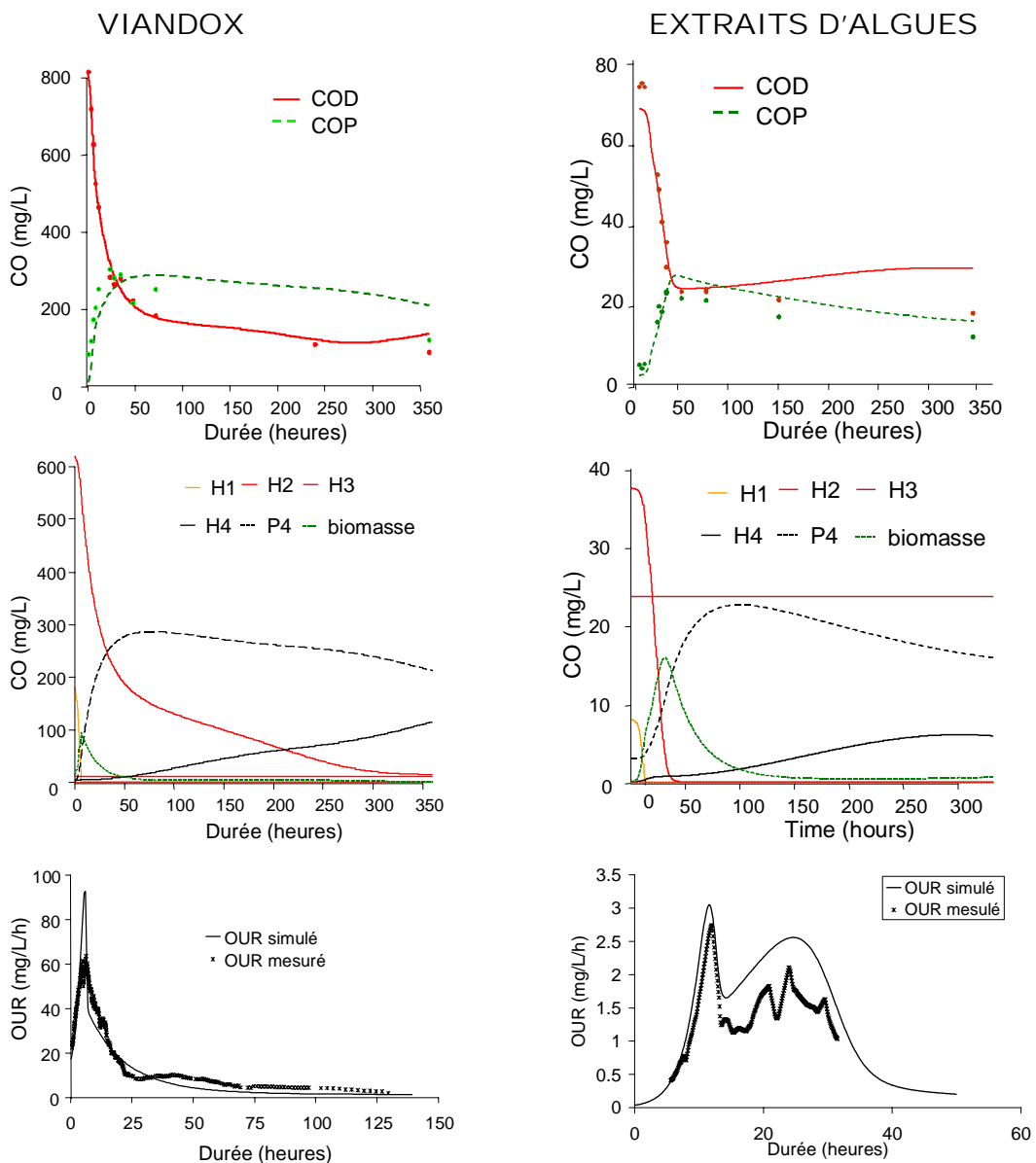


Figure 23 : Biodégradation du Viandox (gauche) et des extraits algaux (droite). Haut : COP et COD observés (cercles) et simulés (traits). Milieu : fractionnement théorique de la MO au cours de sa dégradation. Bas : OUR simulées et estimées à partir des concentrations en O₂.

Le modèle utilisé a plus de difficultés à simuler les observations pour les durées plus longues. En général, on observe une surestimation du COD, alors que le COP diminue moins en fin de dégradation que ce qui a été mesuré dans le réacteur. La mortalité et la dynamique de la MO bactérienne sont mal simulées ici. Ces processus sont très sûrement trop simplifiés dans le modèle pour permettre une bonne représentativité des phénomènes très lents de minéralisation.

Bien que les deux optimisations aient été faites séparément, le modèle a pour objectif de représenter la biodégradation de l'ensemble des MO d'un milieu, quelles que soient leurs origines. Les rendements de croissance obtenus pour les deux substrats sont proches. La valeur 0,6 est supérieure à la valeur 0,25 du modèle HSB mais s'explique par une plus grande adaptation des boues activées aux substrats biodégradables par rapport aux bactéries hétérotrophes des milieux naturels (Henze, 1992). En revanche, la mortalité des bactéries est très différente pour la biodégradation des deux substrats. En particulier, la valeur optimisée est très grande pour la dégradation du Viandox (0,24 par rapport à la valeur de référence pour HSB de 0.05). Ce résultat peut être dû à la concentration exceptionnelle de biomasse produite par la dégradation du Viandox (~300 mg/L) qui pourrait induire un comportement microbien différent des conditions généralement observées en rivière, ou même en station d'épuration. Il convient de rappeler que les eaux usées brutes contiennent environ dix fois moins de COD initial que le Viandox et produiront donc au cours de leur minéralisation beaucoup moins de biomasse.

Hormis la mortalité exceptionnelle pour la dégradation du Viandox, qui peut être attribuée aux conditions expérimentales non représentatives des milieux dans lesquels les données sont usuellement recueillies, il semble donc que le même modèle permette de simuler la minéralisation des deux types de substrats malgré leur origine totalement différente.

2.3.4 Optimisation des $K_{DOC,i}$ et $SUVA_i$.

| | Valeurs de K_{DOC} en $\times 10^4$ L/kg | | | | Valeurs de $SUVA$ en $\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ | | | |
|----------------|--|----------------|-------------------|------------------|--|----------------|------------------|----------------|
| | H1 | H2 | H3 | H4 | H1 | H2 | H3 | H4 |
| <u>Viandox</u> | | | | | | | | |
| H4 libre | 0 (min) | 6,1 \pm 4,6 | 237,6 \pm 126,6 | 13,9 \pm 13,7 | 1,6 \pm 6,7 | 3,5 \pm 0,9 | 161,1 \pm 25,1 | 15,6 \pm 2,7 |
| H4 contraint | 0 (min) | 11,3 \pm 5,0 | 73,2 \pm 133,7 | 33,3 \pm 14,2 | 3,6 \pm 6,0 | 2,8 \pm 0,7 | 183,9 \pm 20,4 | 13,1 \pm 2,1 |
| H4 fixé | 0 (min) | 9,1 \pm 3,2 | 143,2 \pm 57,2 | 25 | -3,3 \pm 8,1 | 5,3 \pm 0,6 | 105,3 \pm 11,6 | 22 |
| <u>Algues</u> | | | | | | | | |
| H4 libre | 43,7 \pm 44,6 | 0,7 \pm 7,0 | 4,6 \pm 2,9 | 112,0 \pm 19,3 | 12,8 \pm 3,3 | 11,5 \pm 0,6 | 6,8 \pm 0,3 | 3,5 \pm 2,2 |
| H4 contraint | 0 (min) | 0 (min) | 13,3 \pm 3,2 | 33,3 \pm 14,2 | 10,9 \pm 6,8 | 12,5 \pm 1,2 | 5,7 \pm 0,5 | 13,1 \pm 2,1 |
| H4 fixé | 0 (min) | 0 (min) | 14,1 \pm 2,8 | 25 | 9,2 \pm 9,5 | 13,6 \pm 1,6 | 4,6 \pm 0,6 | 22 |

Tableau 13 : Coefficients de partition K_{DOC} et absorbance spécifique à 254 nm ($SUVA$) pour chaque fraction de MOD, selon l'origine de la MO et le mode d'estimation

L'optimisation des $K_{DOC,i}$ pour chaque substrat a été réalisée de trois façons :

- en optimisant les paramètres $K_{DOC,i}$ et $SUVA_i$ pour les quatre fractions de MOD séparément pour chaque substrat (H4 libre)

- en cherchant des valeurs de $SUVA_4$ et K_{DOC4} communes pour les deux expériences (H4 contraint).
- en fixant les valeurs de $SUVA_4$ et K_{DOC4} aux valeurs expérimentales mesurées sur les SPMD produits lors de la dégradation du glucose (H4 fixé)

Les résultats sont présentés dans le Tableau 13 ci-dessus.

Il convient de noter que le petit nombre de données disponibles pour la régression ne permet que de fournir des ordres de grandeur des constantes pour chaque fraction. En particulier, les valeurs K_{DOCi} sont fortement dépendantes des incertitudes liées aux estimations des $K_{DOC(biol)}$. La contrainte sur H4 influence beaucoup les valeurs de K_{DOCi} et $SUVA_i$, surtout pour les paramètres de H3 et H4. Dans tous les cas néanmoins, on constate une capacité d'interaction avec le BaP négligeable pour la MOD rapidement dégradables H1, et une très faible pour la fraction lentement dégradables H2. Pour les algues, on retrouve la constante de partition nulle pour les composés biodégradables, comme on l'avait déjà estimé via le modèle plus simple précédent (Article 3).

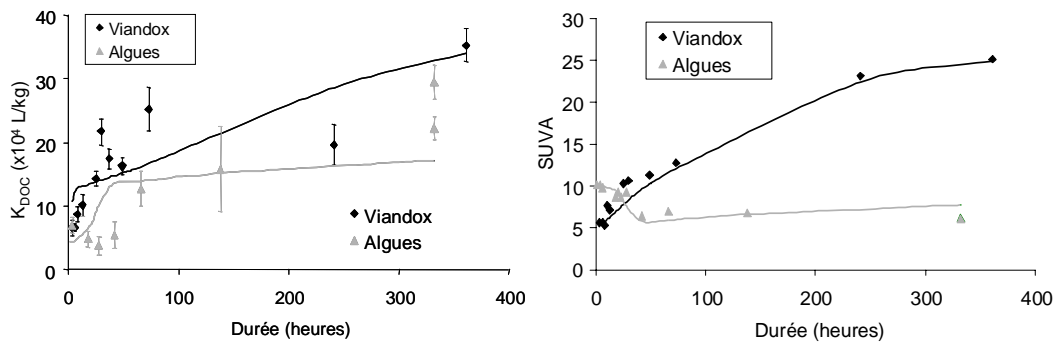


Figure 24 : évolution de la constante de partition (K_{DOC}) et de l'absorbance spécifique à 254 nm ($SUVA$) de la MOD au cours de la minéralisation (simulation avec « H4 contraint », i.e. des valeurs de K_{DOC4} et de $SUVA_4$ identiques pour les deux substrats).

En dépit de la forte variabilité des constantes estimées pour H3 et H4 selon les hypothèses de départ, on observe que les MOD réfractaires du Viandox ont toujours une très forte capacité d'interaction avec le BaP, du même ordre que celle observée pour les acides humiques. Une telle capacité d'interaction n'est pas obtenue pour les molécules réfractaires d'origine algale. Le modèle indique en effet que les interactions observées en présence d'extraits d'algues dégradés sont principalement dues aux résidus bactériens. Cependant, la valeur obtenue en laissant H4 libre semble trop élevée et non réaliste, alors que la valeur obtenue en forçant K_{DOC4} à être identique pour les deux essais est plus proche de celle estimée pour les SMP issus de la dégradation du glucose (25×10^4 L/kg, Article 3). Dans le cas où K_{DOC4} est contraint, le modèle sous-estime la constante de partition des extraits algaux dégradés (Figure 24). Nous pouvons donc supposer que la capacité d'interaction des extraits d'algues réfractaires est sous-estimée dans ces simulations.

L'estimation des coefficients de partition avec K_{DOC4} contraint nous semble finalement plus acceptable, malgré les grandes incertitudes sur les paramètres optimisés. Elle est similaire à celles pour lesquelles les valeurs pour H4 ont été fixées aux valeurs expérimentales. Les simulations tendent à montrer que les composés biodégradables des matières organiques ont une

influence relativement faible sur la biodisponibilité des POH. En revanche, les SMP et les fractions réfractaires des matières organiques ont une forte influence sur la répartition des POH dans l'environnement

Le modèle permet de très bien simuler l'évolution de l'aromaticité des deux substrats, même si la valeur de SUVA pour H4 est contrainte (Figure 24). Pour les algues, les fractions les moins dégradables sont aussi les moins aromatiques alors que la tendance inverse est observée avec le Viandox. Nous retrouvons les ordre de grandeur déjà obtenus avec le premier modèle simple : les matières organiques biodégradables sont peu aromatiques quelle que soient leur origine. Les MOD réfractaires du Viandox sont fortement aromatiques, au contraire de la fraction réfractaire des extraits algaux.

La valeur obtenue pour $SUVA_4$ lors de l'optimisation des deux substrats en même temps ($17,2 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{g}^{-1}$) est proche de la valeur mesurée sur les SMP issus de la dégradation du glucose, ($22 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{g}^{-1}$, Article 3), ce qui conforte la validité de la représentation de notre modèle. Les absorbances spécifiques estimées pour les fractions H1, H2 et H3 sont totalement différentes pour les simulations selon que H4 est laissé « libre » ou non. Ce résultat montre qu'il n'est pas possible de prévoir l'aromaticité de la MOD d'un milieu avec ce modèle qui ne tient pas compte de l'origine de la MO.

2.4 Conclusions et perspectives

Le modèle présenté dans cette étude permet de modéliser la biodisponibilité des polluants à partir d'un modèle de biodégradation de la MO adapté aux rivières très anthropisées. Les valeurs des coefficients de partition entre les différentes fractions de la MO et les HAP restent à préciser et surtout à mieux estimer à partir d'autres jeux de données. A partir de nos premiers résultats, il semble que les fractions biodégradables des matières organiques aient une influence limitée, et que les interactions entre les POH et les MOD soient principalement dues aux composés réfractaires et aux résidus bactériens.

Il n'est pas vraiment possible à partir de nos résultats de quantifier la part relative de H3 et de H4 dans l'interaction avec le BaP. D'une part car les valeurs obtenues sont trop dépendantes des hypothèses de départ pour l'optimisation, et d'autre part car le modèle de biodégradation utilisé n'a pas pour but original de décrire la dynamique des résidus bactériens. Celle-ci reste très simpliste. Il semble aussi que l'origine des substrats dégradés joue un rôle sur la composition et les propriétés physico-chimiques des résidus bactériens. La quantification des teneurs en SMP (et par conséquent des fractions réfractaires des MO) et de leur influence sur la biodisponibilité restent à approfondir.

Par la suite, il sera aussi nécessaire d'évaluer les coefficients de partition des POH et des matières organiques particulières selon leur classe de biodégradabilité afin de pouvoir avoir une estimation globale de la répartition et de la biodisponibilité dans le milieu.

Les données de partition obtenues ont pour objectif de permettre la simulation de l'évolution de la fraction biodisponible de la MO. Nous fournissons ci-dessous un exemple d'utilisation possible de ce modèle. En connaissant l'état initial de la biodégradabilité des MO d'un milieu, le modèle a

pour objectif d'évaluer la biodisponibilité du BaP, ainsi que son évolution avec le vieillissement des MO (Figure 25).

Les conditions initiales du milieu sont données au Tableau 14. Elles pourraient correspondre à un milieu en début de bloom algal. Les coefficients de partition estimés au cours de ce travail pour les extraits d'algues, les algues fraîches et les matière organique bactériennes particulaire sont aussi reportées dans le tableau, et servent pour l'estimation de la biodisponibilité du BaP.

| | H1 | H2 | H3 | H4 | P1 | P2 | P3 | P4 | B |
|--------------------|----|----|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| CO (mg/L) | 1 | 3 | 2 | 0 | 1 | 3 | 0.5 | 0 | 0.5 |
| $K_{P/DOC}$ (l/kg) | 0 | 0 | 13×10^4 | 34×10^4 | 50×10^4 | 50×10^4 | 50×10^4 | 16×10^4 | 46×10^4 |

Tableau 14 : Conditions initiales du milieu et coefficients de partition associés à chaque fraction.

La Figure 25 montre la répartition théorique du BaP dans un tel milieu et son évolution au fur et à mesure que la matière organique du milieu est minéralisée. Bien que très grossière (chaque valeur de coefficient de partition pour les fractions comporte de nombreuses incertitudes), cette figure illustre néanmoins l'objectif poursuivi dans ce travail. Nous mettons en évidence que la répartition du polluant dans l'environnement évolue au cours du vieillissement des MO du milieu. Nous observons ici que la fraction biodisponible a tendance à augmenter en fin de dégradation, les MO « relarguant » le BaP quand elles sont dégradées.

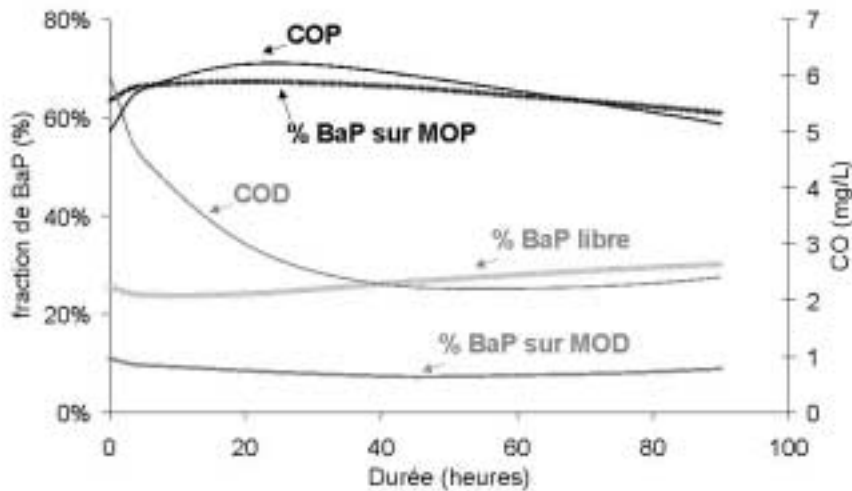


Figure 25 : répartition théorique du BaP dans le milieu au fur et à mesure de la biodégradation de la MO.

Sous réserve d'en préciser les paramètres, un tel modèle pourrait permettre de mieux évaluer la fraction biodisponible des POH dans les milieux anthropisés en tenant compte de la dynamique microbienne, qui joue un rôle fondamental dans le fonctionnement écologique du milieu et la détermination des caractéristiques physico-chimiques des matières organiques.

APPROCHE IN SITU DE L'EFFET DE LA MO SUR LA BIODISPONIBILITE DES HAP EN MILIEU AQUATIQUE

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons cherché à tester in situ l'influence des matières organiques du milieu aquatique sur la biodisponibilité des HAP. De part la difficulté de pouvoir mesurer la biodisponibilité par une mesure de bioaccumulation in situ, nous avons choisi d'utiliser la technique de l'échantillonnage passif par membrane semi-perméable (Semi-Permeable Membrane Device, SPMD). La technique SPMD est développée depuis les années 90 comme moyen alternatif d'estimer dans le milieu aquatique la concentration en POH « biodisponible » (ou réputés tels, la SPMD étant un modèle physique dont la représentativité par rapport aux organismes vivants reste à démontrer).

Le principe et le fonctionnement de la SPMD sont exposés dans la première partie de ce chapitre. La deuxième partie est consacrée à l'étude de la capacité de la SPMD à échantillonner la fraction biodisponible des POH. Pour cela, notre travail expérimental a consisté, en laboratoire, à comparer les fractions de HAP accumulées par les SPMD et les fractions bioaccumulées par les daphnies en présence de différentes matières organiques dissoutes naturelles ou anthropiques.

Enfin, dans la dernière partie de ce chapitre sont exposés les principaux résultats de l'étude de terrain menée au cours de ce travail pour analyser l'influence des matières organiques sur la répartition des HAP in situ. Pour cette étude le site de travail était le bassin versant de la Seine. Ce travail fait l'objet de l'Article 5 en annexe.

1 DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE SPMD.

1.1 Principe de la SPMD

1.1.1 Présentation du dispositif

La technique de Semi-Permeable membrane Device (SPMD) a été développée depuis les années 90 par l'USGS (Huckins et al., 1990). Il s'agit d'un tube plat en polyéthylène (PET), renfermant une couche mince de lipide (trioléine). Cet ensemble sac membranaire et trioléine constitue le dispositif SPMD que l'on place dans le milieu à analyser (pour des durées allant de quelques heures à plusieurs mois). Sa capacité à concentrer des quantités trace de micro-polluant organique *in situ* et intégrer l'exposition offre de grands avantages sur le prélèvement ponctuel d'échantillons d'eau. Cette technique permet en particulier de diminuer les limites de détection des concentrations dans le milieu, et d'avoir une mesure intégrative de la contamination.

La membrane en PET est considérée comme non-poreuse. Cependant, le mouvement thermique des polymères au sein de la membrane permet la formation temporaire de « cavités » dont le diamètre maximal est d'environ 10 Å (Huckins et al., 1990). Les pores temporaires, ainsi que l'hydrophobie des polymères du PET permettent une solubilisation des POH dans la membrane et leur migration jusqu'à la phase lipidique. Le diamètre moléculaire des POH est légèrement inférieur au diamètre des cavités, ce qui laisse supposer que seuls les POH dissous dans le milieu peuvent être solubilisés dans la membrane, et être concentrés dans la SPMD.

Les SPMD ont été développées dans le but de « mimer » un organisme biologique : d'après Chiou (1985), le diamètre de pore de la membrane en PET se rapproche de celui des membranes biologiques ; la trioléine contenue dans la SPMD est un lipide choisi pour mimer les tissus des organismes aquatiques (Huckins et al., 1990).

Les SPMD standards sont disponibles et vendues pour l'analyse *in situ* (Photo 2). Ce sont des tubes plats d'en général 91,4 cm de long, 2,5 cm de large et contiennent 1 ml (915 mg) de trioléine.



Photo 2: SPMD standard

A l'origine, les SPMD ont été développées pour être déployées dans la colonne d'eau des milieux aquatiques (revue bibliographique dans Lu et al., 2002). Leur utilisation est néanmoins en train de s'étendre aux sédiments, à l'air et aux sols (voir une revue des utilisations dans Petty et al., 2000).

1.1.2 Modélisation de l'accumulation

Le principe à la base du dispositif SPMD est la diffusion passive des polluants au travers de la membrane. Les POH sont séquestrés à la fois dans la trioléine et dans la membrane en PET. L'accumulation peut être modélisée de façon très simple en considérant la SPMD comme un compartiment unique ayant une cinétique d'accumulation des POH du premier ordre :

$$\frac{dC_{SPMD}}{dt} = k_u \cdot C_{SPMD-disp} - k_d \cdot C_{SPMD} \quad \text{Equ. 26}$$

avec C_{SPMD} la concentration en POH dans la SPMD (en g/g de SPMD)

$C_{SPMD-disp}$ la concentration en POH dans l'eau disponible pour l'accumulation par la SPMD (« SPMD-disponible ») (en g.L⁻¹)

k_u : la constante cinétique d'accumulation (en L.g⁻¹.h⁻¹)

k_d : la constante cinétique d'élimination (en h⁻¹)

En supposant $C_{SPMD-disp}$ constante, et la concentration initiale en POH dans la SPMD nulle, l'accumulation dans la SPMD suit une loi exponentielle :

$$C_{SPMD} = C_{SPMD-disp} \cdot \frac{k_u}{k_d} \cdot (1 - e^{-k_d t}) = C_{SPMD-disp} \cdot K_{SPMD} \cdot (1 - e^{-k_d t}) \quad \text{Equ. 27}$$

Avec K_{SPMD} : la constante de partage eau/SPMD (en L.kg⁻¹)

Selon ce modèle de fonctionnement, l'accumulation est linéaire durant sa phase initiale :

$$C_{SPMD} = k_u \cdot C_{SPMD-disp} \cdot t = \frac{R_S}{M_S} \cdot C_{SPMD-disp} \cdot t \quad \text{Equ. 28}$$

Avec R_S : le taux d'échantillonnage en L.j⁻¹

M_S : la masse du SPMD en g

Le taux d'échantillonnage R_S correspond au volume apparent d'eau qui est extrait par une SPMD par unité de temps. R_S est directement proportionnel à la surface membranaire du dispositif. Pour les SPMD standards, R_S varie entre 0.1 et 10 L.j⁻¹ selon le polluant considéré et les caractéristiques physiques et chimiques du milieu d'exposition. La constante cinétique k_u est équivalente à R_S normalisé par la masse de la SPMD.

Remarque :

Le modèle d'accumulation à un compartiment est une représentation très simplifiée du dispositif. En particulier, ce modèle, qui considère la SPMD comme un compartiment unique, ne prend pas en compte explicitement les phénomènes de diffusion dans la membrane et de fixation dans la trioléine. Une description plus détaillée faisant intervenir explicitement les phénomènes de diffusion passive a été développée (Huckins et al., 1993; Gale, 1998). Ce modèle comporte plus de paramètres, ce qui nécessite un calibrage beaucoup plus fin pour une utilisation pratique. Dans notre étude, nous n'avons pas remis en cause le modèle simple à un compartiment, les données acquises ne permettant pas de le faire. Par ailleurs, le modèle à un compartiment reste de très loin le plus utilisé en pratique.

1.2 Utilisation pratique de la SPMD

1.2.1 Calibration de la SPMD

A partir de l'équation ci-dessus (Equ. 27), la SPMD permet d'estimer une concentration SPMD-disponible en POH dans l'eau moyenne sur la durée d'exposition, connaissant les constantes d'accumulation et d'élimination de chaque composé analysé.

Pratiquement, la SPMD s'utilise le plus souvent dans la phase linéaire (qui dure plusieurs jours pour les POH). Pour cette phase, seule la constante R_s est nécessaire pour passer d'une teneur en POH dans la SPMD à une concentration SPMD-disponible dans l'eau.

Pour chaque composé, les valeurs de R_s sont déterminées en laboratoire en étudiant la cinétique d'accumulation du composé dans la SPMD (à $C_{SPMD-disp}$ fixé). Pour les SPMD standards, les valeurs de R_s sont disponibles pour une grande gamme de POH (Huckins et al., 1999). Par exemple, le Tableau 15 montre les R_s évalués à différentes températures pour les seize HAP prioritaires définis par l'US EPA.

| HAP | Log K_{ow} | R_s (L.j ⁻¹) à 10°C | R_s (L.j ⁻¹) à 26°C |
|----------------------|--------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Naphtalène | 3,45 | 1,9 | 0,5 |
| Acynaphtène | 4,08 | 2,3 | 1,7 |
| Acénaphtylène | 4,22 | 2,7 | 2,4 |
| Fluorène | 4,38 | 3,0 | 2,8 |
| Phénanthène | 4,46 | 3,8 | 5,0 |
| Anthracène | 4,54 | 2,9 | 4,6 |
| Fluoranthène | 5,20 | 3,6 | 6,8 |
| Pyrène | 5,30 | 4,5 | 7,6 |
| Benzo[a]anthracène | 5,91 | 3,2 | 4,7 |
| Chrysène | 5,61 | 3,7 | 7,6 |
| Benzo[b]Fluoranthène | 5,78 | 2,8 | 3,3 |
| Benzo[k]Fluoranthène | 6,20 | 2,9 | 5,5 |
| Benzo[a]Pyrène | 6,35 | 3,2 | 5,4 |
| Dibenzo[a]Anthracène | 6,51 | 3,0 | 4,7 |
| Benzo[g,h,i]Pérylène | 6,90 | 2,0 | 3,4 |
| Indénopyrène | 6,75 | 1,8 | 2,4 |

Tableau 15 : Taux d'échantillonnage R_s déterminés à 10°C et à 26°C pour 16 HAP (Huckins et al., 1999)

Pour quels polluants ?

L'accumulation des POH dans la SPMD est basée sur l'affinité des polluants pour la trioléine et le PET. L'hydrophobie des POH est le principal facteur d'influence des paramètres d'accumulation. Les composés ioniques ne sont pas accumulés. De même, les composés trop peu hydrophobes ($\log K_{ow} < 2$) ne sont pas assez concentrés par la trioléine. La SPMD permet d'échantillonner les POH dont $\log K_{ow} > 2$.

Pour les molécules dont $2 < \log K_{OW} < 5,5$, le taux d'échantillonnage augmente avec K_{OW} . Au delà de $\log K_{OW} = 5,5$, R_s décroît avec K_{OW} . Ceci peut être dû à la gêne stérique pour des plus grosses molécules, qui limite et ralentit leur diffusion dans la membrane en PET (Huckins et al., 1999).

Durée de la linéarité

Afin de pouvoir appliquer le modèle d'accumulation linéaire, il est important de vérifier la linéarité de l'accumulation des contaminants ou d'adapter la durée d'exposition. Par exemple, Luellen et Shea (2002) observent que l'accumulation des HAP dont $\log K_{OW} > 4.5$ est linéaire pendant 30 jours, alors que l'accumulation des HAP dont $\log K_{OW} < 4.5$ n'est plus linéaire après 15 jours d'exposition.

L'accumulation peut être considérée comme linéaire quand $k_e t$ est petit ($< \ln 0,5$) avec

$$k_e = \frac{R_s}{M_s \cdot K_{SPMD}} \quad \text{Equ. 29}$$

La durée de linéarité augmente donc avec l'affinité du polluant pour la trioléine (K_{SPMD} , reliée directement à l'hydrophobie du polluant) car il faut effectivement plus de temps à taux d'accumulation égal pour saturer le SPMD, et diminue avec la rapidité de l'accumulation (le taux d'échantillonnage R_s), soit la vitesse de diffusion entre la SPMD et le milieu.

1.2.2 Traitement et analyse des SPMD

Après exposition, les SPMD sont nettoyées pour éliminer les particules collées en surface, et les POH sont simplement extraits par « dialyse » en plongeant les SPMD dans un solvant organique classiquement utilisé pour l'extraction des POH (dichlorométhane, hexane, heptane...). L'extrait est ensuite concentré par évaporation, éventuellement purifié, puis traité en fonction des polluants recherchés.

1.2.3 Principaux paramètres affectant l'accumulation des POH

L'accumulation de polluants par la SPMD est affectée par les particularités de l'environnement d'exposition. Par conséquent, les valeurs de R_s établies en laboratoire dans des conditions contrôlées sont susceptibles de ne pas être directement applicables pour l'ensemble des études in situ.

Température

La température joue non seulement sur la diffusion moléculaire mais aussi, dans une moindre mesure, sur le diamètre des pores du polymère qui augmente lorsque la température augmente. Théoriquement, R_s augmente avec la température. Huckins et al. (1999) montre ainsi que pour l'ensemble de 15 HAP (les 16 HAP référencés par l'US EPA moins le naphthalène), les rapports de R_s à 26°C sur R_s à 10°C varient entre 0,7 à 2,1 (Tableau 15).

Vitesse d'écoulement et turbulence

La vitesse d'écoulement de l'eau et la turbulence peuvent avoir une influence sur l'accumulation des POH quand l'accumulation dans la SPMD est limitée par la diffusion dans la couche limite de l'eau, ce qui est le cas des composés les plus hydrophobes ($\log K_{OW} > 4.4$ d'après Vrana et Shüürmann, 2002). Dans ce cas, l'augmentation de la vitesse fait diminuer l'épaisseur de cette couche, favorise la disponibilité des polluants pour l'accumulation dans la membrane et augmente le taux d'échantillonnage R_s . Pour les composés moins hydrophobes, c'est le passage dans la membrane qui est l'étape limitante et la vitesse de l'eau n'a alors pas d'influence sur l'accumulation dans la SPMD (Vrana et Shüürmann, 2002).

Huckins et al. (1993) ont démontré l'influence de l'épaisseur de la couche de diffusion aqueuse en montrant que l'accumulation dans les SPMD est plus rapide lorsque cette couche est amincie par agitation. D'après Booij et al. (1998), dans des solutions de sédiments en suspension, le taux d'échantillonnage R_s de pesticides organochlorés ($4 < \log K_{OW} < 8$) augmente d'un facteur 3 lorsque la vitesse augmente d'un facteur 100 (de 0,3 à 30 cm/s). En revanche, Luellen et Shea (2002) ont travaillé à deux vitesses qui diffèrent d'un facteur 50 (0,5 cm/s et 0,01 cm/s) et n'ont observé qu'une faible variation des constantes cinétiques des 16 HAP testés.

In situ, l'influence de la vitesse sur l'accumulation de la SPMD est difficile à évaluer. Pratiquement, elle n'est pas prise en compte pour l'estimation des concentrations SPMD-disponibles.

Biofouling

Le « biofouling » signifie le développement d'un biofilm (bactérien et/ ou algal) sur l'extérieur de la membrane, comme l'illustre la Photo 3.



Photo 3 : petite SPMD avant et après 28 jours sans nettoyage dans la Seine à Andrésy, en aval de la station d'épuration Seine-Aval (expérience préliminaire, été 2002, Tusseau-Vuillemin et al., 2003).

Le biofouling peut induire une résistance pour l'accumulation des polluants, et par conséquent affecter le taux d'échantillonnage R_s . Ainsi, en comparant l'accumulation dans des SPMD dont les membranes étaient recouvertes d'un biofilm avec des SPMD « propres », Richardson et al. (2002) ont observé que l'accumulation de polluants par la SPMD était réduite de 30 % pour les HAP, et de 50% pour les pesticides organochlorés.

Pour refléter des conditions spécifiques d'échantillonnage du milieu, Petty et al. (2000) propose d'utiliser un coefficient de correction Fi , pour établir un taux d'échantillonnage corrigé R_{SC} : $R_{SC} = R_s \cdot Fi$, Fi étant fonction de l'état de biofouling des SPMD. Par exemple, un facteur de correction de 80% est utilisé par Crunkilton et De Vita (1997). Cette valeur est cependant totalement empirique, uniquement basée sur un examen visuel de la SPMD.

Une solution pratique alternative consiste à éviter le développement du biofilm au cours de l'exposition. Ainsi, Luellen et Shea (2002) effectuent un nettoyage tous les deux jours des SPMDs dans une solution de sulfate de cuivre et d'herbicide, alors que Huckins et al. (1999) propose de tremper 15 min une fois par semaine les SPMD dans du Sanaqua (un puissant désinfectant, germicide, fongicide et désodorisant utilisé pour l'entretien des aquariums).

1.3 Conclusion : intérêts et limites de la SPMD

La technique SPMD permet un échantillonnage simple et intégratif des POH dans les milieux aquatiques. Son application pour le suivi chimique de la contamination des milieux a été validée dans de nombreuses études, sur des milieux aussi divers que les eaux de stations d'épuration, les rivières, les lacs ou en pleine mer (par exemple Petty et al., 2000; Zimmerman et al., 2000; Wang et al., 2001; Verweij et al., 2004). Sa capacité d'intégration permet de détecter des polluants présents à l'état de trace, qui ne sont pas nécessairement observables par des échantillonnages ponctuels et des analyses classiques par extraction liquide ou solide (Røe Utvik et al., 1999; Wang et al., 1999; van Stee et al., 2002).

Sur un critère de taille supposé, les SPMD n'échantillonnent en principe que les polluants librement dissous dans la colonne d'eau, ce qui se rapproche de la fraction biodisponible. A ce titre, la technique SPMD est innovante et nous paraît intéressante pour notre étude.

L'extrapolation des concentrations dans les SPMD aux concentrations SPMD-disponibles dans l'eau est délicate. Les valeurs des taux d'échantillonnage sont disponibles pour un très large panel de POH, mais leur utilisation dans tous les milieux aquatiques est discutable car les facteurs de variations sont nombreux et difficilement quantifiables. Axelman et al. (1999) montrent ainsi que les concentrations en HAP SPMD-disponibles évaluées sont 9 à 10 fois plus grandes que les concentrations dans l'eau mesurées par SPE dans deux baies de mer du Nord. De même, Stuer-Lauridsen et Kjølholt (2000) observent que les teneurs en HAP SPMD-disponibles représentent entre 30 et 440% des concentrations en HAP totaux dissous dans les eaux usées.

La SPMD apparaît cependant intéressante pour fournir un ordre de grandeur de la contamination des milieux, plus facilement que les techniques ponctuelles qui ne peuvent fournir d'informations sur les concentrations librement dissoutes dans la colonne d'eau.

2 LES SPMD MESURENT-ELLES LES HAP BIODISPONIBLES ?

2.1 Contexte

Les études destinées à évaluer la pertinence de la SPMD comme « mime » de la bioaccumulation sont nombreuses. Plus précisément, la technique SPMD est souvent comparée à l'analyse de la contamination des milieux par biomonitoring. Le biomonitoring consiste en la mesure des POH accumulés dans des organismes biologiques, soit prélevés directement dans le milieu, soit placés pour une durée fixée (poissons en cages et moules). Seule la biodisponibilité des polluants est évaluée par cette méthode, aux processus de détoxification près. Comme le SPMD, c'est une méthode d'échantillonnage intégrée.

Les critères de comparaison entre SPMD et bioaccumulation se situent au niveau de la capacité pour chaque accumulateur à accumuler les POH, en termes de cinétiques et de facteur d'accumulation à l'équilibre (BCF pour les organismes biologiques et « Device Concentration Factor », pour les SPMD). Les profils de répartition des différents POH accumulés sont aussi étudiés.

Les organismes les plus couramment comparés aux SPMD sont les moules, qui, comme les SPMD sont statiques dans le milieu et pour lesquelles les toxico-cinétiques sont lentes. Ces études comparatives sont faites en laboratoires (Kolak et al., 1996; Sabaliūnas et al., 1998; Leppanen et Kukkonen, 2000) ou, plus souvent, sur le terrain (Peven et al., 1996; Gale et al., 1997; Axelman et al., 1999; Granmo et al., 2000).

Les travaux de Peven et al. (1996) montrent que les cinétiques d'accumulation des HAP, des PCB ou du DDT (et de ses dérivés) sont similaires pour les moules et les SPMD et que les concentrations dans les SPMD sont 2 à 10 fois supérieures à celles dans les moules (Figure 26). Les profils de répartition des contaminants individuels sont en revanche assez différents : les moules accumulent plus les POH les plus hydrophobes, alors que les SPMD accumulent plus les POH moins hydrophobes. Cette différence s'explique par l'accumulation par ingestion dans les moules de POH fixés sur les particules, celles-ci ayant plutôt tendance à fixer les composés les plus hydrophobes. En revanche, Sabaliūnas et al. (1998) montrent qu'en laboratoire, quand les moules ne sont pas nourries, les cinétiques d'accumulation et les profils de répartition de quatre pesticides hydrophobes sont similaires. L'expérience de Sabaliūnas et al. (1998) tend à montrer la bonne concordance entre bioconcentration par contact et accumulation dans les SPMD. In situ, l'ingestion de particules contaminées peut jouer un rôle important pour certains organismes alors qu'elle n'est pas prise en compte pour les SPMD.

En comparant l'accumulation des HAPs en cinq sites de la baie de Hongkong, Richardson et al. (2003) montrent que les concentrations dans les SPMD sont inférieures à celles dans les moules. Il faut cependant noter que les HAPs mesurés par Richardson et al. (2003) sont seulement ceux extraits de la trioléine, alors que Gale (1998) suggère que 50% des contaminants sont accumulés

dans la membrane de la SPMD. De plus, les moules d'un des sites sont mortes au cours de l'exposition, ce qui reflète les limites d'utilisation des organismes vivants comme « échantillonneur » dans un milieu très pollué. Cette étude montre aussi des profils de répartition entre les différents contaminants assez différents pour les deux accumulateurs.

Il faut aussi noter que la possibilité de métabolisation de certains POH par les organismes vivants peut expliquer des profils de répartition différents, et est une limite à l'utilisation des SPMD pour représenter la bioaccumulation (Gale et al., 1997).

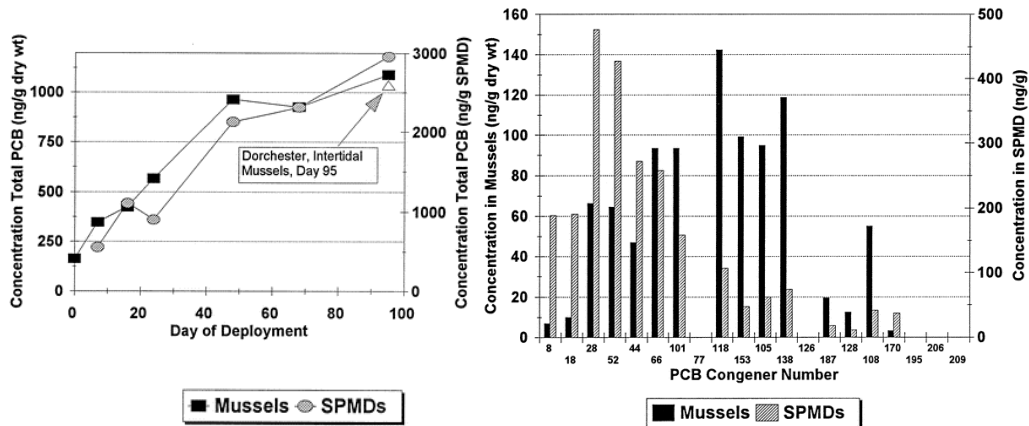


Figure 26 : Cinétique d'accumulation des PCB totaux et accumulation à 68 jours des PCB individuel: comparaison des moules et des SPMD (Source : Peven et al., 1996)

Malgré les différences fondamentales entre les organismes biologiques vivants et les SPMD, la SPMD permet d'approcher de façon relativement simple l'exposition des organismes aux contaminations par les POH. Les SPMD fournissent des résultats plus reproductibles et sont moins sensibles aux conditions environnementales que les organismes vivants utilisés pour le biomonitoring. De plus, les études in situ montrent une bonne concordance générale entre les accumulations dans les SPMD et dans les organismes, bien que l'accumulation des POH dans la SPMD reste une très grande simplification des processus complexes de toxico-cinétiques qui peuvent avoir lieu dans le milieu aquatique.

2.2 Comparaison des HAP bio- et SPMD-disponibles en présence de MOD

Les études de comparaison entre l'accumulation dans les SPMD et la bioaccumulation présupposent que les fractions de POH biodisponibles (par contact) et SPMD-disponibles sont identiques. A notre connaissance, cette hypothèse est uniquement basée sur la comparaison théorique entre la taille moyenne de pores du polyéthylène (entre 5 et 10 Å, Huckins et al., 1990) et une estimation de la taille des pores des organismes biologiques (Chiou, 1985). Il nous a semblé important dans cette étude, de vérifier que les fractions accumulables dans les organismes et dans les SPMD étaient effectivement comparables (en se restreignant aux milieux où l'ingestion n'est pas une voie d'accumulation).

Ainsi, pour justifier de pouvoir passer du modèle biologique de la daphnie au modèle passif SPMD, nous avons comparé l'accumulation de trois HAP (fluoranthène, pyrène et BaP) dans les deux systèmes en présence de matières organiques dissoutes de plusieurs origines. L'objectif est de tester si la fraction biodisponible pour la daphnie et la fraction SPMD-disponible sont les mêmes.

Cette étude a été menée conjointement avec le Cemagref de Lyon, qui a mis au point l'estimation de la fraction SPMD-disponible de HAP en présence de matière organique (Miège et al., in press).

2.2.1 Matériels et méthodes

Cette étude a été menée en deux temps :

- Dans une première série d'expériences, la comparaison a été menée pour cinq MOD et trois HAP, et les accumulations dans les daphnies et dans les SPMD ont été étudiées séparément.
- Pour la seconde série, seul le BaP a été utilisé, quatre MOD ont été testées, et SPMD et daphnies ont été exposées dans le même milieu.

2.2.1.1 Matières organiques et HAP utilisés :

- Première série d'étude :

Cinq matières organiques ont été utilisées : trois MOD naturelles extraites de différentes rivières : Suwannee (Floride, E.U.), Gartempe et Appremont (France) ; ces MOD ont été fournies par le Laboratoire Chimie de l'Eau et de l'Environnement de Poitiers. Le Viandox a aussi été utilisé, ainsi que les acides humiques commerciaux Aldrich.

- Deuxième série d'étude :

Quatre MOD extraites du bassin de la Seine suivant le protocole de l'IHSS (Leenheer et al., 2000) ont été utilisées : 100 L d'eau ont été prélevées à Saint Maurice (Marne en amont de Paris, avril 2003) et à Andrésy (Seine, aval de Paris et de la STEP de Seine-aval, mai 2003). Les échantillons ont été filtrés et acidifiés, puis fractionnés par passage en série sur colonne XAD 8 et XAD 4. Les fractions hydrophobes (retenues sur XAD 8) et transphiliques (retenues sur XAD 4) des MOD ont été éluées par un mélange d'eau et d'acétonitrile. Les éluats ont été lyophilisés jusqu'à l'obtention de la MOD en poudre.

Pour toutes les expériences, les solutions de matières organiques sont préparées par dilution, puis éventuellement filtrées pour ne garder que la fraction dissoute (les MOP retenues alors sur le filtre représentent moins de 5% de l'ensemble de la MO). les HAP sont introduits par dilution d'une solution mère (dans du méthanol ou de l'acétone) à 1 ‰ au maximum. Le milieu constitué d'eau d'Evian, de MOD et de HAP est laissé une heure au repos avant introduction des SPMD et/ou des daphnies. Les concentrations en MOD varient entre 0 et 20 mg/L de COD.

- Au cours de la première série d'expériences, les SPMD ont été exposées à un mélange de cinq HAP (fluoranthène, pyrène, benzo[a]pyrène, benzo[e]pyrène et benzo[k]fluoranthène), à environ 0,5 µg/L chacun (Ravelet et al., en préparation). Les daphnies ont été exposées à un seul HAP à la fois. Seul le fluoranthène, le pyrène et le BaP ont été testés.

- Pour la seconde série d'expériences, seul le BaP a été étudié, à une concentration dans le milieu d'environ 0,8 µg/L dans le milieu d'exposition.

2.2.1.2 Comparaison des accumulations

Pour évaluer l'impact des MOD sur la biodisponibilité pour la daphnie, $K_{DOC}(biol)$ est estimé après bioaccumulation de 4 heures, comme décrit dans l'Article 2.

Pour évaluer la « SPMD-disponibilité », des SPMD de petite taille ont été utilisées (5 cm de long, 2.5 cm de large, 0.05 ml de trioléine). Elles ont été fournies par Exposmeter (Suède). La durée d'exposition des SPMD a été de trois heures. Des études préliminaires ont permis de vérifier la linéarité de l'accumulation des HAP sur les trois heures (Tusseau-Vuillemin et al., 2003; Miège et al., in press).

- Dans la première série d'expériences, chaque SPMD a été placée dans 500 ml d'Evian pur ou contenant 10 mg/L de COD. Deux réplicats ont été réalisés pour chaque mesure.
- Dans la deuxième série, les expositions de SPMD ont été également réalisées en duplicats, à 4 concentrations en MOD différentes (dont une sans MO). Pour ces expériences, 15 daphnies et une SPMD ont été exposés en même temps dans une solution de 500 ml.

Après exposition, les HAP accumulés dans les SPMD ont été extraits par dialyse (48 heures dans l'heptane). Après concentration et changement de solvant, l'extrait a été analysé par HPLC. Le détail du protocole est disponible dans Miège et al. (in press).

De la même manière que pour la définition de $K_{DOC}(biol)$, on définit un coefficient de partage $K_{DOC}(SPMD)$ entre les HAP disponibles pour l'accumulation dans la SPMD (que l'on suppose être les HAP dissous libres dans l'eau) et les HAP non disponibles (fixés sur les MOD).

$$K_{DOC}(SPMD) = \frac{[HAP - MO]_{nonSPMD-disp}}{[HAP]_{SPMD-disp} \cdot [COD]} \quad \text{Equ. 30}$$

Dans un milieu contenant de la MO, la fraction SPMD-disponible $f_{SPMD-disp}$ peut s'écrire :

$$f_{SPMD-disp} = \frac{1}{1 + K_{DOC}(SPMD) \cdot [COD]} \quad \text{Equ. 31}$$

Dans un milieu sans MO, tous les HAP sont disponibles. En supposant que les SPMD, de la même forme, ont toute la même constante d'accumulation k_u , la fraction SPMD disponible dans le milieu peut s'évaluer par le ratio des concentrations accumulées dans les milieux avec et sans MO :

$$\begin{aligned} \frac{C_{SPMD-MO}}{C_{SPMD-0}} &= \frac{k_u \cdot C_{SPMD-disp} \cdot t}{k_u \cdot C_{total} \cdot t} = f_{SPMD-disp} \\ &= \frac{1}{1 + K_{DOC}(SPMD) \cdot [COD]} \end{aligned} \quad \text{Equ. 32}$$

Le rapport des teneurs en HAP accumulé dans les SPMD avec et sans MOD permet donc d'évaluer la constante de partition $K_{DOC}(SPMD)$.

Pour plus de lisibilité, nous avons choisi de représenter la capacité des MOD à réduire l'accumulation par un paramètre dérivé F_{10} défini par :

$$F_{10} = \frac{1}{1 + K_{DOC} \cdot 10^{-5}} \quad \text{Equ. 33}$$

$F_{10}(biol)$ et $F_{10}(SPMD)$ représentent les fractions de HAP disponibles pour les daphnies et les SPMD respectivement en présence de 10 mg/L de COD. Plus F_{10} est petit (i.e. plus K_{DOC} est grand), plus la MOD joue un rôle de piège des contaminants et réduit l'accumulation.

Pour chaque estimation de F_{10} , l'écart-type est estimé :

- pour $F_{10}(biol)$, à partir de l'incertitude sur $K_{DOC}(biol)$ liée à la régression non linéaire (Article 2)
- pour $F_{10}(SPMD)$, à partir des écarts-types entre les réplicats pour les SPMD.

La comparaison des fractions $F_{10}(biol)$ et $F_{10}(SPMD)$ permet de vérifier si la SPMD reproduit le processus de bioaccumulation dans les daphnies. Un test de Student bilatéral a été utilisé pour vérifier si les différences entre $F_{10}(biol)$ et $F_{10}(SPMD)$ sont significatives.

2.2.2 Résultats et discussion

2.2.2.1 Comparaison des fractions accumulées dans les daphnies et les SPMD

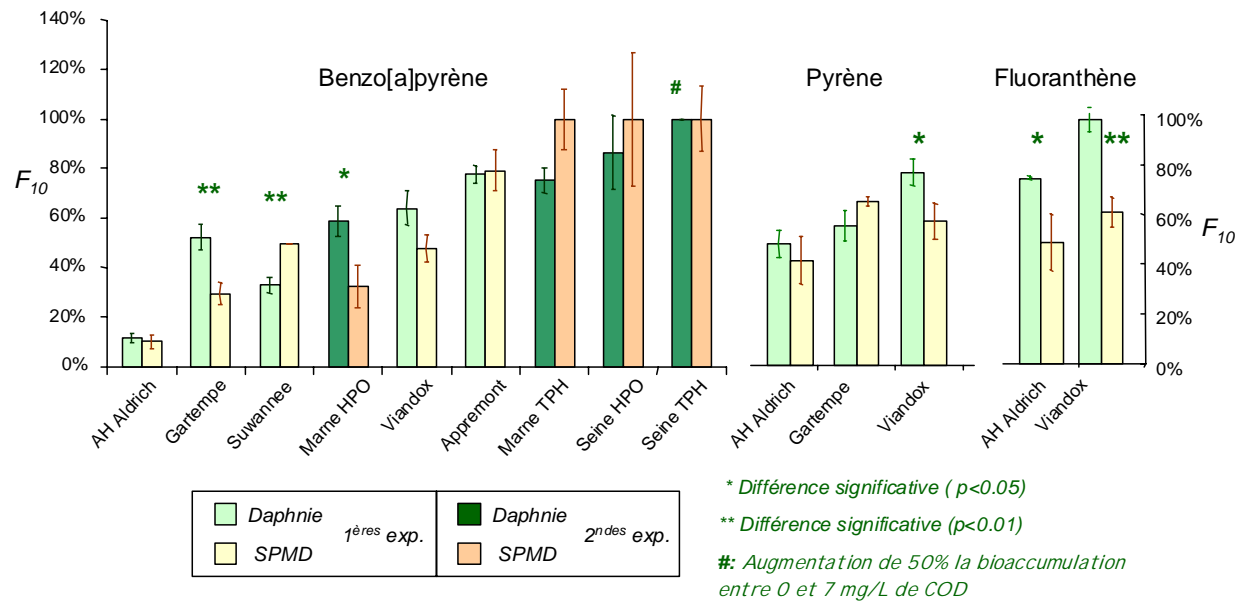


Figure 27 : Fraction de HAP accumulée par les SPMD et par les daphnies en présence de 10 mg/L de COD (F_{10})

L'ensemble des résultats est présenté dans la Figure 27. Les fractions accumulées dans les deux modèles, biologique et SPMD, sont proches pour le benzo[a]pyrène et pour le pyrène. Les différences entre les fractions de HAP disponibles n'excèdent pas 26% (pour le BaP et les MOD hydrophobes de la Marne) et sont en moyenne de 14%. Elle sont significatives dans 4 cas sur 12, en partie du fait du très faible écart-type sur les mesures dans les SPMD. Les différences significatives observées correspondent à une différence de moins de 0,5 unité de $\log K_{DOC}$ unité généralement utilisée pour comparer les constantes de partition. Cette différence reste minime

compte tenu des incertitudes liées au protocole expérimental, aux mesures, et aux régressions mathématiques.

Les fractions sont en revanche assez différentes pour le fluoranthène. On constate que la fraction SPMD-disponible est significativement plus faible que la fraction biodisponible pour la daphnie. Ainsi, la présence de 10 mg C/L de Viadox n'influence pas la bioaccumulation du fluoranthène dans la daphnie alors qu'elle réduit de 37% l'accumulation dans le SPMD. Il semble donc que le SPMD sous-estime la fraction biodisponible du fluoranthène, bien que ces résultats nécessitent une confirmation sur d'autres matières organiques.

Sur l'ensemble des 14 points de comparaison :

- la fraction SPMD-disponible correspond à la fraction biodisponibles à moins de 25 % près dans 11 cas
- le SPMD sous-estime de plus de 25% la biodisponibilité dans 3 cas. L'erreur maximale sur F_{10} est de 37%, pour le fluoranthène.

Remarque :

La différence entre les fractions disponibles pour les daphnies et les SPMD dépend de la concentration en MOD. La différence est théoriquement maximale pour $COD = 1/(K_{DOC}(biol).K_{DOC}(SPMD))^{1/2}$.

La sous-estimation que l'on observe peut être due à un critère de taille des membranes des « accumulateurs ». Certains complexes peuvent traverser les membranes biologiques et ne pas être disponibles pour le SPMD, la membrane du SPMD est plus restrictive que les membranes biologiques. Une autre hypothèse peut être la limitation de l'accumulation par la présence de MOD, qui occupe les pores de la membrane du SPMD, réduisant ainsi la cinétique d'accumulation. Enfin, la différence peut être due au caractère plus ou moins « labile » de certains HAP fixés faiblement sur les MOD, qui seraient désorbés au contact de la membrane biologique, mais resteraient inaccessibles pour le SPMD. Dans le cas des métaux, il a déjà été montré que la capacité de dissociation des complexes métaux-MOD, et par conséquent leur disponibilité pour les organismes vivants ou les échantillonneurs passifs dépendaient de la durée de contact et de la nature des membranes (biologiques ou physiques) (Tusseau-Vuillemin et al., 2003). Ces mêmes paramètres pourraient être à l'origine des différences d'accumulation entre les daphnies et les SPMD. Les expériences réalisées ici ne permettent pas de discriminer entre les différentes hypothèses. De plus, les écarts entre SPMD et daphnies restent limités.

2.2.2.2 Variabilité de F_{10} selon l'origine de la matière organique.

Les résultats concernant le benzo[a]pyrène permettent de mettre en évidence la forte variabilité de la capacité à moduler la disponibilité du POH selon la nature de la MO. Pour une même concentration en COD, les acides Aldrich réduisent de 90% l'accumulation dans les daphnies et les SPMD, alors que les acides humiques issus de la Seine à l'aval de la station d'épuration Seine-Aval n'ont pas d'effet sur la disponibilité du BaP pour les daphnies ou les SPMD.

D'une manière générale, les matières organiques naturelles et humiques ont un effet plus important que les matières organiques plus hydrophiles, comme les fractions transphiliques des

MOD du bassin versant de la Seine. Le Viandox, largement biodégradable mais qui contient aussi des sites de fixation pour le BaP (Articles 2 et 3) présente un effet intermédiaire entre les MO naturelles très humiques et les MOD issues de rivières anthropisées.

Il n'est aujourd'hui pas possible de donner des explications précises sur ces effets, car les modes d'interactions des HAP avec la MOD sont nombreux et cette dernière très complexe dans sa composition. Comme le montre la Figure 28, l'aromaticité des MO ne peut pas vraiment expliquer les variabilités observées entre les différentes MOD. Des travaux sont en cours (thèse d'A. Noir au Cemagref de Lyon notamment) pour tenter de mieux appréhender ces facteurs explicatifs, en allant au delà de critères trop globaux tels que l'aromaticité.

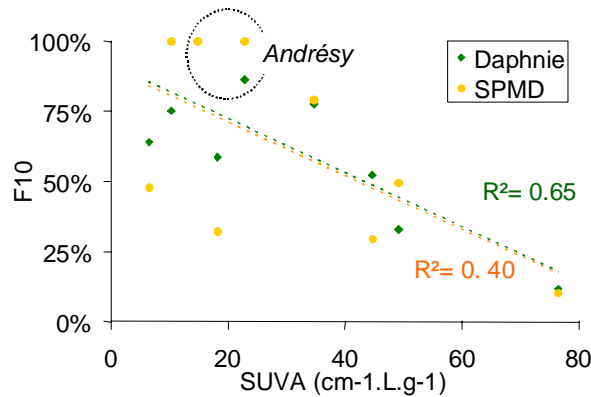


Figure 28 : Relation entre les F_{10} pour chaque accumulateur et l'aromaticité des MOD.

2.3 Conclusion

Cette étude montre une raisonnablement bonne corrélation entre la fraction SPMD-disponible et la fraction biodisponible pour les daphnies pour les deux HAP les plus lourds, le pyrène et le benzo[a]pyrène. Dans quelques cas, pour le fluoranthène en particulier, la SPMD sous-estime la fraction biodisponible, la fraction de HAP échantillonnée étant plus restrictive. L'erreur faite en estimant la biodisponibilité par une mesure SPMD en présence de 10 mg/L de COD est de moins de 25% dans 11 cas sur 14. Dans tous les cas, elle est inférieure à 40%.

Ces divergences nous paraissent acceptables compte tenu des variabilités dans les estimations des constantes de partition, et de la difficulté de pouvoir estimer la biodisponibilité in situ.

3 BIODISPONIBILITE DES HAP IN SITU : PEUT-ON OBSERVER L'INFLUENCE DES MATIERES ORGANIQUES ?

3.1 Objectifs

Dans la dernière partie de notre travail, nous avons abordé l'évaluation de l'influence de la matière organique sur la biodisponibilité des HAP *in situ*. L'objectif général de ce travail était de voir si les relations observées en laboratoire entre les caractéristiques de la matière organique (notamment son aromaticité, son origine et sa biodégradabilité) et leur capacité à moduler la biodisponibilité des HAP étaient vérifiées dans les écosystèmes aquatiques réels.

Nous avons donc pour cela cherché à évaluer in situ les concentrations en HAP biodisponibles, dissous et particulaires, et à comparer les relations entre ces différentes concentrations et les caractéristiques physico-chimiques du milieu en général, les caractéristiques de la matière organique en particulier. Les HAP biodisponibles ont été supposés équivalents aux HAP échantillonnés par la technique SPMD.

Le site d'étude a été le bassin versant de la Seine, qui présente un grande variabilité de milieux, depuis les zones amont naturelles plutôt forestières, les zones agricoles, ou encore des zones sous pression anthropique forte (forte densité de population et/ou des activités industrielles importantes). Les eaux de la Seine connaissant aussi une grande variabilité hydrologique et géochimique : crues hivernales et lessivage des sols, bloom algal au printemps, étiage en été...

Ce travail a été l'objet d'un stage de DEA (Wang, 2003) effectué au CEREVE, en collaboration avec le Cemagref de Lyon. A cette campagne de terrain a été couplée une étude similaire sur plusieurs effluents de stations d'épuration en région lyonnaise menée par le laboratoire d'analyses des micro-polluants organiques du Cemagref de Lyon. L'ensemble des deux études fait l'objet de l'Article 5.

3.2 Matériels et méthodes

Les SPMD ont été déployés dans le bassin de la Seine sur trois sites subissant des pressions anthropiques diverses :

- sur le rû des Quatre Cents qui draine un petit bassin versant forestier (1,1 km²), dans le bassin versant de l'Orgeval en amont de la Marne,
- à Saint Maurice, sur la Marne, juste en amont de la confluence avec la Seine
- à Andrésy, sur la Seine, à l'aval de la station d'épuration Seine-Aval d'Achères (recevant les eaux de 8 millions d'habitants, débit nominal des effluents de sortie de 24 m³/s).

Deux campagnes ont été menées : une en fin d'hiver (février/mars 2003) et une au printemps (avril 2003), dans le but d'avoir des MO de types différents, et d'échantillonner en particulier pendant la période de bloom algal du printemps.

Mesures de HAP effectuées

- mesure des HAP dans les SPMD (C_{SPMD})

Six SPMD standard par site ont été déployées, relevées en duplicats à trois temps différents (3, 7 et 14 ou 21 jours). Les SPMD étaient nettoyées deux fois par semaine afin de limiter le biofouling. Après exposition, les SPMD étaient nettoyées de nouveau et les HAP étaient extraits par double dialyse dans l'heptane.

- mesure des HAP dans l'eau filtrée ($C_{dissous}$) et sur les particules en suspension (C_{part})

En début d'exposition et à chaque relevé de SPMD, 2 L d'eau étaient échantillonnées et filtrées sur un filtre GF-F. Après séchage du filtre, les HAP sur le filtre étaient extraits par Soxhlet (8h avec 80 ml d'heptane). Les HAP de l'eau filtrée (1 L) étaient extraits par extraction sur phase solide. (SPE)

Les extraits de SPMD, de l'eau filtrée et des particules étaient concentrés, purifiés, séparés en deux (une moitié servant pour l'analyse des PCB, non présentée ici). Les échantillons étaient remis dans un solvant adapté (volume final pour l'analyse : 1 ml) et analysés par chromatographie en phase liquide avec détection de fluorescence (HPLC-fluo, voir le détail du protocole dans l'Article 5)

Treize HAP ont été mesurés dans les extraits : il s'agit des seize HAP définis comme prioritaires par l'US EPA, à l'exception du naphthalène (trop volatile pour être analysé de la même façon), de l'acénaphthylène (qui n'est pas détecté en fluorescence) et du phénanthrène (pour lequel le pic du chromatogramme n'est pas correctement exploitable à cause de composés interférents). Les 13 HAP sont séparés en deux catégories :

- les HAP « légers », qui ont au plus trois cycles
- les HAP « lourds » qui ont quatre cycles ou plus

La liste des treize HAP analysés et les limites de détection et de quantification associés au protocole sont disponibles dans le Tableau 16 ci-dessous.

Caractérisation du milieu

Le suivi géochimique du milieu a été effectué pendant les périodes de déploiement des SPMD. A chaque intervention sur site (pose et relève des SPMD) le pH et la conductivité étaient mesurés et 2 L d'eau étaient prélevés pour les analyses de COD, COD biodégradable (suivant le protocole de Servais et al. (1995) sans bullage), chlorophylle a, matière en suspension (MES) et COP. La température était suivie en continu (sonde laissée sur le site) et le débit était disponible à pas de temps journalier.

| | | Log K _{OW} | Limite de détection | Limite de quantification |
|---------------|-------------------------|---------------------|---------------------|--------------------------|
| HAP légers | Acénaphthène | 4,1 | 0,3 | 0,8 |
| | Fluorène | 4,4 | 3 | 9 |
| | Anthracène | 4,5 | 0,2 | 0,5 |
| | Fluoranthène | 5,2 | 2 | 4 |
| | Pyrène | 5,3 | 2 | 4 |
| | Benz[a]anthracène | 5,9 | 0,1 | 0,4 |
| | Chrysène | 5,6 | 0,5 | 2 |
| HAP lourds | Benzo[b]fluoranthène | 5,8 | 0,4 | 2 |
| | Benzo[k]fluoranthène | 6,2 | 0,1 | 0,3 |
| | Benzo[a]pyrène | 6,3 | 0,4 | 2 |
| | Dibenz[a,h]anthracène | 6,5 | 0,6 | 2 |
| | Benzo[g,h,i]anthracène | 6,9 | 2 | 5 |
| | Indéno[1,2,3,c,d]pyrène | 6,7 | 4 | 13 |

Tableau 16 : Limites de détection et de quantification (en ng dans l'échantillon passé en HPLC)

3.3 Résultats

3.3.1 Validité et limites des mesures

Biofouling des SPMD

Par le nettoyage régulier des SPMD, nous avons pu limiter l'apparition du biofilm algal et bactérien à la surface des membranes (Photo 4)



Photo 4 : SPMD avant mise à l'eau (gauche) dans les cages de protection, après 21 jours dans la Marne à Saint Maurice, (février 03, milieu), après 14 jours dans la Seine à Andrésy (avril 03, droite)

Linéarité et répétabilité de l'accumulation dans les SPMD

Le suivi des cinétiques d'accumulation dans les SPMD a permis de vérifier la linéarité de l'accumulation de chaque HAP, à l'exception du site des Quatre Cents, pour lequel on a observé une diminution des teneurs en plusieurs HAP au bout de 21 jours (Article 5). Cette diminution peut être due à la photodégradation des HAP, les SPMD étant à la surface de l'eau, et par conséquent exposés à la lumière. Le suivi de ce site n'a malheureusement pas pu être renouvelé au printemps car le rû s'est asséché au début du printemps 2003. Nous avons aussi constaté une

bonne répétabilité des mesures : l'écart-type relatif moyen entre les duplicats était de 18% (Article 5).

Détection des polluants dans l'eau

En hiver, les treize HAP ont été détectés dans toutes les SPMD exposées aux trois sites, à l'exception du benzo[g,h,i,]pérylène et de l'indéno[1,2,3,c,d,]pyrène aux Quatre Cents. Au printemps, les trois HAP les plus lourds (dibenzo[a,h]anthracène, benzo[g,h,i,]pérylène et indéno[1,2,3,c,d,]pyrène) n'étaient pas nécessairement détectés dans les SPMD.

Par la technique d'extraction sur phase solide, les HAP au delà du benzo[a]anthracène ($\log K_{ow} > 5,5$) étaient systématiquement non mesurables dans l'eau pour les trois sites (pics du chromatogramme absents ou inférieurs à la limite de détection).

Les SPMD permettent donc une détection dans l'eau des contaminants les plus hydrophobes qu'il n'a pas été possible d'observer à partir d'une extraction ponctuelle standard.

3.3.2 Evolution des concentrations en HAP dans les différents compartiments

Les mesures des HAP sur les particules et dans l'eau filtrée ont permis de montrer que la contamination augmentait en aval de l'agglomération parisienne et que les concentrations en HAP étaient plus élevées pour la campagne d'hiver (Article 5). Cette tendance peut être attribuée au chauffage hivernal (combustion de fuel, de bois et de gaz).

Les teneurs totales en HAP dans l'eau brute (dissous + particulaire) varient entre 32 et 220 ng/L, ce qui est en accord avec les concentrations précédemment mesurées sur les mêmes sites (entre 40 et 130 en 1994 d'après Chevreuil et al., 1998). Sur les MES, les HAP varient entre 2,7 µg/g aux Quatre Cents et 8,4 µg/g à Andrésy, ce qui est, là encore, comparable aux valeurs rapportées dans Chevreuil et al. (1998).

Les profils des quantités de HAP échantillonnés dans les SPMD par jour d'exposition (Figure 29), des concentrations mesurées sur les particules (Figure 30), et dans l'eau filtrée (Figure 31) sont montrés ci-dessous.

Les profils de répartition des HAP pour les trois types de mesures sont assez différents. On observe une prévalence des HAP légers mesurés dans l'eau par SPE, alors que les HAP lourds dominent sur les particules. Cette répartition a déjà été observée dans la Seine par (Fernandes et al., 1997). Dans les SPMD, les HAP légers sont moyennement accumulés. Les teneurs en HAP lourds (les plus hydrophobes) dans les SPMD sont très faibles, principalement du fait de la faible contamination du milieu par ces HAP et de leur faible solubilité dans l'eau : les HAP les plus lourds sont effectivement observés en quantité significative sur les particules (Figure 30), où ils ne sont pas disponibles pour l'accumulation dans la SPMD.

Pour les trois compartiments, on observe une prédominance dans les HAP lourds du fluoranthène et du pyrène : ce sont les seuls HAP mesurés significativement dans les SPE et ils représentent en moyenne 67% des HAP lourds dans les SPMD (84% à Andrésy). Sur les filtres ils représentent entre 31% (hiver) et 53% (printemps) des HAP totaux. Cette prévalence du couple fluoranthène/

pyrène avait déjà été observé précédemment : Chevreuil et al. (1998) rapportent que ce deux composés représentent 45 % de l'ensemble des 16 HAP mesurés dans les sédiments en Seine.

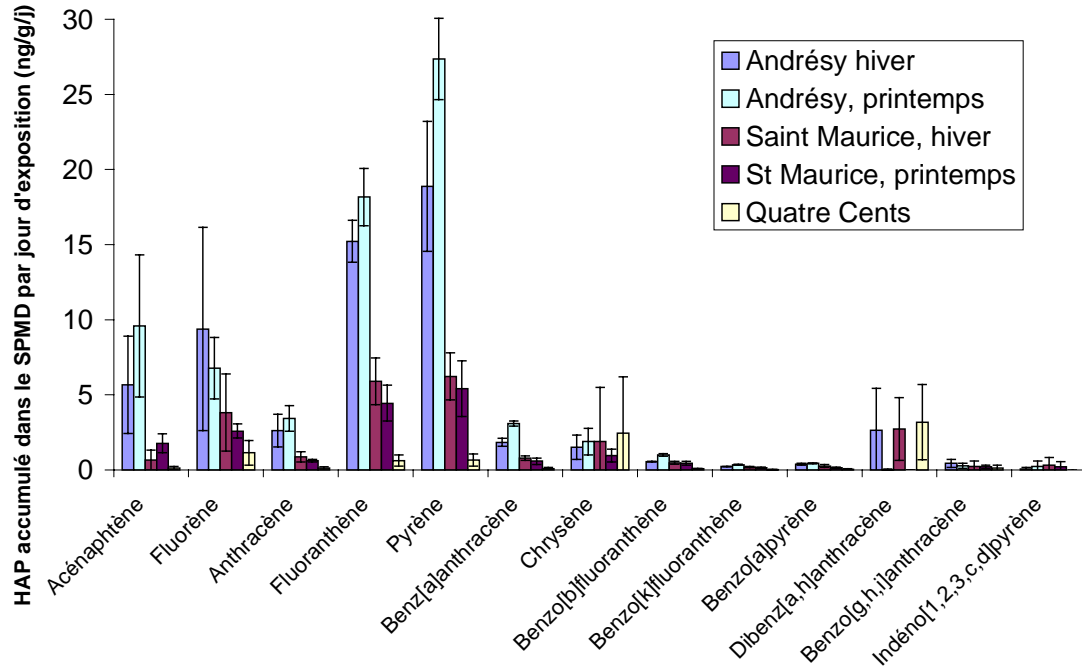


Figure 29 : HAP dans les SPMD (concentration accumulée par jour en $ng\ g^{-1}\ j^{-1}$) : moyenne et écart-types estimés à partir des six SPMD exposées (trois pour Andrésy, hiver)

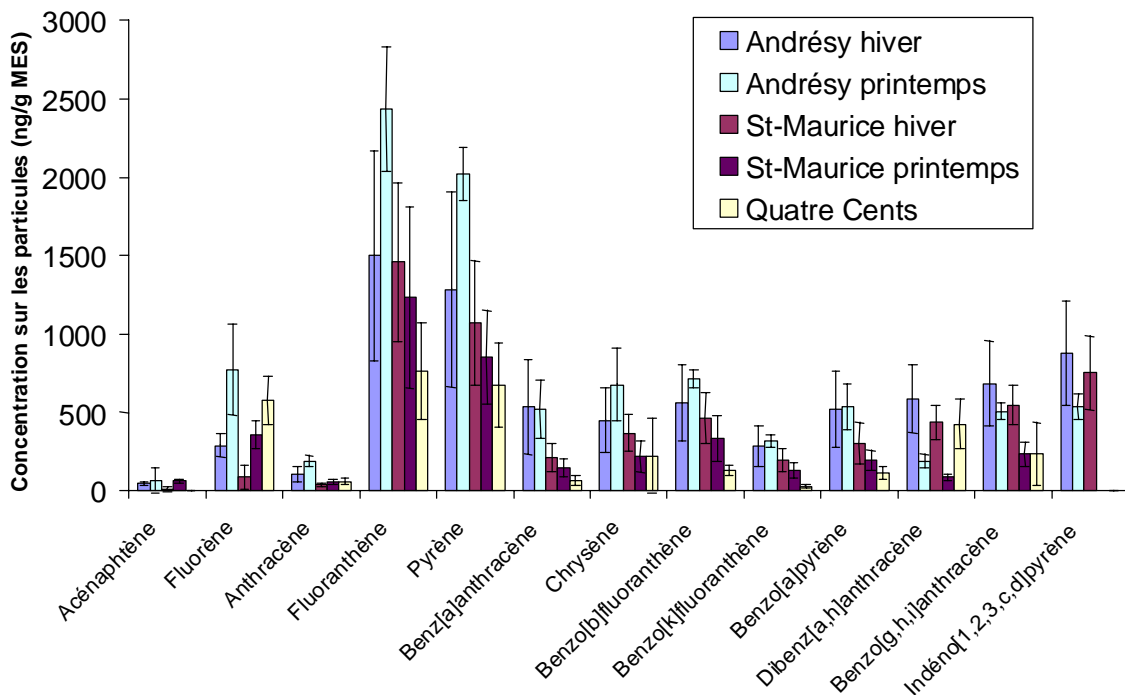


Figure 30 : HAP dans sur les particules (en $ng/g\ MES$). Trois mesures ont été réalisées au cours de chaque exposition.

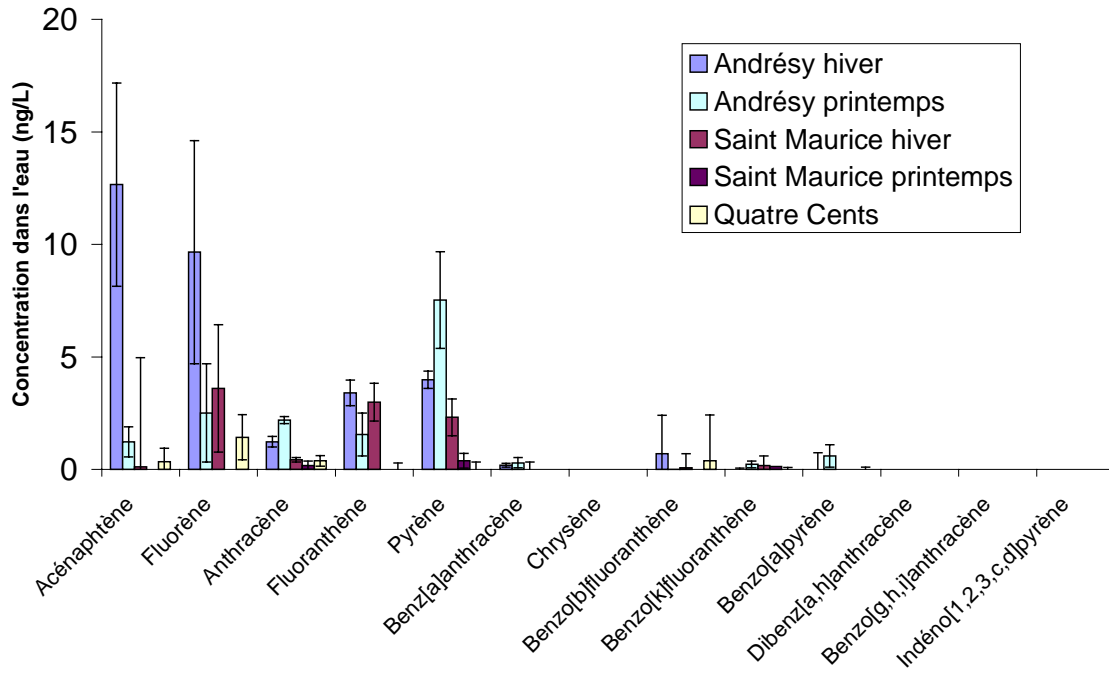


Figure 31 : HAP dans l'eau filtrée (en ng/L). Trois mesures ont été effectuées pour chaque campagne.

3.4 Discussion : peut-on évaluer le rôle des matières organiques ?

3.4.1 Répartition des HAP dans le milieu aquatique

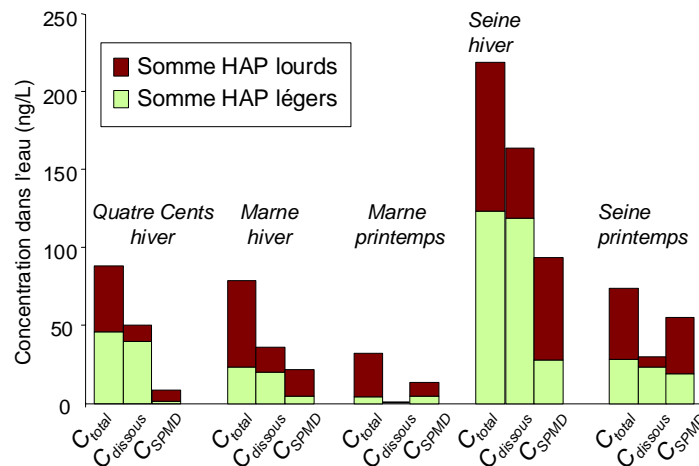


Figure 32 : Concentrations en HAP dans l'eau brute (C_{total}), filtrée ($C_{dis-sous}$) et SPMD-disponibles ($C_{SPMD-disp}$).

Nous avons utilisé les constantes d'échantillonnage R_S établies pour les SPMD standard à 10 °C par Huckins et al. (1999) (Tableau 15) afin d'évaluer les concentrations en HAP SPMD-disponibles ($C_{SPMD-disp}$). Ces concentrations sont une estimation des teneurs en polluants

biodisponibles par contact direct pour les organismes. Sur la Figure 32 sont présentées les concentrations dans l'eau brute, filtrée, et les concentrations SPMD-disponibles, ces dernières étant théoriquement une fraction des HAP dissous dans l'eau.

Les concentrations SPMD-disponibles de l'ensemble des HAP représentent en moyenne entre 10 et 75% des concentrations totales dans l'eau (somme des HAP dissous et particulaires), ce rapport augmente d'amont en aval, et au printemps, ce qui tend à montrer que les HAP sont plus biodisponibles à l'aval de Paris (zone plus anthropique) et au printemps. Le rapport $C_{SPMD-disp}/C_{total}$ est défini pour la suite et dans l'Article 5 comme indicateur de la biodisponibilité pour les HAP.

3.4.2 Limites liées à l'estimation de $C_{dissous}$ et $C_{SPMD-disp}$

Limites de l'échantillonnage par SPE

Il n'a pas été possible d'évaluer les concentrations dissoutes des HAP les plus lourds par SPE. Leur présence dans les SPMD et sur les particules montre néanmoins que le milieu est contaminé par ces HAP. La méthode employée n'est donc pas assez sensible pour mesurer les HAP les plus lourds dans l'eau filtrée.

Une évaluation théorique des limites de détection pour chaque technique en fonction des volumes échantillonnés pour la SPE et de la durée d'exposition pour la SPMD est présentée dans le Tableau 17. Nous constatons qu'une extraction de 500 ml d'eau (comme il a été réalisé ici) par SPE implique des limites de détection bien plus élevées que les mesures par SPMD après seulement 3 jours d'exposition et trop importantes par rapport au niveau moyen de contamination du milieu étudié (de l'ordre de 50-200 ng/L d'après Fernandes et al., 1997, ou Chevreuil et al., 1998) Ce tableau montre aussi les très bons niveaux de détection pour le protocole SPMD.

| | Volume extrait par SPE | | | SPMD standard de 4,5 g environ | |
|-------------------------|------------------------|-------------|------------|--------------------------------|-----------------|
| | 500 ml | 1 L | 5L | sur 3j d'exposition | sur 14j d'expo. |
| Acénaphène | 0,6 | 0,3 | 0,06 | 0,2 | <0,05 |
| Fluorène | 6 | 3 | 0,6 | 1,5 | 0,3 |
| Anthracène | 0,4 | 0,2 | 0,04 | 0,1 | <0,02 |
| Fluoranthène | 4 | 2 | 0,4 | 0,8 | 0,2 |
| Pyrène | 4 | 2 | 0,4 | 0,7 | 0,1 |
| Benz[a]anthracène | 0,2 | 0,1 | <0,05 | 0,05 | <0,05 |
| Chrysène | 1 | 0,5 | 0,1 | 0,2 | <0,05 |
| Benzo[b]fluoranthène | 0,8 | 0,4 | 0,08 | 0,2 | <0,05 |
| Benzo[k]fluoranthène | 0,2 | 0,1 | <0,05 | 0,1 | <0,05 |
| Benzo[a]pyrène | 0,8 | 0,4 | 0,08 | 0,2 | <0,05 |
| Dibenz[a,h]anthracène | 1,2 | 0,6 | 0,12 | 0,5 | 0,1 |
| Benzo[g,h,i]anthracène | 4 | 2 | 0,4 | 1,7 | 0,4 |
| Indéno[1,2,3,c,d]pyrène | 8 | 4 | 0,8 | 2,0 | 0,4 |
| Somme | 31,2 | 15,6 | 3,1 | 8,1 | 1,7 |

Tableau 17 : limite de détection des HAP dans l'eau (en ng/L) pour les SPE et les SPMD en fonction des volumes échantillonnés pour la SPE et de la durée d'exposition des SPMD.

Validité des $C_{SPMD-disp}$

Pour l'ensemble des HAP pris individuellement, $C_{SPMD-disp}$ représente entre 1 et 300% de la concentration totale. Le rapport des concentrations individuelles SPMD-disponibles et dissoutes est encore plus élevée, et varie entre 4 et 350%. Ces résultats sont du même ordre que ceux de Stuer-Lauridsen et Kjølholt (2000) par exemple, qui mesurent que $C_{SPMD-disp}$ représente entre 30 et 440% C_{totale} .

Les concentrations en HAP totaux sont parfois inférieures aux concentrations SPMD-disponibles (Figure 32) et les concentrations SPMD-disponibles en HAP lourds sont toujours plus élevées que les concentrations dissoutes.

La supériorité des concentrations SPMD-disponibles par rapport aux concentrations dissoutes pour les HAP individuels montre que l'estimation des concentrations SPMD-disponibles à partir des teneurs dans les SPMD est discutable. En particulier, les coefficients d'échantillonnage R_s établis au laboratoire ne sont très probablement pas applicables dans les milieux étudiés ici.

3.4.3 Biodisponibilité et caractéristiques des milieux aquatiques

Comme explicité dans l'Article 5, les concentrations SPMD-disponibles telles qu'évaluées dans cette étude ne permettent pas réellement d'estimer les teneurs en HAP biodisponibles dans le milieu. Cependant, en faisant l'hypothèse que l'accumulation des HAP est similaire pour l'ensemble de sites (c'est-à-dire que les facteurs de variation d'un milieu à l'autre n'influencent pas les constantes d'échantillonnage des HAP dans les SPMD), ces teneurs en HAP dans les SPMD fournissant une information relative de la biodisponibilité des HAP (Article 5).

Dans l'Article 5, nous mettons en évidence une relation négative entre l'indicateur de biodisponibilité des HAP et la teneurs en matières en suspension. La biodisponibilité des HAP diminue aussi quand la matière organique dissoute du milieu est plus aromatique et moins biodégradable. Ce résultat semble donc montrer que les caractéristiques de la matière organique telles que nous les avons étudiées en laboratoire peuvent influencer la biodisponibilité des HAP in situ. Ces résultats constituent une toute première approche du rôle des caractéristiques de l'environnement sur la biodisponibilité des HAP ; ils doivent être approfondis et confirmés par d'autres analyses in situ, après amélioration et validation des outils de mesure.

3.5 Conclusion et perspectives

Compte tenu de la complexité et de la nouveauté d'une telle campagne d'échantillonnage, les deux expériences menées n'ont malheureusement pas fourni de résultats permettant de conclure par rapport à l'objectif recherché. Ils ont principalement permis de mettre au point l'ensemble des méthodologies.

- L'application des SPMD in situ est techniquement faisable. Les protocoles pour la mise en place in situ, le nettoyage régulier et le traitement des SPMD ont été validés. Les accumulations des HAP dans les SPMD étaient excellentes et bien reproductibles pendant la durée d'exposition de 14 jours. La technique SPMD a été mise en place sur les sites étudiés

et a permis de détecter l'ensemble des HAP dans la phase dissoute. Elle offre de nombreux avantages par rapport à l'échantillonnage et l'analyse par SPE de l'eau.

- Les teneurs en HAP dans les SPMD aux différents sites ont été comparées afin d'étudier la contamination dans le bassin versant. Le rapport entre les concentrations dans la SPMD et les concentrations totales reflète la biodisponibilité des contaminants. Nous avons ainsi montré une augmentation de la biodisponibilité des HAP de l'amont du bassin jusqu'à l'aval de la station d'épuration en Seine, et il semble que l'aromaticité des MOD soit corrélée négativement à la biodisponibilité des HAP.
- les HAP particuliers ont pu être estimés correctement sur tous les sites.
- Les mesures des HAP dissous par SPE dans cette étude ne sont pas très satisfaisantes, principalement pour des raisons de limites de détection. La SPE semble être un bon outil pour comprendre la répartition des HAP dans l'eau, sous réserve de pouvoir améliorer sensiblement les protocoles d'échantillonnage pour diminuer les limites de détection (augmentation du volume échantillonné, baisse du volume final de l'échantillon, utilisation d'un étalon interne).

L'analyse de la répartition des HAP dans les différentes phases (eau, MOD, MES) n'est pas possible à l'issue de ces campagnes du fait des difficultés analytiques rencontrées, mais aussi et surtout de l'impossibilité d'évaluer correctement les concentrations SPMD-disponibles à partir de teneurs dans les SPMD. Les R_s issus de Huckins et al. (1999) semblent surestimer fortement les teneurs en HAP disponibles pour la SPMD.

Pour ce dernier point, il convient de développer une nouvelle approche qui permette d'évaluer in situ les coefficients d'échantillonnage R_s . L'utilisation de SPMD préalablement dopées par des composé de références (HAP deutérés) est une amélioration prometteuse. En effet, le suivi de l'élimination de la SPMD des composés de référence peut permettre d'évaluer les constantes d'échange et ainsi d'estimer les coefficients d'échantillonnage R_s des composés accumulés. Ce travail est actuellement poursuivi au CEREVE et au Cemagref (Garric et al., 2004; Bollaert, 2004). Une fois les protocoles validés pour la suite du suivi de la contamination de la Seine, il sera possible d'approfondir les études de l'influence des caractéristiques du milieu, et en particulier du rôle des MOD, sur la répartition des HAP dans le milieu aquatique.

CONCLUSION

L'évaluation de l'état écologique d'un milieu aquatique tel que définie dans la Directive-Cadre Européenne sur l'Eau prend en compte plusieurs indices chimiques et biologiques. Pour appréhender la vulnérabilité des écosystèmes soumis aux pressions anthropiques et définir des seuils de rejets des micro-polluants dans les écosystèmes, il est nécessaire aujourd'hui de mieux comprendre les relations entre les différentes variables chimiques et biologiques qui caractérisent le milieu récepteur.

Les micro-polluants rejetés interagissent avec le milieu par des processus biologiques, physico-chimiques et mécaniques, qui modifient leur biodisponibilité. Les interactions physico-chimiques avec les matières organiques sont un paramètre déterminant pour le devenir des contaminants.

Les milieux aquatiques subissant une pression anthropique forte reçoivent une grande partie des micro-polluants issus de l'activité humaine et industrielle. Ces milieux sont aussi chargés en MO d'origine anthropique et naturelle. Jusqu'alors la plupart des études ont porté sur les interactions entre les micro-polluants et les substances humiques. Ces MO hydrophobes et faiblement biodégradables forment la majorité des MO naturelles, mais ne sont pas représentatives des eaux polluées fortement anthropisées. La MO anthropique est en effet plus hydrophile et moins stable. Elle est néanmoins aussi susceptible d'interagir avec les micro-polluants. De plus, elle peut être dégradée par l'activité bactérienne du milieu. Au fur et à mesure de la biodégradation, les interactions avec les micro-polluants, et par conséquent leur biodisponibilité, peuvent évoluer.

Ce travail avait pour but de contribuer à la compréhension de l'influence des matières organiques présentes en quantité dans les milieux aquatiques anthropisés et urbains sur la biodisponibilité des HAP. Il a été mené selon trois axes principaux :

- une partie méthodologique a consisté à développer et/ ou à mettre en œuvre en les adaptant différentes techniques expérimentales : mesure de la bioaccumulation, quantification de l'effet des MO, suivi de la dégradation en réacteurs, mise au point de la technique SPMD.
- Le cœur du sujet a consisté à utiliser les protocoles mis en place pour analyser le rôle des MO sur la biodisponibilité des HAP (du benzo[a]pyrène en particulier) et l'influence de l'origine, de l'aromaticité et de la biodégradabilité de ces MO sur l'intensité des interactions avec les HAP, en laboratoire et sur site.
- Une modélisation des phénomènes observés a été développée, à partir d'un modèle qui décrit la biodégradation des MO en rivière.

Nous avons pu développer une méthode simple et rapide d'estimation de la bioaccumulation des HAP dans les daphnies ; elle a été validée pour le fluoranthène et pour le benzo[a]pyrène. Cette méthode a été appliquée à l'étude de l'influence de la MO sur la bioaccumulation. L'hypothèse du « polluant libre » qui suppose que la MO limite la biodisponibilité des POH en les fixant, créant ainsi des structures non biodisponibles, a permis d'expliquer les résultats observés et de quantifier l'influence de la MOD sur la bioaccumulation par un coefficient de partition « biologique »

$K_{DOC}(biol)$. Cette hypothèse se traduit par un modèle hyperbolique simple pour décrire l'évolution de la fraction biodisponible des POH en fonction de la teneur en carbone organique. $K_{DOC}(biol)$ traduit la capacité de la MO à limiter la biodisponibilité des HAP, il définit la partition entre une fraction des HAP associée à de la matière organique et rendue non-disponible et une fraction encore disponible (supposée essentiellement libre).

L'étude couplée des caractéristiques de la MO et de son impact sur la biodisponibilité du benzo[a]pyrène a conduit aux principales conclusions suivantes :

- Les matières organiques biodégradables influencent significativement la biodisponibilité du BaP à des concentrations environnementales (moins d'une dizaine de mg C/L). Leur influence est moins forte que celle de la MO naturelle ou des substances humiques, mais ces MO peuvent être présentes en grande quantité dans les milieux anthropisés.
- La capacité d'interaction avec le BaP augmente quand la matière organique dissoute se minéralise et devient par conséquent moins biodégradable. Cette observation est expliquée d'une part car les composés de la MOD les plus réfractaires fixent plus le BaP et d'autre part par la présence croissante de produits microbiens formés au cours de l'activité bactérienne. Nous avons montré que ces produits microbiens avaient une capacité d'interaction importante avec le BaP.
- Contrairement à ce qui a été souvent avancé pour les eaux naturelles, l'aromaticité de la MOD ne peut être corrélée systématiquement à sa capacité d'interaction avec les HAP. Les MOD d'origine algale ont une grande capacité de fixation des HAP, bien que leur aromaticité soit très faible. Ce type de MOD peut être majoritaire dans certains milieux aquatiques, notamment dans les eaux eutrophes.
- La matière organique particulaire interagit avec le BaP. L'origine de la MOP influence sa capacité d'interaction. L'accumulation du BaP dans les daphnies par voie trophique semble négligeable ; les MOP jouent essentiellement un rôle de piège du BaP en limitant sa biodisponibilité.

Le modèle mis en place a permis de montrer qu'il était possible de prédire les coefficients de partition de la MOD pour le BaP à partir d'un fractionnement de la MOD en classes de biodégradabilité. Il reste encore peu validé et devra être testé à partir d'autres données pour aboutir à une évaluation des paramètres plus adaptée à la complexité des milieux naturels. En effet, les valeurs des paramètres K_{DOC} obtenues pour les différentes fractions associées aux deux substrats étudiés sont assez différentes, mais la même tendance générale est observée alors que les valeurs des paramètres sont encore peu contraintes par les données. De plus, certains paramètres concernant la modélisation de la dégradation de la MO n'ont pas pu être précisés, notamment en ce qui concerne les produits microbiens. Cependant, ce modèle ouvre de nouvelles voies de recherche dans la mesure où il permet de coupler écotoxicologie et dynamiques écologiques (dynamique de la MO et activité bactérienne).

Enfin, la technique d'échantillonnage par SPMD a été testée pour l'estimation des HAP biodisponibles in situ. Nous avons vérifié la validité de la SPMD pour l'échantillonnage de la fraction biodisponible des HAP, en montrant que la fraction accumulée dans la SPMD était

proche de la fraction biodisponible pour les daphnies. La technique SPMD a été appliquée pour l'échantillonnage des HAP sur trois sites du bassin versant de la Seine. L'objectif initial était d'analyser la répartition des HAP entre les phases particulaire, dissoute et biodisponible, en fonction des conditions environnementales et des caractéristiques des matières organiques présentes. Cependant, les difficultés techniques et analytiques rencontrées au cours des deux campagnes ont limité l'exploitation des données. Ce travail doit être considéré comme une étude préliminaire ayant permis d'améliorer les protocoles d'utilisation des SPMD et des autres techniques analytiques, et surtout de montrer les limites de l'utilisation des constantes d'échantillonnage mesurées en laboratoire pour estimer les concentrations SPMD-disponibles dans le milieu.

Finalement, ce travail montre l'importance des matières organiques biodégradables dans le contrôle de la biodisponibilité des HAP. Ces matières organiques sont typiques des milieux soumis aux pressions anthropiques, qui sont aussi souvent les plus contaminés par les micropolluants divers. Nous mettons ici en avant la nécessité de considérer ces types de matières organiques et leur dynamique pour évaluer la biodisponibilité des contaminants au moment de leur rejet et à plus long terme dans le milieu récepteur.

Perspectives

Les résultats obtenus dans cette étude doivent maintenant être approfondis et précisés. L'application du modèle couplé biodégradation/ capacité d'interaction avec les contaminants pour décrire l'évolution dans le temps et l'espace de leur biodisponibilité constitue l'objectif final de ce travail. Plusieurs étapes sont encore nécessaires pour y parvenir :

- Nous avons montré que la biodégradabilité de la MO pouvait être une voie de caractérisation intéressante, bien qu'indirecte du point de vue des processus. L'observation de relations entre biodégradabilité et capacité à limiter la biodisponibilité du BaP devra être validée sur des effluents réels plus complexes et sur des MO issues de milieux aquatiques récepteurs. Pour ces expériences une extraction (ou au moins une pré-concentration) des MO du milieu sera sûrement nécessaire.
- La biodégradation de la matière organique n'est pas parfaitement décrite par le modèle proposé. En particulier, les cinétiques de formation/ dégradation des résidus bactériens sont très grossièrement décrites. Les processus de dégradation de la MO les plus lents (plusieurs jours) impliquent largement des résidus bactériens : en fin du processus de dégradation, ils peuvent représenter jusque 50% de la MO résiduelle. La capacité d'interaction des SMP avec le BaP a été montrée dans cette étude, il est donc important pouvoir mieux comprendre et modéliser leur dynamique dans les modèles de biodégradation de la MO.
- Nous avons accordé une part importante au compartiment dissous, ce qui a permis de s'intéresser à l'accumulation par contact uniquement (forme prédominante

d'accumulation pour les organismes de la colonne d'eau) et ainsi de limiter la complexité des phénomènes observés. Dans nos premiers essais sur les MOP, nous avons observé que le BaP fixé sur les particules ingérées n'était pas assimilé. Ce premier résultat suggère une étude plus approfondie sur le devenir du BaP dans le milieu, ses transformations au cours du passage dans l'organisme. De plus, nous nous sommes limités à seulement deux MOP particulières, sans prendre en compte leur biodégradabilité. Pour avoir une vision globale de la biodisponibilité des HAP dans le milieu, il sera nécessaire de s'intéresser à la MOP de façon dynamique en incluant sa biodégradation microbienne, comme on l'a fait dans ce travail pour les MOD.

- Pour ce travail, nous avons choisi les HAP comme modèles de polluants organiques hydrophobes. Le BaP a particulièrement été étudié. L'extrapolation des résultats obtenus aux autres HAP, voire aux POH en général, est une étape indispensable mais délicate. Si l'hydrophobie des contaminants est un paramètre clé pour ce passage, la relation possible entre K_{ow} et les coefficients de partition devra être validée et surtout quantifiée selon les POH étudiés.
- Enfin, le transfert et la confrontation des connaissances acquises en laboratoire au milieu naturel et urbain est indispensable. La validation du modèle par des données de terrain ne pourra se faire que sous réserve d'une amélioration des techniques d'échantillonnage des HAP particulaires, dissous et biodisponibles. La technique SPMD est très prometteuse, mais elle doit être encore largement améliorée et mieux comprise avant qu'elle ne permette d'évaluer la fraction « biodisponible » des HAP in situ. L'utilisation des PRC (Permeability Reference Compounds) injectés dans les SPMD avant leur exposition doit permettre de progresser sur ce point, en améliorant le modèle physique utilisé pour calculer des concentrations disponibles dans le milieu à partir des accumulations mesurées dans les SPMD.

La capacité de la MO à limiter la toxicité et la biodisponibilité des contaminants a été démontrée depuis longtemps aujourd'hui. Ce rôle complexant et protecteur non spécifique n'a cependant que très peu été replacé dans la perspective du fonctionnement de l'écosystème. Notre étude s'inscrit dans une recherche plus vaste visant, d'un point de vue écotoxicologique, à comprendre les paramètres écologiques et environnementaux de l'écosystème qui déterminent la biodisponibilité des contaminants.

Nous nous sommes intéressés ici à l'impact de la dynamique biologique de la matière organique sur la biodisponibilité des contaminants. D'un point de vue environnemental, pour évaluer le risque immédiat et à plus long terme lié à un rejet contaminé, il sera aussi nécessaire d'intégrer l'influence directe de l'activité microbienne sur les polluants (dégradation des POH), et surtout l'impact possible des contaminants sur l'activité écologique du milieu, en particulier sur l'activité microbienne et sur la production primaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agence Française de Normalisation 1998. Qualité de l'eau, détermination de la demande biochimique en oxygène après n jours (DBOn), partie 2: méthode pour les échantillons non dilués. Paris, France, AFNOR.
- Agence Française de Normalisation 2001. Qualité de l'eau, détermination de la Demande Chimique en Oxygène (DCO). Paris, France, AFNOR.
- Agences de l'eau 1999. Système d'évaluation de la qualité de l'eau des cours d'eau. SEQ-eau. Rapport de présentation, grille de seuils par altération avec justification. Grilles de seuil par usage et fonction. Principes généraux, Etude Inter-Agence n°64.
- Aiken, G.R., Mcknight, D.M., Wershaw, R.L., McCarthy, P. 1985. *Humic substances in soil, sediments and water - Geochemistry, isolation and characterization*. John Wiley and Sons, Toronto.
- Akkanen, J., Kukkonen, J.V.K. 2001. Effects of water hardness and dissolved organic material on the bioavailability of selected organic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2303-2308.
- Akkanen, J., Kukkonen, J.V.K. 2003. Biotransformation and bioconcentration of pyrene in *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 64, 53-61.
- Akkanen, J., Kukkonen, J.V.K. 2003. Measuring the bioavailability of two hydrophobic organic compounds in the presence of dissolved organic matter. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 518-524.
- Akkanen, J., Penttinen, S., Haitzer, M., Kukkonen, J.V.K. 2001. Bioavailability of atrazine, pyrene and benzo[a]pyrene in European river waters. *Chemosphere* 45, 453-462.
- Allard, B., Templier, J., Largeau, C. 1998. An improved method for the isolation of artifact-free algaenans from microalgae. *Org Geochem.* 28, 543-548.
- Axelmann, J., Naes, K., Näf, C., Broman, D. 1999. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in semipermeable membrane devices and caged mussels (*Mytilus Adilus* L.) in relation to water column phase distribution. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2454-2461.
- Backhus, D.A., Gschwend, P.M. 1990. Fluorescent polycyclic aromatic hydrocarbons as probes for studying the impact of colloids on pollutant transport in groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 24, 1214-1223.
- Baird, W.M., Hooven, L.A., Mahadevan, B., Luch, A., Seidel, A., Iversen, P. 2002. response of human cells to PAH-induced DNA damage. *Polycyclic Arom. Comp.* 22.
- Barata, C., Markish, S.M., Baird, D.J., Soared, A.M.V.M. 2002. The relative importance of water and food as Cadmium sources to *Daphnia magna* Straus. *Aquat. Toxicol.* 61, 143-154.
- Barber, L.B., Leenheer, J.A., Noyes, T.I., Stiles, E.A. 2001. Nature and transformation of dissolved organic matter in treatment wetlands. *Environ. Sci. Technol.* 35, 4805-4816.
- Bard, S.M. 1999. Global Transport of Anthropogenic Contaminants and the Consequences for the Arctic Marine Ecosystem. *Mar. Poll. Bull.* 38, 356-379.
- Barker, D.J., Stuckey, D.C. 1999. A review of soluble microbial products (SMP) in wastewater treatments systems. *Wat. Res.* 33, 3063-3082.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Narbonne, J.F., Burgeot, T., Michel, X., Bellocq, J. 1999. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) burden of mussels in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. *Mar. Environ. Res.* 47, 415-439.
- Billen, G., Servais, P. 1989. Modélisation des processus de dégradation bactérienne de la matière organique en milieu aquatique. Bianchi, M.e.a. *Micro-organismes dans les écosystèmes océaniques*. Paris, Masson: pp.
- Björk, M. 1995. Bioavailability and uptake of hydrophobic organic contaminants in bivalve filter-feeders. *Ann. Zool. Fennici.* 32, 237-245.
- Bleeker, E.A.J., Pieters, B.J., Wiegman, S., Kraak, M.H.S. 2002. Comparative (photoenhanced toxicity of homocyclic and heterocyclic PACs. *Polycyclic Arom. Comp.* 22, 601-610.
- Bollaert, C. 2004. Use of the SPMD techniques for monitoring PAH in the Seine catchment. CEREVE - DTU, Technical University of Denmark, 76.

- Booij, K., Sleiderink, H.M., Smedes, F. 1998. Calibrating the uptake kinetics of semipermeable membrane devices using exposure standards. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1236-1245.
- Buffle, J. 1990. *Complexation reactions in aquatic systems, an analytical approach*. Ellis Horwood Pub,
- Buffle, J., Perret, D., Newman, M. 1992. The use of filtration and ultrafiltration for size fractionation of aquatic particles, colloids and macromolecules. Buffle, J. et van Leeuwen, H.P. *Environmental Particles*. Boca Raton, Lewis Publishers. 1: pp. 171-230.
- Burdige, D.J., Gardner, K.G. 1998. Molecular weight distribution of dissolved organic carbon in marine sediment pore waters. *Marine Chemistry* 62, 45-64.
- Burnison, B.K. 1994. Solubility enhancement of fenvalerate by isolated DOC lakewater fractions. Senesi, N. et Miano, T.M. *Humic substances in the global health*, Elsevier Science BV: pp. 811-818.
- Campbell, P.G.C. 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms : a critique of the Free Ion Activity Model. Tessier, A. et Turner, D.R. *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*, John Wiley & sons Ltd: pp. 45-102.
- Caron, G., Suffet, L.H. 1989. Binding of nonpolar pollutants to dissolved organic carbon. Environmental fate modelling. Suffet, L.H. et McCarthy, P. *Aquatic Humic Substances : influence on fate and treatment of pollutants*. Washington DC, American Chemical Society: pp. 117-130.
- Chambers, L., Gardinali, P., Chambers, H., Wade, T.L., Jackson, T., Brooks, J.M. 1996. NIST SRM 1945, whale blubber, NIST SRM 1974a, organics in mussel tissue, and NIST SRM 1941a, organics in marine sediment as certified reference materials for polychlorinated dioxins and furans in marine ecosystems. *Chemosphere* 32, 25-30.
- Chefetz, B., Deshumukh, A.P., Hatcher, P.G. 2000. Pyrene sorption by natural organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 34, 2925-2930.
- Chen, J., Gu, B., LeBoeuf, E., Pan, H., Dai, S. 2002. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere* 48, 59-68.
- Chevreuil, M., Thévenot, D., Scribe, P., Blanchard, M., Duclos, Y., Garmouma, M., Gonzales Calderon, A., Irace, S., Teil, M.-J. 1998. Chapitre 10: Micro-polluants organiques : une boîte de Pandore. Meybeck, M., de Marsily, G. et Fustec, E. *La Seine en son bassin: fonctionnement écologique d'un système fluvial anthropisé*. Paris, Elsevier: pp. 483-529.
- Chin, Y.-P., Aiken, G.R., Danielsen, K.M. 1997. Binding of pyrene and commercial humic substances : the role of molecular weight and aromaticity. *Environ. Sci. Technol.* 31, 1630-1635.
- Chiou, C.T. 1985. Partition coefficients of organic compounds in Lipid-water systems and correlations with fish bioconcentration factors. *Environ. Sci. Technol.* 19, 57-62.
- Chiuchiolo, A.L., Dickhut, R.M., Cochran, M.A., Ducklow, H.W. 2004. Persistent Organic Pollutants at the Base of the Antarctic Marine Food Web. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3551-3557.
- Clément, B., Müller, C., Verrhiest, G. 2000. Influence of exposure conditions on the bioavailability of fluoranthene to *Daphnia magna* (Cladocera). *Polycyclic Arom. Comp.* 20, 259-274.
- Coble, P.G. 1996. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry* 51, 326-346.
- Coble, P.G., Green, S.A., Blough, N.V., Gagosian, R.B. 1990. Characterization of dissolved organic matter in the Black Sea by fluorescence spectroscopy. *Nature* 348, 432-435.
- Crunkilton, R., De Vita, W.M. 1997. Determination of aqueous concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in an urban stream. *Chemosphere* 35, 1447-1463.
- De Paolis, F., Kukkonen, J. 1997. Binding of organic pollutants to humic and fulvic acids: Influence of pH and the structure of humic material. *Chemosphere* 34, 1693-1704.
- Derenne, S., Largeau, C., Berkalo, C., Rousseau, B., Wilhelm, C., Hatcher, P.G. 1992. Non-hydrolosable macromolecular constituents from outer walls of *Chlorella fusca* and *Nanochlorum eucaryotum*. *Phytochem.* 1923-1929.
- Dignac, M.-F. 1998. Caractérisation chimique de la matière organique au cours du traitement des eaux usées par boues activées. Océanologie, Météorologie et Environnement. Paris, Université Paris VI, 303.

Références bibliographiques

- Dispan, J. 2003. Biodégradabilité de la matière organique dans le continuum aquatique réseau d'assainissement - station d'épuration - milieu naturel récepteur. *Sciences et Techniques de l'Environnement*. Marne-La-Vallée, Ecole Nationale des Ponts et Chaussées.
- Dispan, J., Mouchel, J.-M., Charpentier, I., Servais, P. Submitted. Acetated degradation by a non-cultivated primary sludge. I : A methodology to assess model parameters. *Wat. Res.*
- Driscoll, S.K., McElroy, A.E. 1996. Bioaccumulation and metabolism of benzo[a]pyrene in three species of polychaete worms. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1401-1410.
- Erickson, R.J., Bills, T.D., Clark, J.R., Hansen, D.J., Knezovich, J., Mayer, F.L., McElroy, A.E. 1994. Synopsis of discussion session on physicochemical factors affecting toxicity. Bioavailability: Physical, Chemical and Biological Interactions. Hamelink, J.L., Landrum, P.F., Bergman, H.L. et Benson, W.H. *Bioavailability: Physical, Chemical and Biological Interactions*. CRC Press: pp. 93-108.
- Fan, G.T., Burnison, B.K., Solomon, K.R. 1997. The partitioning of fenvalerate to natural dissolved organic matter. *Wat. Res.* 31, 2429-2434.
- Faure, C., Papegay, Y. 1998. Odysee User's guide. Version 1.7., INRIA.
- Fernandes, M.B., Sicre, M.A., Boireau, A., Tronczynski, J. 1997. Polyromatic Hydrocarbon (PAH) distributions in the Seine River and its estuary. *Mar. Poll. Bull.* 34, 857-867.
- Freidig, A.P., Garicano, E., Busser, F.J.M. 1998. Estimating impact of humic acid on bioavailability and bioaccumulation of hydrophobic chemicals in guppies using kinetic solid-phase extraction. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 998-1004.
- Gale, R.W. 1998. Three-compartment model for contaminant accumulation by semipermeable membrane devices. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2292-2300.
- Gale, R.W., Huckins, J., Petty, J.D., Peterman, P.H., Williams, L.L., Morse, D., Schwartz, T.R., Tillitt, D.E. 1997. Comparison of the uptake of dioxin-like compounds by caged channel catfish and semipermeable membrane devices in the Saginaw River, Michigan. *Environ. Sci. Technol.* 31, 178-187.
- Garnier, J., Billen, G., Hanset, P., Testard, P., Coste, M. 1998. Chapitre 13: Développement algal et eutrophisation dans le réseau hydrographique de la Seine. Meybeck, M., de Marsily, G. et Fustec, E. *La Seine en son bassin: fonctionnement écologique d'un système fluvial anthropisé* Paris, Elsevier: pp. 483-529.
- Garric, J., Miège, C., Mouchel, J.-M., Gourlay, C., Tusseau-Vuillemin, M.-H. 2004. Mise en œuvre de la technique des membranes semi-perméables pour la caractérisation des teneurs en polluants organiques hydrophobes. *Rapport d'activité du PIREN-Seine 2004*. Paris, Disponible sur <http://www.sisyph.jussieu.fr/internet/piren/index.html>:
- Gauthier, T.D., Seitz, W.R., Grant, C.L. 1987. Effects of structural and compositional Variations of dissolved humic materials on pyrene Koc values. *Environ. Sci. Technol.* 21, 243-248.
- Gauthier, T.D., Shane, E.C., Guerin, W.F., Seltz, W.R., Grant, C.L. 1986. Florescence quenching method for determining equilibrium constants for polycyclic aromatic hydrocarbons binding to dissolved organic materials. *Environ. Sci. Technol.* 20, 1162-1166.
- Geyer, H.J., Politzki, G., Freitag, D. 1984. Prediction of ecotoxicological behaviour of chemicals: relationship between n-octanol/water partition coefficient and bioaccumulation of organic chemicals by algae *Chlorella*. *Chemosphere* 13, 269-284.
- Geyer, H.J., Scheunert, I., Brüggemann, R., Steinberg, C., Korte, F., Kettrup, A. 1991. QSAR for organic chemical bioconcentration in *Daphnia*, algae and mussels. *Sci. Tot. Environ.* 109/110, 387-394.
- Gonzalez Sagrario, M.d.I.A., Miglioranza, K.S.B., Aizpun de Moreno, J.E., Moreno, V.J., Escalante, A.H. 2002. Polychlorinated biphenyls in different trophic levels from a shallow lake in Argentina. *Chemosphere* 48, 1113-1122.
- Granier, L.K., Lafrance, P., Campbell, P.G.C. 1999. An experimental design to probe the interactions of dissolved organic matter and xenobiotics: bioavailability of pyrene and 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl to *Daphnia magna*. *Chemosphere* 38, 335-350.
- Granmo, A., Ekelund, R., Berggren, M., Brorström-Lunden, E., Bergqvist, P.A. 2000. Temporal trend of organochlorine marine pollution indicated by concentrations in caged mussels, semipermeable membrane devices and sediment. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3323-3329.
- Grasso, D., Chin, Y.P., Weber Jr, W.J. 1990. Structural and behavioural characteristics of a commercial humic acid and natural dissolved organic matter. *Chemosphere* 21, 1181-1197.

- Gujer, W., Henze, M., Mino, T., Van Loosdrecht, M.C.M. 1999. Activated sludge model No.3. *Wat. Sci. Technol.* 39, 138-194.
- Gunnarsson, J.S., Granberg, M.E., Nilsson, H.C., Rosenberg, R., Hellman, B. 1999. Influence of sediment-organic matter quality on growth and polychlorobiphenyl bioavailability in echinodermata (*Amphiura filiformis*). *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1534-1543.
- Gunnarsson, J.S., Rosenberg, R. 1996. Eutrophication increases the association of PCB to dissolved organic matter in marine microcosms. *Mar. Poll. Bull.* 33, 100-111.
- Guo, L., Lenher, J.K., White, D.M., Garland, D.S. 2003. Heterogeneity of natural organic matter from the Chena River, Alaska. *Wat. Res.* 37, 1015-1022.
- Haitzer, M., Abbt-Braun, G., Traunspurger, W., Steinberg, C.E.W. 1999. Effects of humic substances on the bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons: correlations with spectroscopic and chemical properties of humic substances. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2782-2788.
- Haitzer, M., Akkanen, J., Steinberg, C., Kukkonen, J.V.K. 2001. No enhancement in bioconcentration of organic contaminants by low levels of DOM. *Chemosphere* 44, 165-171.
- Haitzer, M., Burnison, B.K., Hoss, S., Traunspurger, W., Steinberg, C.E.W. 1999. Effects of quantity, quality, and contact time of dissolved organic matter on bioconcentration of benzo[a]pyrene in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 459-465.
- Haitzer, M., Hoss, S., Traunspurger, W., Steinberg, C. 1998. Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms - a review -. *Chemosphere* 37, 1335-1362.
- Haitzer, M., Hoss, S., Traunspurger, W., Steinberg, C. 1999. Relationship between concentration of dissolved organic matter (DOM) and the effect of DOM on the bioconcentration of benzo[a]pyrene. *Aquat. Toxicol.* 45, 147-158.
- Halsall, C.J., Bailey, R., Stern, G.A., Barrie, L.A., Fellin, P., Muir, D.C.G., Rosenberg, B., Rovinsky, F.Y., Kononov, E.Y., Pastukhov, B. 1998. Multi-year observations of organohalogen pesticides in the Arctic atmosphere. *Environ. Poll.* 102, 51-62.
- Hamelink, J.L., Landrum, P.F., Bergman, H.L., Benson, W.H. 1994. *Bioavailability: Physical, Chemical and Biological Interactions*. CRC Press,
- Hedges, J.I., Eglinton, G., Hatcher, P.G., Kirchman, D.L., Arnosti, C., Derenne, S., Evershed, R.P., Kogel-Knabner, I., de Leeuw, J.W., Littke, R. 2000. The molecularly-uncharacterized component of nonliving organic matter in natural environments. *Org. Geochem.* 31, 945-958.
- Hellou, J., Mackay, D., Banoub, J. 1999. Levels, persistence and bioavailability of organic contaminants present in marine harbor sediments impacted by raw sewage. *Chemosphere* 38, 457-473.
- Henze, M. 1992. Characterization of wastewater for modelling of activated sludge processes. *Wat. Sci. Technol.* 25, 1-15.
- Henze, M., Grady, C.P.L.J., Gujer, W., Marais, G.V.R., Matsuo, T. 1987. A general model for single-sludge wastewater treatment systems. *Wat. Res.* 21, 505-515.
- Henze, M., Gujer, W., Mino, T., Wentzel, M.C., Marais, G.v.R. 1995. Activated Sludge Model N°2. (IAWPRC Scientific and Technical Report N°3). London, IAWQ.
- Hopkinson, C.S., Buffam, I., Hobbie, J., Vallino, J., Perdue, M., Eversmeyer, B., Prahl, F., Covert, J., Hodson, R., Moran, M.A., Smith, E., Baross, J., Crump, B., Findlay, S., Foreman, K. 1998. Terrestrial inputs of organic matter to coastal ecosystems : an intercomparison of chemical characteristics and bioavailability. *Biogeochem.* 43, 211-234.
- Huckins, J., Petty, J.D., Prest, H.F., Orazio, C.E., Clark, R.C. 1999. Guide for the use of semipermeable membrane devices (SPMDs) as samplers of waterborne hydrophobic organic contaminants. Washington C.D., American Petroleum Institute (API).
- Huckins, J.N., Manuweera, G.K., Petty, J.D., Mackay, D., Lebo, J.A. 1993. Lipid-containing semipermeable membrane devices for monitoring organic contaminants in water. *Environ. Sci. Technol.* 27, 2489-2496.
- Huckins, J.N., Petty, J.D., Orazio, C.E., Lebo, J.A., Clark, R.C., Gibson, V.L., Gala, W.R., Echols, K.R. 1999. Determination of uptake kinetics (sampling rates) by lipid-containing semipermeable membrane devices (SPMDs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water. *Environ. Sci. Technol.* 33, 3918-3923.

Références bibliographiques

- Huckins, J.N., Tbergen, M.W., Manuweera, G.K. 1990. Semipermeable membrane devices containing model lipid: a new approach to monitoring the bioavailability of lipophilic contaminants and estimating their bioconcentration potential. *Chemosphere* 20, 533-552.
- Imai, A., Fukushima, T., Matsushige, K., Kim, Y.-H. 2001. Fractionation and characterization of dissolved organic matter in a shallow eutrophic lake, its inflowing rivers and other organic matter sources. *Wat. Res.* 35, 4019-4028.
- Imai, A., Fukushima, T., Matsushige, K., Kim, Y.-H., Choi, K. 2002. Characterization of dissolved organic matter in effluents from wastewater treatment plants. *Wat. Res.* 36, 859-870.
- Jones, K.C., de Voogt, P. 1999. Persistent organic pollutants (POPs) : state of science. *Environ. Poll.* 100, 209-221.
- Kalbitz, K., Schmerwitz, J., Schwesig, D., Matzner, E. 2003. Biodegradation of soil-derived dissolved organic matter as related to its properties. *Geoderma* 113, 273-291.
- Koelmans, A.A., Jimenez, C.S., Lijklema, L. 1993. Sorption of chlorobenzenes to mineralizing phytoplankton. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 1425-1439.
- Koelmans, A.A., Van der Heijde, A., Knijff, L.M., Alderink, R.H. 2001. Integrated Modelling of Eutrophication and Organic Contaminant Fate & Effects in Aquatic Ecosystems. A Review. *Wat. Res.* 35, 3517-3536.
- Kolok, A.S., Huckins, J.N., Petty, J.D., Oris, J.T. 1996. The role of water ventilation and sediment ingestion in the uptake of benzo[a]pyrene in gizzard shad (*Dorosoma cepedianum*). *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1752-1759.
- Kopinke, F.D., Pörschmann, J., Stottmeister, U. 1995. Sorption of organic pollutants on anthropogenic humic matter. *Environ. Sci. Technol.* 29, 941-950.
- Krahn, M.M., Collier, T.K., Malins, D.C. 1982. Aromatic hydrocarbon metabolites in fish: automated extraction and high-performance liquid chromatographic separation into conjugate and non-conjugate fractions. *J. Chromatogr. A* 236, 429-440.
- Krahn, M.M., Myers, M.S., Burrows, D.G., Malins, D.C. 1984. Determination of metabolites of xenobiotics in the bile of fish from polluted waterways. *Xenobiotica* 14, 633-646.
- Krop, H.B., Van Noort, P.C.M., Govers, H.A.J. 2001. Determination and theoretical aspects of the equilibrium between dissolved organic matter and hydrophobic organic micropollutants in water (Kdoc). *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 169, 1-122.
- Kukkonen, J., McCarthy, J.F., Aimo, O. 1990. Effects of XAD-8 fractions of dissolved organic carbon on the sorption and bioavailability of organic micropollutants. *Arch. Environ. Cont. Toxicol.* 19, 551-557.
- Kukkonen, J., Oikari, A. 1991. Bioavailability of organic pollutants in boreal waters with varying levels of dissolved organic material. *Wat. Res.* 25, 455-463.
- Kukkonen, J., Pellinen, J. 1994. Binding of organic xenobiotics to dissolved organic macromolecules: comparison of analytical methods. *Sci. Tot. Environ.* 152, 19-29.
- Kukkonen, J.V.K., Landrum, P.F. 1998. Effect of particle-xenobiotic contact time on bioavailability of sediment-associated benzo(a)pyrene to benthic amphipod, *Diporeia* spp. *Aquat. Toxicol.* 42, 229-242.
- Kurtz, D.A. 1990. *Long range transport of pesticides*. Lewis Publishers, Chelsea, Michigan.
- Lagarde, F. 2003. Optimisation du traitement de l'azote et du carbone par boues activées en temps de pluie à basse température. *Sciences et Techniques de l'Environnement*, Université Paris XII - Val de Marne.
- Lagarde, F., Tusseau-Vuillemin, M.-H., Lessard, P., Héduit, A., Dutrop, F., Mouchel, J.-M. soumis. Variability estimation of urban wastewater biodegradable fractions by respirometry. *Wat. Res.*
- Landrum, P.F., Nihart, S.R., Eadie, B.J., W.S., G. 1984. Reverse-phase separation method for determining pollutant binding to Aldrich Humic Acids and dissolved organic carbon of natural waters. *Environ. Sci. Technol.* 18, 187-192.
- Landrum, P.F., Reinhold, M.D., Nihart, S.R., Eadie, B.J. 1985. Predicting the bioavailability of organic xenobiotics to *Pontoporeia hoyi* in the presence of humic and fulvic materials and natural dissolved organic matter. *Environ. Toxicol. Chem.* 4, 459-467.
- Laor, Y., Rebhun, M. 1997. Complexation-Fluoccculation : a new method to determine binding coefficients of organic contaminants to dissolved humic substances. *Environ. Sci. Technol.* 31, 3558-3564.
- Laor, Y., Rebhun, M. 2002. Evidence of nonlinear binding of PAHs to dissolved humic acids. *Environ. Sci. Technol.* 36, 955-961.

- Lee, C.K., Cho, S.H., Kang, J.W., Lee, S.J., Ju, Y.S., Sung, J., Strickland, P.T., Kang, D. 1999. Comparison of three analytical methods for 1-hydroxypyrene glucuronide in urine after non-occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicological Letters* 108, 209-215.
- Lee, C.L., Kuo, L.J. 1999. Quantification of the dissolved organic matter effect on the sorption of hydrophobic organic pollutant: application of an overall mechanistic sorption model. *Chemosphere* 38, 807-821.
- Leenheer, J.A. 1981. Comprehensive approach to preparative isolation and fractionation of dissolved organic carbon from natural waters and wastewaters. *Environ. Sci. Technol.* 15, 578-587.
- Leenheer, J.A., Croué, J.P. 2003. Characterizing aquatic dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 37.
- Leenheer, J.A., Croué, J.-P., Benjamin, M., Korshin, G.V., Hwang, C.J., Bruchet, A., Aiken, G.R. 2000. Comprehensive Isolation of Natural Organic Matter from Water for Spectral Characterizations and Reactivity Testing. Barret, S.E., Krasner, S.W. et Amy, G.L. *Natural Organic Matter and Disinfection By-Products: Characterization and Control in Drinking water.*, American Chemical Society. ACS Symposium Series 761: pp. 68-83.
- Leppanen, M.T., Kukkonen, J.V.K. 2000. Effect of sediment-chemical contact time on availability of sediment-associated pyrene and benzo[a]pyrene to oligochaete worms and semi-permeable membrane devices. *Aquat. Toxicol.* 49, 227-241.
- Leppanen, M.T., Kukkonen, J.V.K. 2000. Fate of sediment-associated pyrene and benzo[a]pyrene in the freshwater oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Aquat. Toxicol.* 49, 199-212.
- Loizeau, V., Abarnou, A., Cugier, P., Jaouen-Madoulet, A., Le Guellec, A.-M., Menesguen, A. 2001. A Model of PCB Bioaccumulation in the Sea Bass Food Web from the Seine Estuary (Eastern English Channel). *Mar. Poll. Bull.* 43, 242-255.
- Loonen, H., Muir, D.C.G., Parson, J.R., Govers, H.A.J. 1997. Bioaccumulation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins in sediment by oligochaetes: influence of exposure pathway and contact time. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1518-1525.
- Lotufo, G.R. 1998. Bioaccumulation and sediment-associated fluoranthene in benthic copepods: uptake, elimination and biotransformation. *Aquat. Toxicol.* 44, 1-15.
- Lu, Y., Wang, Z., Huckins, J. 2002. Review of the background and application of triolein-containing semipermeable membrane devices in aquatic environmental study. *Aquat. Toxicol.* 60, 139-153.
- Luch, A., Greim, H., Buturs, J.T.M., Mahadevan, B., Baird, W.M., Doehmer, J., Seidel, A., Glatt, H. 2002. The role of cytochrome P450 1B1 in dibenzo[a,l]pyrene-induced carcinogenesis. *Polycyclic Arom. Comp.* 22.
- Luellen, D.R., Shea, D. 2002. Calibration and field verification of semipermeable membrane devices for measuring polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1791-1797.
- Ma, H., Allen, H.E., Yin, Y. 2001. Characterization of isolated fractions of dissolved organic matter from natural waters and a wastewater effluent. *Wat. Res.* 35, 985-996.
- Mackay, D. 1994. Fate models. Calow, P. *Handbook of Ecotoxicology*. 11: pp. 348-367.
- Malcom, R.L., MacCarthy, P. 1986. Limitations in the use of commercial humic acids in water and soil research. *Environ. Sci. Technol.* 20, 904-911.
- Mao, J.-D., HUNDAL, S., Thompson, M.-L., Schmidt-Rohr, K. 2002. Correlation of poly(methylene)-rich amorphous aliphatic domains in humic substances with sorption of a nonpolar organic contaminant, phenanthrene. *Environ. Sci. Technol.* 36, 929-936.
- Marhaba, T.F., Van, D., Lippincott, R.L. 2000. Rapid identification of dissolved organic matter fractions in water by spectral fluorescent signatures. *Wat. Res.* 34, 3543-3550.
- Martin-Mousset, B., Croué, J.-P., Lefebvre, E., Legube, B. 1997. Distribution et caractérisation de la matière organique dissoute d'eaux naturelles de surface. *Wat. Res.* 31, 541-553.
- McCarthy, J.F. 1983. Role of particulate organic matter in decreasing accumulation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Daphnia magna*. *Arch. Environ. Cont. Toxicol.* 12, 559-568.
- McCarthy, J.F., Black, M.C. 1988. Partitioning between dissolved organic macromolecules and suspended particles; Effects on bioavailability and transport of hydrophobic organic chemicals in aquatic systems. Adams, W.J., Chapman, G.A. et Landis, W.G. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*. Philadelphia, American Society of Testing and Materials. 10: pp. 233-246.

Références bibliographiques

- McCarthy, J.F., Roberson, L.E., Burrus, L.W. 1989. Association of benzo(a)pyrene with dissolved organic matter : prediction of K_{dom} from structural and chemical properties of the organic matter. *Chemosphere* 19, 1911-1920.
- McCarthy, L.F., Jimenez, B.D. 1985. Reduction in bioavailability to bluegills of polycyclic aromatic hydrocarbons bound to dissolved humic material. *Environ. Toxicol. Chem.* 4, 511-521.
- Means, J.C., Wood, S.G., Hassett, J.J., BAnwart, W.L. 1980. Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils. *Environ. Sci. Technol.* 14, 1524-1528.
- Meybeck, M. 1982. Carbon, nitrogen and phosphorus transport by world rivers. *Am. J. Science* 282, 401-450.
- Meybeck, M., de Marsily, G., Fustec, E. 1998. *La Seine en son bassin : Fonctionnement écologique d'un système fluvial anthropisé* Elsevier, Paris.
- Miège, C., Ravelet, C., Croué, J.-P., Garric, J. in press. Evaluation of the Semi-Permeable Membrane Device (SPMD) efficiency to sample only the free dissolved fraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) by K_{doc} measurements. *Anal. Chim. Acta*.
- Miller, J.S. 1999. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by spectrofluorimetry. *Anal. Chim. Acta* 38, 27-44.
- Mouchel, J.-M., Dispan, J. 2003. Simulation de la dégradation des eaux usées. Comparaison d'une approche " épuration " et d'une approche " milieu naturel ". Paris, Etude pour le CIRSEE : " Etablissement d'une méthodologie de typologie des ERU, pluviales et mixtes, en vue de prédire les performances des systèmes de traitements physico-chimiques et biologiques ".
- Munoz, M.J., Ramos, C., Tarazona, J. 1996. Bioaccumulation and toxicity of hexachlorobenzene in *Chlorella vulgaris* and *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 35, 211-220.
- Namour, P., Müller, M.C. 1998. Fractionation of organic matter from wastewater treatment plants before and after a 21-day biodegradability test: a physical-chemical method for measurement of the refractory part of effluents. *Wat. Res.* 32, 2224-2231.
- Neff, J.M. 1979. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment: Sources, Fate and Biological Effects*. Applied Science Publishers LTD, London.
- Newman, M.C. 1995. *Quantitative methods in aquatic ecotoxicology*. CRC Press, Boca Raton.
- Nikkilä, A., Kukkonen, J.V.K. 2001. Effect of dissolved organic material on binding and toxicokinetics of pyrene in the waterflea *Daphnia magna*. *Arch. Environ. Cont. Toxicol.* 40, 333-338.
- Nyman, M., Koistinen, J., Fant, M.L., Vartiainen, T., Helle, E. 2002. Current levels of DDT, PCB and trace elements in the Baltic ringed seals (*Phoca hispida baltica*) and grey seals (*Halichoerus grypus*). *Environ. Poll.* 119, 399-412.
- Oikari, A., J., K. 1990. Bioavailability of benzo(a)pyrene and dehydroabietic acid from a few lake waters containing varying dissolved organic carbon concentrations to *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 54-61.
- Okay, O.S., Donkin, P., Peters, L.D., Livingstone, D.R. 2000. The role of algae (*Isochrysis galbana*) enrichment on the bioaccumulation of benzo[a]pyrene and its effects on the blue mussel *Mytilus edulis*. *Environ. Poll.* 110, 103-113.
- Penry, D. 1998. Applications of efficiency measurements in bioaccumulation studies : definitions, clarifications and a critique of methods. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1633-1639.
- Pernelle, J.J., Gaval, G., Cotteux, E., Duchène, P. 2001. Influence of transient substrate overloads on the proliferation of filamentous bacterial populations in an activated sludge pilot plant. *Wat. Res.* 35, 129-134.
- Petersen, G.I., Kristensen, P. 1998. Bioaccumulation of lipophilic substances in fish early life stages. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1385-1395.
- Petty, J.D., Orazio, C.E., Huckins, J.N., Gale, R.W., Lebo, J.A., Meadows, J.C., Echols, K.R., Cranor, W.L. 2000. Considerations involved with the use of semipermeable membrane devices for monitoring environmental contaminants. *J. Chromatogr. A* 879, 83-95.
- Peuravuori, J. 2001. Binding of pyrene on lake humic matter: the role of structural descriptors. *Anal. Chim. Acta* 429, 75-89.
- Peuravuori, J., Pihlaja, K. 1997. Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Anal. Chim. Acta* 337, 133-149.

- Peven, C.S., Uhler, A.D., Querzoli, F.J. 1996. Caged mussels and semipermeable membrane devices as indicators of organic contaminant uptake in Dorchester and Duxbury bays, Massachusetts. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 144-149.
- Pignatello, J.J., Xing, B. 1995. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environ. Sci. Technol.* 30, 1-11.
- Pörschmann, J., Kopinke, F.D., Pawliszyn, J. 1998. Solid-phase microextraction for determining the binding state of organic pollutants in contaminated water rich in humic organic matter. *J. Chromatogr.* 816, 159-167.
- Quanrud, D.M., Karpiscak, M.M., Lansey, K.E., Arnold, R.G. 2004. Transformation of effluent organic matter during subsurface wetland treatment in the Sonoran Desert. *Chemosphere* 54, 777-788.
- Rand, G.M., Wells, P.G., McCarthy, L.S. 1995. Introduction to aquatic toxicology. Rand, G.M. *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, environmental fate and risk assessment*. USA, Taylor & Francis: pp. 3-67.
- Ravelet, C., Miège, C., Croué, J.-P., Garric, J. En préparation. Influence of dissolved organic matter (DOM) on the PAH bioavailability : Kdoc determination by SPMD and correlations with different descriptors.
- Richardson, B.J., Lam, P.K.S., Zheng, G.J., McClellan, K.E., De Luca-Abott, B.D. 2002. Biofouling confounds the uptake of trace organic contaminants by semi-permeable membrane devices (SPMDs). *Mar. Poll. Bull.* 44, 1372-1379.
- Richardson, B.J., Zheng, G.J., Tse, E.S.C., De Luca-Abott, B.D., Siu, S.Y.M., Lam, P.K.S. 2003. A comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon and petroleum hydrocarbon uptake by mussels (*Perna viridis*) and semi-permeable membrane devices (SPMDs) in Hong Kong coastal waters. *Environ. Poll.* 122, 223-227.
- Rittmann, B.E., Bae, W., Namkung, E., Lu, C.J. 1987. A critical evaluation of microbial product formation in biological processes. *Wat. Sci. Technol.* 19, 517-528.
- Røe Utvik, T.I., Durell, G.S., Johnsen, S. 1999. Determining produced water originating polycyclic aromatic hydrocarbons in North Sea waters : comparison of sampling techniques. *Mar. Poll. Bull.* 38, 977-989.
- Ruddock, P.J., Bird, D.J., McCalley, D.V. 2002. Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in three species of fish from the Severn Estuary. *Ecotox. Environ. Saf.* 51, 97-105.
- Ruddock, P.J., Bird, D.J., McCalley, D.V. 2002. Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in three species of fish from the Severn Estuary. *Ecotox. Environ. Saf.* 51, 97-105.
- Sabaliūnas, D., Lazutka, J., Sabaliūniene, I., Södergren, A. 1998. Use of semipermeable membrane devices for studying effects of organic pollutants : comparison of pesticide uptake by semipermeable membrane devices and mussels. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1815-1824.
- Safronjeva, K. 2001. Variabilité temporelle des fractions biodégradables des eaux résiduaires urbaines de la ville de Meaux. *Sciences et Techniques de l'Environnement*, Ecole Nationale des Ponts et Chaussées, 58.
- Salloum, M.J., Chefetz, B., Hatcher, P.G. 2002. Phenanthrene sorption by aliphatic-rich natural organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1953-1958.
- Schlautman, M.A., Morgan, J.J. 1993. Effects of aqueous chemistry on the binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by dissolved organic materials. *Environ. Sci. Technol.* 27, 961-969.
- Schramm, K.-W., Behehti, A., Beck, B., Kettrup, A. 1998. Influence of an aquatic humic acid on the bioconcentration of selected compounds in *Daphnia magna*. *Ecotox. Environ. Saf.* 41, 73-76.
- Schrap, S.M., Opperhuizen, A. 1990. Relationship between bioavailability and hydrophobicity: reduction of the uptake of organic chemicals by fish due to the sorption on particles. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 715-724.
- Schwarzenbach, R., Gschwend, P.M., Imboden, D.M. 1993. *Environmental Organic Chemistry*. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Seidl, M., Huang, V., Mouchel, J.-M. 1998. Toxicity of combined sewer overflows on river phytoplankton: the role of heavy metals. *Environ. Poll.* 101, 107-116.
- Seidl, M., Servais, P., Martaud, M., Gandouin, C., Mouchel, J.-M. 1998. Organic carbon biodegradability and heterotrophic bacteria along a combined sewer catchment during rain events. *Wat. Sci. Technol.* 37, 25-33.
- Servais, P., Barillier, A., Garnier, J. 1995. Determination of the biodegradable fraction of dissolved and particulate organic carbon in waters. *Ann. Limnol.* 31, 75-80.
- Servais, P., Billen, G., Garnier, J., Idlafkih, Z., Mouchel, J.-M., Seidl, M., Meybeck, M. 1998. Chapitre 11: Carbone organique: origines et biodégradabilité. Meybeck, M., de Marsily, G. et Fustec, E. *La Seine en son bassin: fonctionnement écologique d'un système fluvial anthropisé* Paris, Elsevier: pp. 483-529.

Références bibliographiques

- Seth, R., Mackay, D., Muncke, J. 1999. Estimating the organic carbon partition coefficient and its variability for hydrophobic chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 33, 2390-2394.
- Sijm, D.T.H.M., Middelkoop, J., Vrisekoop, K. 1995. Algal density dependant bioconcentration factors of hydrophobic chemicals. *Chemosphere* 31, 4001-4012.
- Stange, K., Swackhamer, D.L. 1994. Factors affecting phytoplankton species-specific differences in accumulation of 40 polychlorinated biphenyls (PCBs). *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1849-1860.
- Stuer-Lauridsen, F., Kjølholt, J. 2000. Identification of selected hydrophobic organic contaminants in wastewater with semipermeable membrane devices (SPMDs). *Wat. Res.* 34, 3478-3482.
- Suffet, L.H., Jafvert, C.T., Kukkonen, J.V.K., Servos, M.R., Spacie, A., Williams, L.L., Noblet, J.A. 1994. Synopsis of discussion session: influences of particulate and dissolved material on the bioavailability of organic compounds. Hamelink, J.L., Landrum, P.F., Bergman, H.L. et Benson, W.H. *Bioavailability: Physical, Chemical and Biological Interactions*, CRC Press: pp. 93-108.
- Sun, L., Perdue, E.M., Meyer, J.L., Weis, J. 1997. Use of elemental composition to predict bioavailability of dissolved organic matter in the Georgia river. *Limnol. Oceanogr.* 42, 714-721.
- Thurman, E.M. 1984. *Organic geochemistry of natural waters*. Wileys and Sons, New York.
- Traina, S.J., Novak, J., Smeck, N.E. 1990. An ultra-violet absorbance method of estimating the percent aromatic carbon content of humic acids. *J. Environ. Qual.* 19, 151-153.
- Tusseau-Vuillemin, M.-H. 1998. Mode d'établissement des niveaux de rejets d'épuration en cours d'eau., convention F.N.D.A.E. n° 97 02 9 100 U.
- Tusseau-Vuillemin, M.-H., Dispan, J., Mouchel, J.-M., Servais, P. 2003. Biodegradable fraction of organic carbon estimated under oxic and anoxic conditions. *Wat. Res.* 37, 2242-2247.
- Tusseau-Vuillemin, M.-H., Gilbin, R., Taillefert, M. 2003. A Dynamic Numerical Model To Characterize Labile Metal Complexes Collected with Diffusion Gradient in Thin Films Devices. *Environ. Sci. Technol.* 37, 1645-1652.
- Tusseau-Vuillemin, M.-H., Lagarde, F., Chauvière, C., Héduit, A. 2002. Hydrogen peroxide (H₂O₂) as a source of dissolved oxygen in COD-degradation respirometric experiments. *Wat. Res.* 36, 793-798.
- Tusseau-Vuillemin, M.-H., Le Réveillé, G. 2001. Le carbone organique biodégradable dans les eaux traitées des stations d'épuration du bassin de la Seine. *Ingénieries* 25, 3-12.
- Tusseau-Vuillemin, M.-H., Miège, C., Gourlay, C., Gilbin, R., Ravelet, C., Elbaz-Poulichet, F., Seidel, J.-L., Garric, J. 2003. Systèmes d'estimation intégrative de la contamination par les micro-polluants et de leur biodisponibilité. *Rapport d'activité du PIREN-Seine 2002*. Paris, Disponible sur <http://www.sisyphes.jussieu.fr/internet/piren/index.html>: pp.
- Vaillant, S., Pouet, M.-F., Thomas, O. 1999. Methodology for the characterisation of heterogeneous fraction in wastewater. *Talanta* 50, 729-736.
- van Stee, L.L.P., Leonards, P.E.G., van Loon, W.M.G.M., Hendricks, A.J., Maas, J.L., Struijs, J., Brinkman, U.A.T. 2002. Use of semi-permeable membrane devices and solid-phase extraction for the wide range screening of microcontaminants in surface water by GC-AED/MS. *Wat. Res.* 36, 4455-4470.
- Varanasi, U. 1989. *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*. CRC Press, Inc., Boca Raton.
- Verrengia Guerrero, N.R., Taylor, M.G., Wider, E.A., Simkiss, K. 2003. Influence of particle characteristics and organic matter content in the bioavailability and bioaccumulation of pyrene by clams. *Environ. Poll.* 121, 115-122.
- Verweij, F., Booij, K., Satumalay, K., van der Molen, N., van der Oost, R. 2004. Assessment of bioavailable PAH, PCB and OCP concentrations in water, using semipermeable membrane devices (SPMDs), sediments and caged carp. *Chemosphere* 54, 1675-1689.
- Vrana, B., Shüürmann, G. 2002. Calibrating the Uptake Kinetics of Semipermeable Membrane Devices in Water: Impact of Hydrodynamics. *Environ. Sci. Technol.* 36, 290-296.
- Wang, D. 2003. Le suivi de la contamination de la Seine par les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques. *Science et Techniques de l'Environnement*. Marne-La-Vallée, Ecole Nationale des Ponts et Chaussées, 76.
- Wang, W.-X., Fisher, N.S. 1999. Assimilation efficiencies of chemical contaminants in aquatic invertebrates : a synthesis. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2034-2045.

- Wang, Y., Wang, Z., Lui, J., Ma, M., Belzile, N. 1999. Monitoring priority pollutants in the YangHe river by Dichloromethane extraction and semipermeable membrane devices (SPMDs). *Chemosphere* 39, 113-131.
- Wang, Y., Wang, Z., Ma, M., Wang, C., Mo, Z. 2001. Monitoring priority pollutants in a sewage treatment process by dichloromethane extraction and triolein-semipermeable membrane device (SPMD). *Chemosphere* 43, 339-346.
- Weber, K., Goerke, H. 1996. Organochlorine compounds in fish off the Antarctic Peninsula. *Chemosphere* 33, 377-392.
- Weber, W.J., Voice, T.C., Pirbazari, M., Hunt, G.E., Ulanoff, D.M. 1983. Sorption of hydrophobic compounds by sediments, solid and suspended solids - II: sorbent evaluation studies. *Wat. Res.* 10, 1443-1452.
- Wetzel, R.G. 1983. *Limnology*. CBS College Publishing, Philadelphia.
- Wise, S.A. 2002. Standard Reference Materials (SRMs) for the determination of polycyclic aromatic compounds - twenty years of progress. *Polycyclic Arom. Comp.* 22, 197-230.
- Zhao, Y.-H., Lang, P.-Z. 1996. Evaluation of the partitioning of hydrophobic pollutants between aquatic and solid phases in natural systems. *Sci. Tot. Environ.* 177, 1-7.
- Zhou, J.L., Fileman, T.W., Evans, S., Donkin, P., Readman, J.W., Mantoura, R.F.C., Rowland, S. 1999. The partition of fluoranthene and pyrene between suspended particles and dissolved phase in the Hunber Estuary: a study of controlling factors. *Sci. Tot. Environ.* 243/244, 305-321.
- Zhu, C., Byrd, R.H., Lu, P., Nocedal, J. 1997. Algorithm 778: L-BFGS-B: Fortran subroutines for large-scale bound-constrained optimization. *Acm Transactions on Mathematical Software* 23, 550-560.
- Zimmerman, L.R., Thurman, E.M., Bastian, K.C. 2000. Detection of persistent organic pollutants in the Mississippi Delta using semipermeable membrane devices. *Sci. Tot. Environ.* 248, 169-179.
- Zumstein, J., Buffle, J. 1989. Circulation of pedogenic and aquagenic organic matter in an eutrophic lake. *Wat. Res.* 23, 229-239.

ANNEXE

Article 1

Gourlay C, Miège C, Tusseau-Vuillemin MH, Mouchel JM, Garric J. (2002). The use of spectrofluorimetry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons bioaccumulation and biotransformation in *Daphnia magna*. *Polycyclic Aromatic Compounds*. Volume 22, 3-4, pp 501 - 516

Article 2

Gourlay C, Tusseau-Vuillemin MH, Garric J, Mouchel JM. (2003). Effect of non-humic dissolved organic matter from various origins and biodegradabilities on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 22, n°6, pp 1288-1294.

Article 3

Gourlay C, Tusseau-Vuillemin MH, Garric J, Mouchel JM. (2004, in press). The ability of dissolved organic matter (DOM) to influence benzo[a]pyrene bioavailability increases with DOM biodegradation.

A paraître dans *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

Article 4

Gourlay C, Mouchel JM, Tusseau-Vuillemin MH, Garric J. (2004, in press). Role of algal and bacterial particulate organic matter on benzo[a]pyrene bioaccumulation in *Daphnia magna*.

A paraître dans *Science of the Total Environment*

Article 5

C. Miège, C. Gourlay, M.-H. Tusseau-Vuillemin, D. Wang, S. Durand, J. Garric, J.-M. Mouchel (2004, in press) Variability of SPMD (Semi-Permeable Membrane Device)-availability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in river waters and wastewater treatment plant effluents. *Polycyclic Aromatic Compounds*.

ARTICLE 1

The use of spectrofluorimetry for monitoring the bioaccumulation and the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Daphnia magna*

(*Polycyclic Aromatic Compounds*, 2002, Vol 22, pp 501-516)

Catherine GOURLAY^{1,2}, Cécile MIEGE³, Marie-Hélène TUSSEAU-VUILLEMIN⁴, Jeanne GARRIC³, Jean-Marie MOUCHEL²

¹ENGREF, 19, avenue du Maine, 75732 Paris cedex 15, France ; ²CEREVE, ENPC, 77455 Marne La Vallée cedex 02 France; ³Cemagref, 3b quai Chauveau, CP 220, 69336 Lyon cedex 9, France; ⁴Cemagref, Parc de Tourvoie, BP 44, 92163 Antony cedex, France.

Abstract

A rapid and direct spectrofluorimetric method was tested in order to monitor the bioaccumulation of PAH in *Daphnia magna* in a control media. After exposure to water containing benzo[a]pyrene or fluoranthene, daphnids were put in solvent, sonicated and filtered. The fluorescence spectrum observed in the filtrate was recorded. Results were compared to HPLC measurements of the same pools of organisms. In fluoranthene experiments, the fluorescence peak of the daphnid extract spectrum was linearly related to the PAH content as measured with HPLC. In benzo[a]pyrene experiments, other fluorescent compounds progressively appeared in the sample. They were assumed to be metabolites. A linear regression involving fluorescence intensities at two different wavelengths was necessary for a satisfactory correlation with HPLC measurements. A water extraction was performed to isolate metabolites. No or very few fluoranthene metabolites were isolated in the aqueous phase, whereas increasing benzo[a]pyrene metabolites were observed while the exposure time increased.

Keywords

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; bioaccumulation; spectrofluorimetry; metabolism; *Daphnia magna*, benzo[a]pyrene

INTRODUCTION

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous carcinogenic and mutagenic trace contaminants. They are primarily formed by manufacturing and fuel combustion and conversion [1]. In urban areas, they are a major cause of contamination in water. Composed of two or more benzene rings, PAHs are hydrophobic organic compounds and have a great potential for sorption to organic

materials, sediments, and lipidic substances [1]. They can be bioaccumulated in aquatic organisms and induce toxic responses. Monitoring the bioavailability of PAHs is commonly done through bioaccumulation measurements. This means chemical measurements of PAH contents in organisms. Chromatographic techniques are the most widely used methods; they are sensitive and have been well tried in many studies. Measurements are mostly performed by high-pressure liquid chromatography (HPLC) with fluorescence and diode array detectors, or gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). Applied to a biological matrix, the treatment of the sample becomes more complex, including extraction and purification in order to remove lipidic substances that may cause interference. Although they have been greatly improved in the past years, as reviewed in [2] and in [3], these techniques remain time and solvent consuming and require large amounts of biological samples. When bioaccumulation is studied in control media, the use of radio-labeled compounds (^{14}C [4,5] or ^3H [6,7]) allows the avoidance of such pretreatment. It is also very convenient and fast, and it requires a small amount of biological material. However, this technique is unable to distinguish between parent compounds and metabolites in organisms. Moreover, it requires specific equipment. This study aims at investigating the use of spectrofluorimetry for measuring the bioaccumulation of PAHs in a control media without requiring separation nor purification processes. Spectrofluorimetry is already used to analyze PAHs and their metabolites in animals' bile and urine [8-10], in extracts of whole animals [11-13] as well as in purified extracts of water, sediments or smoke [14-16]. In this study, we focus on the ability to measure PAH fluorescence in a solvent that may contain many other components derived from bioaccumulation experiments, especially lipids or PAH metabolites. Results obtained with the fluorescence technique are compared to the analysis of samples using HPLC measurement after Soxhlet extraction and purification. The bioaccumulation of two PAHs, fluoranthene and benzo[a]pyrene in *Daphnia magna* was studied with this method.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals, solvents, and media

Stock solutions of fluoranthene and benzo[a]pyrene (BaP) in methanol were purchased (1 mg/L and 100 mg/L respectively, 99% pure, Promochem, France). The solvent used for fluorescence analysis was a mixture of dichloromethane and methanol (4:1), here after referred to as "solvent F". Each of them was of high quality for fluorescence analysis (SPECTRONORM, Prolabo, France). Heptane, toluene, N-N dimethylformamide and acetonitrile used for HPLC analysis were HPLC quality (Pestipur, SDS, France). All solvents and chemicals were used without any further purification. Solutions of PAHs in solvent F were prepared by dilution of the stock solution. Mineral water (Evian, France) was used as exposure media and daphnids culture media. Water was spiked with one PAH by dilution of the stock solution just before exposure.

Sample preparation

Bioaccumulation of PAH was performed with *Daphnia magna*. Daphnids were obtained from a culture maintained in the laboratory under controlled temperature and lighting conditions. Specimens used in

the experiment were approximately 7 days old, adults, and did not have eggs in their brood chamber. They were starved one day before the experiment, and were placed in fresh water for at least one hour before exposure in order to clean their gut.

Aqueous concentrations of PAHs ranged between 1 and 100 µg/L for fluoranthene and 50 ng/L and 1 µg/L for benzo[*a*]pyrene, below PAH aqueous solubility. The exposure time ranged from 1 to 30 hours.

Organisms were exposed to the PAH-contaminated media in the dark at room temperature (18° to 22°C) in 0.5 to 1L beakers. The maximum density of daphnids was 250 organisms /L. Density was constant within each series of experiments. At the end of exposure, daphnids were removed and gently rinsed with Milli-Q water on a GF/F Whatmann filter. Fifteen daphnids were used for the spectrofluorimetric measurement and 50 to 200 organisms for the HPLC measurement. Parallel control experiments in uncontaminated water were also conducted; in this case samples were referred to as “daphnid blanks”.

In order to limit variability due to biological differences among daphnids, comparisons were made only if results had been obtained from daphnids collected the same day and bred in the same media.

Experimental set-up

For each PAH, two types of bioaccumulation experiments followed by fluorescence measurements were conducted: (i) bioaccumulation experiments in several PAH concentrations after a 4-hour exposure and (ii) bioaccumulation experiments in the same media with different exposure times. HPLC analyses were conducted along with fluorescence measurements on one blank, 17 samples of daphnids contaminated with BaP, and 15 samples of daphnids contaminated with fluoranthene. In all these experiments, daphnids were exposed for 1 to 30 hours.

Preparation for spectrofluorimetric measurements (see Figure 1)

After rinsing, fifteen organisms were put in a glass tube with 4 ml of solvent F. The sample was sonicated for 1 minute using a sonicating horn (Vibracell™, Bioblock Scientific, France). The tube was then stored in the dark at 4°C until analysis, which was performed at room temperature. The sample was filtered on a 0.45-µm GF-F Whatmann glass fiber filter. It was either directly put in a 1-cm quartz cuvette for fluorescence analysis (“total extract”) or submitted to a solvent/water extraction. For this latter extraction 2 ml of F solvent and 3 ml of milli-Q water were added to the filtrate. The tube was hand-shaken for 10 seconds and the phases were allowed to separate. Then, fluorescence signals of both phases were measured separately.

In order to analyze the influence of the biological matrix on the BaP fluorescence, 15 uncontaminated animals, 4 ml of solvent F and 10 µl of BaP stock solution were put in a glass tube and sonicated. The sample was then filtered and the emission fluorescence spectrum was recorded.

Preparation for HPLC measurements

Remaining organisms were put on a GF-F filter, rinsed and dried with the filter at 60°C for 24 hours. The weight of the sample and the number of organisms were determined. Daphnids on the filter were Soxhlet extracted with 60 ml of heptane for 8 hours. The sample was concentrated to 1 ml, purified on a SiOH cartridge (CHROMABOND™, Macherey-Nagel, Hoerd, France) and eluted with a mixture of toluene and heptane (2:1). After evaporation of heptane and toluene under a gentle nitrogen stream, the sample was diluted in acetonitrile. The final volume was 1 ml to 10 ml, depending on the expected PAH concentration in the sample.

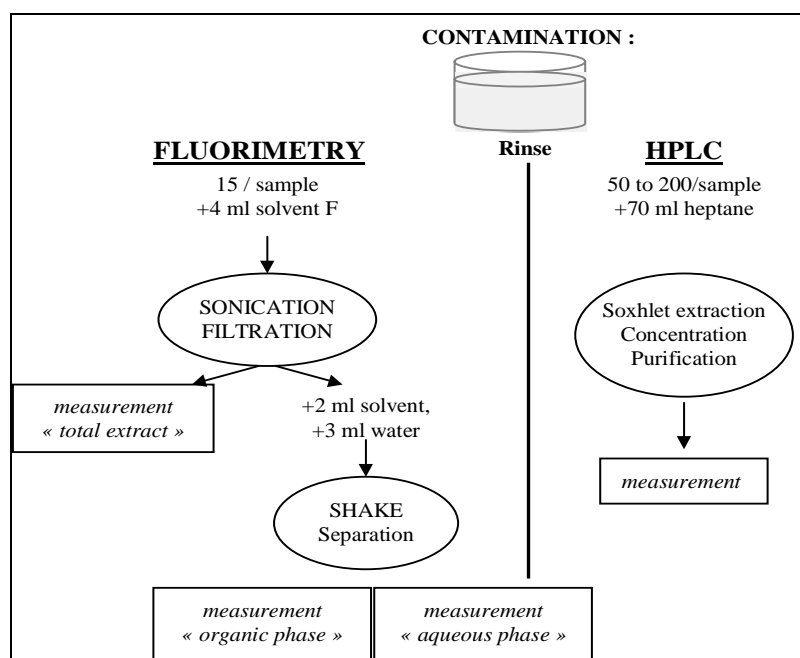


FIGURE 1 : Spectrofluorimetric and HPLC analytical protocols

Spectrofluorimetric measurements

We used a UV-visible Jasco FP-750 spectrofluorimeter, with a 150W Xenon lamp. Excitation and emission band widths were fixed at 5 nm. The recording speed was 250 nm/min. Photo amplifiers were set at MEDIUM or HIGH position, depending on the amplitude of the fluorescence signal of the sample. Optimal excitation wavelengths in the specific experimental conditions were determined according to [17]. Emission spectra were recorded with excitation wavelengths set at 287 nm and 265 nm respectively for fluoranthene and benzo[a]pyrene. Emission spectra were recorded between 350 and 500 nm. Fluorescence measurements were all performed at room temperature.

HPLC measurements

The HPLC system consisted of a Kontron 465 autosampler and a Kontron 422 S pump coupled with a Kontron/Jasco FP 920 fluorimetric detector (Kontron, St Quentin en Yvelines, France). A

250 x 3 mm (Nucleosil100-5 C18 PAH) column including guard column was used (Macherey Nagel, Hoerd, France) with an Igloo-cil oven (Interchim, Montluçon, France) for setting up the column temperature.

Acetonitrile and water were used as eluent solvents at a flow rate of 1 mL/min. The 25 min long gradient elution program was as follows : 60 % acetonitrile and 40 % water for 3 min; then a linear gradient elution at 6,6 %/min from 60 % to 80 % acetonitrile; followed by an other linear gradient elution at 1,5 %/min from 80 % to 100 % acetonitrile and finally an isocratic elution with 100 % acetonitrile for 5 min. The column temperature was maintained at 35 °C. The excitation and emission wavelengths were set at 285 nm and 460 nm respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Fluorescence spectra of PAHs in daphnid total extracts

The fluorescence response in daphnid total extract evolves positively with PAH concentration in water and with exposure time (see Figure 2 and Figure 3).

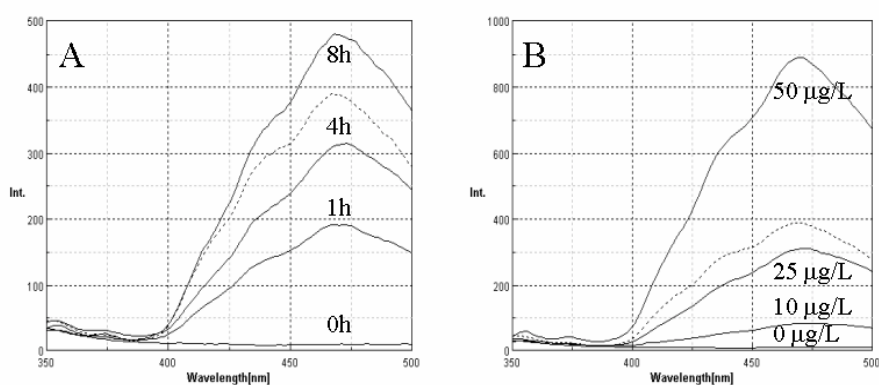


FIGURE 2 : Spectra of daphnid extracts after fluoranthene exposure. A: Bioaccumulation in a 25 µg/L fluoranthene solution for 0 to 8 hours. B: 4-hour exposure in varying fluoranthene concentrations. Dashed line : 50 µg/L fluoranthene in pure solvent.

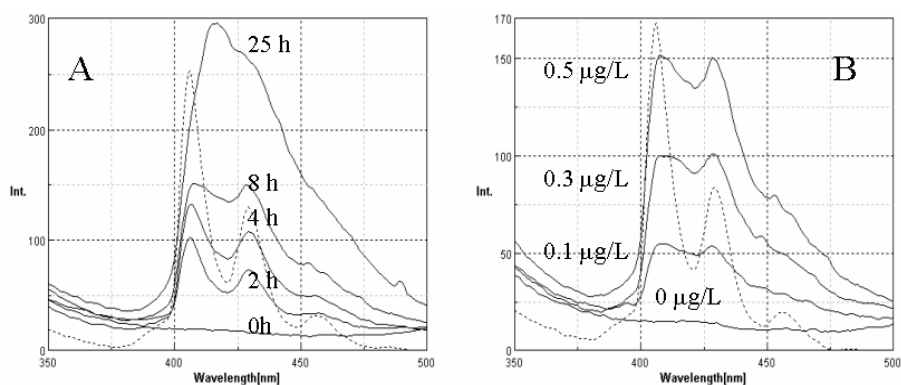


FIGURE 3: Spectra of daphnid extract after BaP exposure. A: Bioaccumulation in a 0.5 µg/L BaP solution for 0 to 25 hours (dashed line: 3µg/L BaP in pure solvent). B: 8-hour exposure in different concentrations (dashed line : 2µg/L BaP in pure solvent).

Filtrates of daphnid total extracts are slightly yellow because lots of lipids contained in daphnids were dissolved in solvent and were not removed by filtration. Daphnid blank extracts do not present specific fluorescence peaks at recorded wavelengths, but their spectra exhibit a non-zero baseline. However, the baseline problem cannot be solved by simply subtracting the mean blank fluorescence because of the variability in the height of the baseline in daphnid blanks. Thus the minimum intensity of the signal before the peak was subtracted from peak intensities in each PAH spectrum in order to remove the fluorescence due to daphnid constituents from PAH signals.

The relative standard deviation (RSD) in fluorescence responses of repetitive samples of contaminated daphnids is less than 15% in all experiments. This deviation includes the biological and physiological variability between different pools of 15 daphnids and the variability derived from sample treatments and from spectrofluorimetric analysis. This value is consistent with other bioaccumulation experiment results. As an example described in [6], measurements of bioaccumulation of BaP in *Daphnia magna* using radio-labeled compounds produced results with a RSD ranging from 8% to 33%.

Metabolism of PAHs

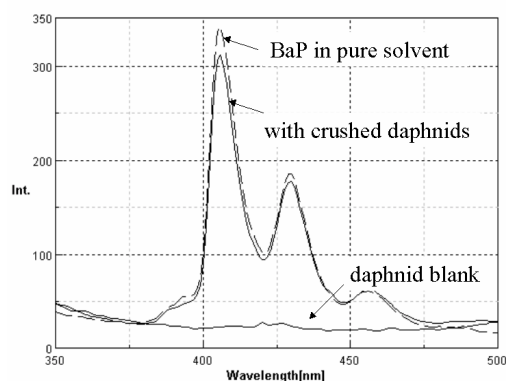


FIGURE 4 : spectrum of daphnid blank, spectrum of BaP in pure solvent and spectrum of extracts of crushed daphnids in spiked solvent.

The shape of the spectrum of bioaccumulated fluoranthene in daphnid total extract is the same as the shape of fluoranthene in solvent only (see Figure 2), whatever the exposure time or the concentration in the water. Only the amplitude varies. On the contrary, the shape of benzo[*a*]pyrene spectrum in daphnid extracts evolves with exposure time and differs from the one in solvent only. After a short-term exposure, the spectrum has two distinct peaks with maximums at 407 and 429 nm similar to the ones of the spectrum of BaP in pure solvent. Then it evolves to a spectrum with a wider and unique peak, with maximum wavelength at 417 nm (see Figure 3).

Uncontaminated crushed daphnids were put in solvent spiked with BaP and sonicated. Figure 4 shows the fluorescence spectrum of this extract. It is similar to the one of BaP in pure solvent. Therefore we infer that shifts appear only with alive daphnids, they are induced by a biological process.

Shifts in the spectra of bioaccumulated PAH are due to interfering compounds that appear while the exposure time increases. A water extraction was performed in order to separate some of these interfering compounds from PAHs. After the water extraction, hydrophilic compounds should be removed from the organic phase. This method is inspired from [5] who performed a water/hexane extraction to separate radio-labeled BaP and its metabolites in daphnids before measuring the radioactivity in each phase.

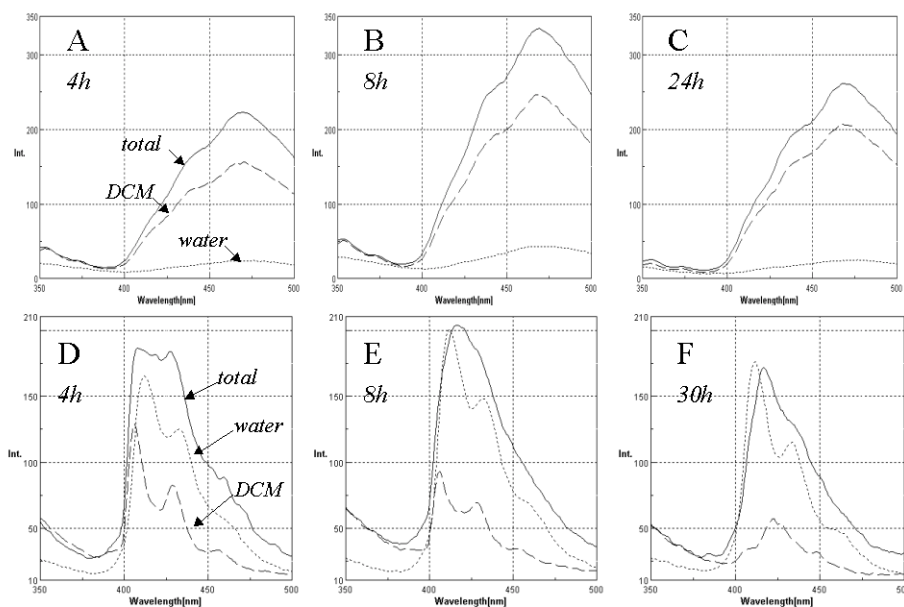


FIGURE 5 : Fluorescence spectra of daphnid extracts exposed for 4 to 30 hours to fluoranthene (A, B, C) or to BaP (D, E, F). Continuous line: total extract, dotted line: aqueous phase, dashed line: organic phase.

Figures 5A to C show three examples of spectra obtained with this method. From the same sample of contaminated daphnids three spectra were measured: the total extract, the organic phase and the aqueous phase. In these experiments, little fluorescence appears in the aqueous phase. Most of the fluorescent compounds remain in the organic solvent. In organic as well as in aqueous phases, spectra are very similar to the spectrum of fluoranthene in organic solvent. In the aqueous phase, fluorescence is slightly red-shifted but the shape is the same. Figures 5D to F show the results of the same experiment with BaP. Fluorescent compounds appear in each phase. As exposure time increases, the signal in the aqueous phase increases compared to the one in the organic phase. Spectra have similar shapes in both phases, with two distinct peaks (maximums at 406 and 429 nm in the organic phase, 412 and 433 nm in the aqueous phase), the highest one on shorter wavelengths. After a 30-hour exposure, only a few fluorescent compounds remain in the organic phase and fluoresce differently. When the protocol is applied on daphnid blanks, no fluorescent compound is extracted in any phase.

Fluorescent compounds that appear progressively in the aqueous phase as the exposure time increases are very likely PAH metabolites. Indeed, the main and primer process for PAH metabolism consists in an oxygenation of one aromatic ring [18]. Once oxygenated, PAH derived compounds become more hydrophilic while keeping an aromatic structure. Thus they are expected to be in the aqueous phase after separation and keep fluorescing, since aromatic structure is responsible for the fluorescent process [19]. In experiments with both PAHs, spectra in water are similar to spectra in the organic

phase, but shift to longer wavelengths. This suggests that the aromatic structure of the hydrophilic compounds is similar to the initial PAH. The similarity of BaP spectrum and some of its metabolites spectra was demonstrated in [8]. After a 24-hour exposure, almost all fluorescent compounds remain in the aqueous phase and the maximum intensity of the total extract fluorescence is at 417 nm. This wavelength is very likely to be due to the same BaP metabolite whose maximum emission fluorescence is at 412 in water, since the fluorescence of a compound is proved to be very solvent-sensitive [19].

As with many zooplankton organisms, daphnids are able to metabolize PAHs. Metabolism of BaP in *Daphnia magna* was analyzed in [4]. In these experiments, 12% of the parent BaP was metabolized after a 4-hour exposure. In our study, BaP metabolites are detected after a 4-hour bioaccumulation. Although the metabolism potential may vary to a great extent with the tested organisms, our results are coherent with the great reactive potential of this PAH [18]. On the contrary, in all but one fluoranthene sample (analyzed after a 24-hour exposure), no or very few new fluorescent compounds appeared in the aqueous phase. The fluoranthene seems to be much less metabolized than BaP by *Daphnia magna*.

Comparison between fluorescence and HPLC measurements

The fluorescence signal of analyzed PAHs is highly matrix-dependant: the presence of daphnid constituents may induce a quenching of the signal or an inner-filter effect and consequently a decrease of the initial intensity of the spectrum [19]. Moreover, as previously shown, biotransformed compounds may appear during bioaccumulation and interfere with the fluorescence signal of the parent compound. An important question is to determine whether it is possible to get quantitative information from the fluorescence spectra despite these two interferences. A similar spectrofluorimetric protocol was previously used to monitor the bioaccumulation of PAH in daphnids [11,13]. In these studies the presence of daphnid constituents was considered: fluorescence intensities of extracts were compared to calibration curves previously obtained by measuring fluorescence intensities of PAH in an organic solvent with crushed daphnids. It was also previously checked that spectra of daphnid extracts were similar to spectra of PAH in pure solvent. This latter condition is necessary to be able to link intensities in extracts with calibration curves of PAH fluorescence [11]. However, we found that this condition was not always satisfied, especially in BaP experiments. Therefore, for both PAHs, a calibration was done by comparing fluorescence intensities with HPLC measurements of PAH content in contaminated daphnids. In HPLC measurements, only parent PAHs are expected to be quantified: metabolites and daphnid constituents should have been removed from the sample during the extraction and the purification procedure. HPLC results were corrected by the mean recovery of the extraction (see Table 1). PAH contents were first expressed in ng of PAH in the sample, and then were related to 15 daphnids so as to compare with fluorescence measurements. Corrected values are referred to as $[\text{PAH}]_{15 \text{ org}}$ and expressed in ng.

| | Mean recovery (%) | Standard deviation | Relative standard deviation (%) |
|--------------|-------------------|--------------------|---------------------------------|
| Fluoranthene | 96 | 10 | 10 |
| BaP | 75 | 3 | 4 |

n = 10, ~50 organisms; ~5 mg per sample spiked with 80 ng of each PAH

TABLE 1 : mean recovery, absolute and relative standard deviations in HPLC measurements of fluoranthene and BaP

Fluoranthene analysis

As revealed earlier, very few fluorescence compounds appeared in the aqueous phase, which suggests that no metabolite was formed during the 24-hour bioaccumulation. Expecting that the fluorescence peak in the total extract was only due to parent fluoranthene, we inferred that peaks heights (measured at 470 nm, $I_{470\text{nm}}$) and HPLC measurements ($[\text{fluoranthene}]_{15\text{ org}}$) were linearly related and we performed a regression of the heights of the peak against HPLC measurements. It gives the following results:

$$[\text{fluoranthene}]_{15\text{ org}} = 0.115 (\pm 0.007) \cdot I_{470\text{nm}} + 3.52 (\pm 2.12).$$

$$(r^2 = 0.98, n = 14)$$

Figure 6 shows the plot of fluorescence intensities in daphnid extracts and corresponding fluoranthene measurements. Two outliers (two replicates of one single bioaccumulation experiment) were excluded from the regression. The regression line and the 95% confidence intervals are also plotted. The regression is very significant. The value of the constant is not significantly different from zero and the slope has a small standard deviation. These results agree with a former study [13] that used the peak height of the fluorescence intensity to estimate fluoranthene bioaccumulation. They also confirm the hypothesis that no interfering fluorescent compound appears in the sample.

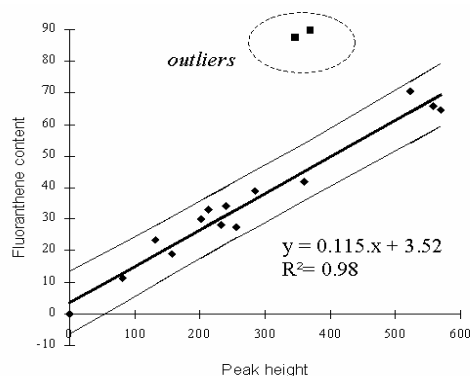


FIGURE 6 : peak heights and HPLC measurements of bioaccumulated fluoranthene

BaP analysis

For each fluorescence spectrum of the total extract, the heights of the spectrum at 407 and 417 nm were recorded. These two wavelengths correspond to the maximum of the BaP peak in daphnid extracts after a short-term and a long-term exposure. The height of the peak at 407 nm in the organic

phase after the water extraction was also noted. From these data, three regressions were considered, corresponding to three hypotheses on the molecules responsible for the fluorescence.

The first case is the same as for fluoranthene analysis. The fluorescence at 407nm in the total extract would be only due to BaP molecules. Thus, the maximum intensity at 407 nm would be linearly related to the BaP content in daphnids measured with HPLC :

$$[BaP]_{15\text{ org}} = A_1 \cdot I_{407nm} + A_2$$

The second hypothesis tested is based on the assumption that two molecules are responsible for the fluorescence signal: BaP, with a maximum fluorescence at 407 nm and another compound (compound "M"), with a maximum fluorescence at 417 nm. For each wavelength, the fluorescence of the total extract would result from these two compounds. Since fluorescence is an additive phenomenon, the heights of the spectrum at 407 and 417 nm could be broken down as

$$I_{407\text{ nm}} = \alpha_1 \cdot [BaP] + \beta_1 [M] \text{ and } I_{417\text{ nm}} = \alpha_2 \cdot [BaP] + \beta_2 [M].$$

Thus, the BaP content would be a linear combination of the two intensities:

$$[BaP]_{15\text{ org}} = \frac{\beta_2 I_{407} - \beta_1 I_{417}}{\alpha_1 \beta_2 - \alpha_2 \beta_1} \text{ i.e. } [BaP]_{15\text{ org}} = B_1 \cdot I_{407nm} + B_2 \cdot I_{417nm}$$

The third test consists in a regression of the height of the peak in the organic phase versus HPLC measurements:

$$[BaP]_{15\text{ org}} = C_1 \cdot I_{407nm, \text{ org}} + C_2$$

The tested hypothesis is that the spectrum of the organic phase is closely related to the BaP measurement because BaP was extracted in this phase. Indeed, the similarity of the spectrum in the organic phase with the one of BaP in pure solvent and the spectrum suggests that the major fluorescent compound in the organic phase is BaP.

The results of these regressions are presented in Table 2. BaP contents as estimated with those calibrations are compared with HPLC measurements on Figure 7.

| Calibration type | Parameters | | R ² |
|------------------|---|--|----------------|
| Total extract | | | |
| Regression 1 | $A_1 = 2.09 \cdot 10^{-2} (\pm 0.39 \cdot 10^{-2})$ | $A_2 = -0.294 (\pm 0.64)$ | 0.65 |
| Regression 2 | $B_1 = 3.66 \cdot 10^{-2} (\pm 0.35 \cdot 10^{-2})$ | $B_2 = -1.62 \cdot 10^{-2} (\pm 0.32 \cdot 10^{-2})$ | 0.88 |
| Organic phase | | | |
| Regression 3 | $C_1 = 3.02 \cdot 10^{-2} (\pm 0.31 \cdot 10^{-2})$ | $C_2 = 0.629 (\pm 0.277)$ | 0.86 |

TABLE 2 : Calibrations of the spectrofluorimetric measurement : mean value (\pm standard deviation) of each parameter, and determination coefficient of the regression.

From the total extract measurements, the second regression gives much better results than the linear one. In the second regression both parameters are significant and the 95% confidence interval is

much narrower (see Figure 7A and 7B). As presented earlier, several indications demonstrated that a fluorescent BaP metabolite appeared in the sample. These results confirm the hypothesis that an interfering compound appears and must be considered for BaP quantification. As expected b_2 is negative, which confirms that an interfering fluorescent signal must be subtracted. The fluorescence signal in the organic phase is also well linearly correlated to the BaP content, which confirms that some interfering fluorescent compounds are removed from the organic solution during the water extraction.

Finally, for fluoranthene as well as for BaP bioaccumulation measurements, good linear calibrations were obtained. The analysis of fluorescence spectra of daphnid extracts can be used to quantify PAH contents. Fluorescence signals are good linear indicators of PAH contents in daphnids.

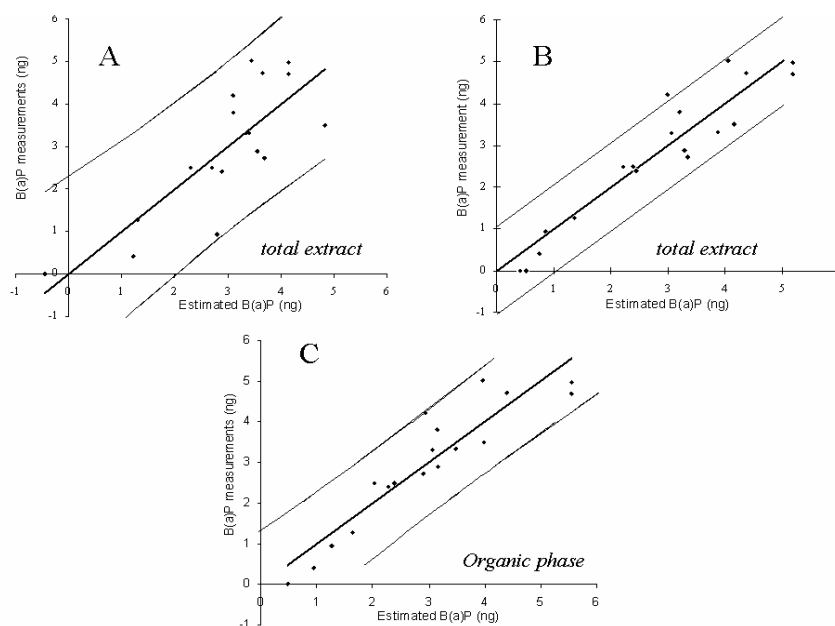


FIGURE 7 : HPLC-measured and estimated BaP contents in daphnids. *A:* estimation from the linear regression with $I_{407\text{ nm}}$. *B:* estimation from the linear regression with $I_{407\text{ nm}}$ and $I_{417\text{ nm}}$. *C:* estimation from the linear regression with $I_{407\text{ nm}}$ in the organic phase (Dotted lines : 95% confidence intervals).

Detection limits

Detection and quantification limits were determined from the mean and the standard deviation of daphnid blank extracts (see Table 3). Compared with HPLC quantification limits, the spectrofluorimetric method exhibits similar performance for BaP analysis, whereas it is more than ten times less sensitive for fluoranthene analysis.

As an example, PAHs are detectable in a 15-organism sample after a 4h-exposure to a 50 ng/L BaP solution. The mean content in a sample is 4.8 ng of BaP. After exposure to a 1 $\mu\text{g/L}$ fluoranthene solution, PAHs are detectable, and PAH content is slightly above the quantification limit. These results show that the spectrofluorimetric method is suitable for measuring short-term bioaccumulation of PAHs in moderately contaminated media.

| | Detection limit Fluorescence | Quantification limit Fluorescence | Quantification limit HPLC |
|--------------|---------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| Fluoranthene | ~4 ng | ~10ng | ~0.5 ng |
| BaP | ~0.1 ng | ~0.3 ng | ~0.5 ng |

TABLE 3 : Detection and quantification limits of spectrofluorimetric and HPLC methods (expressed in ng per sample)

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

A new methodology for monitoring the bioaccumulation of PAHs in control media experiments was developed and validated for fluoranthene and benzo[*a*]pyrene. Good calibrations curves were obtained between PAH contents as measured with HPLC and spectrum intensities. More interestingly, we evidenced the presence of metabolites during the bioaccumulation of BaP. This method allows the qualitative monitoring of the biotransformation of PAHs with exposure. The protocol is very fast and does not require any specific equipment, whereas radioactive techniques cannot differentiate between initial or metabolized PAH and chromatographic techniques require additional extractions and measurements.

Additional work is required to explore the full potential of this method. Particularly, the estimation of the recovery of the sample treatment should be determined. Preliminary results showed that the sonication/filtration treatment seemed to provide a good recovery of BaP (>80%). This small but systematic deviation should be precisely determined for all PAH analyzed. The influence of the coloration of the sample, which may lead to inner filter effect and/or quenching [19] should be evaluated. In this first study, daphnids were not weighed before treatment, and thus bioconcentration factors could not be assessed. By weighting the 15-daphnid sample, bioconcentration factors should be obtained from spectrofluorimetric measurements.

Finally, the possibility of monitoring PAH metabolites with this simple method opens to interesting prospects. It may be applied to other organisms, so as to compare their metabolism potential. Indeed, great variations exist among aquatic organisms [20]. The evolution of metabolism within organisms is of special interest for toxic response evaluation, because PAHs metabolites have a greater toxic potential than parent PAH [21]. Based on hydroxy-PAH spectrofluorimetric analysis and GC-MS measurements, identification and quantification of PAH metabolites should be assessed by fluorescence.

ACKNOWLEDGEMENTS.

The authors would like to thank Bernard Vollat for his technical assistance in maintaining the daphnids cultures and Laura Oberhaus who helped improving the English style of the manuscript. Jussi Kukkonen is also kindly acknowledged for his valuable comments and suggestions on those experiments.

REFERENCES

- [1] J.M. Neff Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. Sources, Fates and biological effects. Applied Sciences publishers LTD. (1979)
- [2] E. Manoli and C. Samara Trends Anal. Chem. **18** 417-428 (1999)
- [3] T. Vo-Dinh, J. Fetzer and A.D. Campiglia Talanta **47** 943-969 (1998)
- [4] J.F. McCarthy Arch. Environ. Contam. Toxicol. **12** 559-568 (1983)
- [5] G.J. Lleversee, J.P. Giesy, P.F. Landrum, S. Gerould, T.E. Fannin, J.D. Haddock and S.M. Bartell Arch. Environ. Contam. Toxicol. **11** 25-31 (1982)
- [6] J. Kukkonen, J.F. McCarthy and A. Oikari. Arch. Environ. Contam. Toxicol. **19** 551-557 (1990)
- [7] M. Haitzer S. Höss, W. Traunspurger and C. Steinberg. Aquat. Toxicol. **45** 147-158. (1999)
- [8] M.K. Krahn, M.S. Myers, D.G. Burrows and D.C. Malins, Xenobiotica **14** 633-646 (1984)
- [9] F. Ariese, S.J. Kok, M. Verkaik, C. Gooijer, N.H. Velthorst and J.W. Hofstraat Aquat. Toxicol. **26** 273-286 (1993)
- [10] J. Beyer, M. Sandvik, K. Hylland, E. Fjeld, E. Egaas, E. Aas, J.U. Skare and A. Goksor. Aquat. Toxicol. **36** 75-98 (1996)
- [11] G.R. Southworth, J.J. Beauchamps and P.K. Schmieders. Wat. Res. **12** 973-977 (1978)
- [12] G.J. Stroomberg, C. Reuther, T.C. Van Brummelen, C.A.M. van Gestel, C. Cooijer and W.P. Cofino. Chemosphere **33** 1905-1914 (1996)
- [13] B. Clément, C. Muller and G. Verrhiest Polycyclic Arom. Compounds **20** 259-274 (2000)
- [14] M.J. Lopez de Alda-Villaizan, S. Garcia Falcon, M.A. Lage-hysty and J.simal-Lozano J. AOAC Int. **78** 402-406. (1995)
- [15] C. J. Owen, R. P. Axler, D. R. Nordman, M. Schubauer-Berigan, K. B. Lodge and J. P. Schubauer-Berigan Chemosphere. **31** 3345-3356 (1995)
- [16] M.S. Garcia Falcon, S. Gonzalez amigo, M.A. Lage Yusty, B. Laffon Lage, J. Simeal Lozano Talanta **48** 377-384. (1999).
- [17] D. Rendell and D. Mowthorpe Fluorescence and phosphorescence spectroscopy. Series Analytical Chemistry by open learning. John Wiley & Sons (1987)
- [18] U. Varanasi Eds. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment CRC Press Inc. (1989)
- [19] J.R. Lakowicz. Principles of fluorescence spectroscopy. Plenum Press. New York. (1983)
- [20] A. McElroy, K. Leitch and A. Fay Mar. Environ. Res. **50**, 33-38 (2000)
- [21] J.A. Timbrell Principles of biochemical toxicology, Taylor and Francis Eds, 2nd ed. (1991)

ARTICLE 2

Effect of Dissolved Organic Matters of Various Origins and Biodegradabilities on the Bioaccumulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in *Daphnia magna*.

(*Environmental Toxicology and Chemistry*, 2003, Vol 22, No 6, pp 1288-1294)

Catherine GOURLAY^{†‡*}, Marie-Hélène TUSSEAU-VUILLEMIN[§], Jeanne GARRIC^{||}, Jean-Marie MOUCHEL[†]

[†]Centre d'Enseignement et de Recherches Eau-Ville-Environnement, ENPC, Cité Descartes, 77455 Marne La Vallée Cedex 02. France.

[‡]ENGREF, 19, avenue du Maine, 75732 Paris Cedex 15. France

[§]Cemagref, UR Qualité et Fonctionnement Hydrologique des Systèmes Aquatiques, Parc de Tourvoie, BP 44, 92163 Antony Cedex. France

^{||} Cemagref, Laboratoire d'écotoxicologie, 3bis quai Chauveau, CP 220, 69336 Lyon Cedex 09. France

Abstract

As a preliminary study of the influence of urban organic matter on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), the effect of different types of dissolved organic matters (DOM) on the bioaccumulation of fluoranthene, pyrene or benzo[a]pyrene in *Daphnia magna* was studied. Commercial humic substances, DOM from the areation basin of a wastewater treatment plant and highly biodegradable DOM (algae or animal extracts) were tested. The bioaccumulation of benzo[a]pyrene was reduced by each DOM (up to 80% reduction with humic substances). Pyrene bioaccumulation was also decreased by each DOM in a less extent. Fluoranthene bioaccumulation was affected by the presence of humic acids only. In each experiment, the solution containing humic DOM lead to the lowest bioaccumulation. Supposing that only dissolved PAHs were bioavailable, the reduction of bioaccumulation allowed to biologically estimate the partition coefficient of DOM and PAH K_{DOC} . The estimated coefficients were positively related to the aromaticity of DOM and negatively related to its biodegradability.

Key-words

Bioaccumulation, Polycyclic aromatic hydrocarbons, Dissolved organic matter, Biodegradability

INTRODUCTION

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are carcinogenic and mutagenic organic contaminants, usually by-products of industrial and urban activities as fuel combustion and conversion in anthropized regions. They are a major cause of pollution in urban aquatic ecosystems. As hydrophobic components, they strongly bind organic materials, sediments, and lipidic substances. In

aquatic ecosystems, PAHs are mainly concentrated in sediments and can be bioaccumulated in organisms [1]. PAHs, as other hydrophobic organic xenobiotics, have also a great propensity for binding to dissolved organic materials, which modifies their bioavailability in the water-column [2]. As shown by McCarthy [3], Leversee et al. [4], Kukkonen and Oikari [5], or more recently by Haitzer et al. [6], the presence of dissolved organic matter (DOM) in the exposure media can reduce the bioaccumulation of hydrophobic organic compounds in *Daphnia magna*. Similar observations have been reported with fish [7,8] and benthic organisms [9,10-12]. The generally-accepted assumption is that only the unbound fraction (also referred to as the free fraction) of contaminants is bioavailable to these organisms.

The intensity of interactions depends on the characteristics of the organic matter. Humic substances that form the hydrophobic part of natural organic matter and may represent up to 60% of DOM in lakes and rivers have a great potential to bind PAHs [13]. Kukkonen et al. [14] showed that humic substances were the main DOM responsible for binding of benzo[*a*]pyrene to natural DOM in waters. This is the reason for the frequent use of humic substances or stable natural waters rich in humic substances to analyze the effect of DOM on bioavailability [2]. Recently, Akkanen et al. [15] demonstrated that natural DOM from rivers that did not have humic characteristics (i.e. low aromaticity, low carboxylic content, etc.) could also affect the bioavailability of PAHs. However, few studies are available on these DOM. More specifically, the role of DOM from ecosystems submitted to anthropogenic inputs is still poorly understood. Urban raw and treated effluents, which are a major source of PAHs to aquatic ecosystems, also contain large amounts of non humic [16,17] and biodegradable organic matter [18,19]. As an example, Seidl et al. [20] estimated that 80% and 40% of DOM in combined sewer overflows and in the Seine River (France), respectively, were biodegradable. Although the ability of such anthropogenic DOM to interact with PAHs may be lower than that of humic substances and stable natural DOM, their high concentration in effluents may strongly influence the fate of contaminants and their bioavailability. Up to now, no comprehensive study on the effect of easily biodegradable organic matter on the fate of PAHs in ecosystems is available.

In this study, the bioaccumulation of three PAHs (fluoranthene, pyrene and benzo[*a*]pyrene) by *Daphnia magna* (*D. magna*) was studied in control media containing different types of DOM. The bioaccumulation was measured according to the protocol developed by Gourlay et al. [21]. As a first step towards the evaluation of the role of organic matter on the bioavailability of PAHs in anthropogenic ecosystems, we particularly focused on the effect of biodegradable substances from various origins. From bioaccumulation results, an estimation of the carbon-normalized partition coefficients of these DOM and PAHs, K_{DOC} was proposed.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals, solvent and water.

Dilutions in methanol of fluoranthene, pyrene and benzo[*a*]pyrene (BaP) (Table 1) were either purchased (Promochem, Molsheim Cedex, France) or prepared in the laboratory from PAH solid powder (purity: 98%, Aldrich, Steinheim, France). A mixture of high purity dichloromethane and methanol (4:1 v/v) (Spectronorm, Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France or LiChroSolv, Merk Eurolab, Fontenay-sous-Bois, France) was used for the extraction of PAH in organisms and

spectrofluorimetric measurements. Mineral water was used in all exposure experiments as well as for daphnid culture (Evian[®], Evian, France. pH: 7.2, dissolved solids: 309 mg/L, conductivity: 567 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Evian[®] was chosen for its neutral pH and its moderate and stable mineralization, making an appropriate media for daphnid culture and having characteristics close to those of temperate surface water. Before exposure, the water was spiked with one PAH by simply diluting the methanol solution. The methanol addition in the media was lower than 1‰ and the resulting PAH concentration in water was always below aqueous solubility (Table 1).

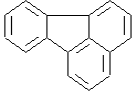
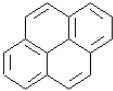
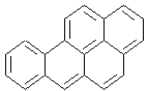
| | Fluoranthene | Pyrene | Benzo[a]pyrene |
|--|---|---|---|
| Structure |  |  |  |
| Octanol-water partition coefficient $\log K_{\text{OW}}$ | 5.22 | 5.13 | 6.50 |
| Aqueous solubility S_w | 240 $\mu\text{g}/\text{L}$ | 136 $\mu\text{g}/\text{L}$ | 1.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ |
| <i>Spectrofluorimetry:</i> | | | |
| Excitation wavelength | 287 nm | 275 nm | 265 nm |
| Corrected fluorescence F at the wavelength λ | $F_\lambda = I_\lambda - I_{400}$ | $F_\lambda = I_\lambda - I_{480}$ | $F_\lambda = I_\lambda - I_{395}$ |
| Maximum emission wavelength $\lambda(\text{max})$ | 470 nm | 380 nm | 407 nm |

Table 1: Structures and characteristics of the tested polycyclic aromatic hydrocarbons (from [26]). Characteristics of the spectrofluorimetric analysis

Five types of organic matter solutions from different origins were used: a solution of commercial humic acids ([HA] Aldrich[®], Steinhein, Germany) was prepared as follows: After dilution in the water used for culture, the solution was let in the dark at 4°C for at least one month in order to allow flocculation and settling of non dissolved organic matter. Before use, the HA solution was filtered on a 0.45 μm glass-fiber filter ([GF/F] Whatmann[®], Kent, UK) in order to preserve only the dissolved fraction. An artificial substrate presenting biodegradation characteristics close to those of domestic wastewaters was prepared by 1%-diluting in exposure media a commercial artificial meat juice, a liquid composed of meat and vegetal extracts and sugars, (Viandox, Rueil Malmaison, France). In its pure state, Viandox[®] is composed of 42 g/L of carbohydrates, 173 g/L of proteins and 0.77 mg/L of fats [22]. Water from the aeration basin (WAB) of a small-scale sewage treatment plant pilot was sampled, let decantate and filtered on a GF/F filter. The pilot was fed by the same artificial substrate 0.376%-diluted in water previously spiked with nutrients to optimize biomass development. Details on the pilot are available in Pernelle et al. [22]. The substrate was biodegraded by activated sludge in the aerator basin. The aerator was connected to a clarifier basin where sludge was separated from degraded effluent by decantation and the supernatant discharged. Dissolved organic matter of filtered WAB were thus similar to DOM of plant pilot outputs. Two samples were collected from the same pilot within two weeks. Finally, two DOM solutions of algae extracts were prepared: a fresh *Selenastrum capricornutum* culture was autoclaved for 90 min at 120 °C and filtered on a GF/F filter. Same algae were cultured till they fade and then autoclaved and filtered in the same way. All DOM solution were stored in the dark at 4°C. All but humic acids were used within two weeks after preparation or collection. After addition of PAH and DOM in water, the exposure media was

allowed to sit for one hour before introducing organisms, in order to reach equilibrium between PAH, DOM, and the glass walls [7,23].

DOM characterization

For each DOM stock solution, the dissolved organic carbon concentration (DOC) was measured using a Carbon Analyzer (O.I. Analytical, College Station, TX, USA). Absorbance at 270 nm (A_{270}) was measured using a spectrophotometer (Lambda 11 Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France). Specific absorptivity ($ABS_{270} = 1000 \times A_{270}/[DOC]$) was calculated to estimate the aromatic carbon content [24].

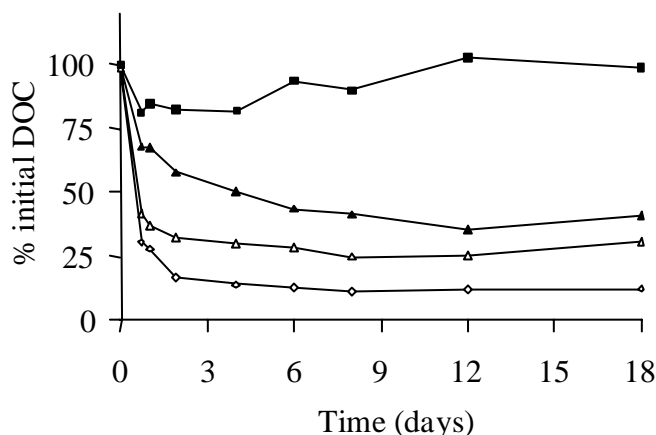


Figure 1: Evolution of dissolved organic carbon (DOC) concentrations in organic matter stock solutions during biodegradation experiments. Black squares: Humic acids, black triangles: Fanned algae extracts, open triangles: Fresh algae extracts. Open squares: Artificial substrate.

The biodegradation of DOM in all but WAB solution was followed during 18 days at room temperature (Figure 1). We inoculated 350 to 400 ml of each DOM solution with 350 to 400 μ l of activated sludge from a sewer treatment plant. Solutions were aerated so as to keep aerobic conditions on the solutions. Dissolved organic carbon content was measured regularly. After 8 days, DOC reached a plateau. The biodegradability of the solution was expressed as the mean percentage of DOC decrease after 8, 12 and 18 days. The same biodegradability estimation could not be performed with the aeration basin sample through lack of the stock solution. Data collected in Tusseau-Vuillemin and Reveillé [19] showed that the mean biodegradability of filtered effluents of sewage treatment plants that have a similar efficiency ($\sim 90\%$ in reducing organic content) was approximately 30%. This value gives an order of magnitude for WAB biodegradability.

The characteristics of the five DOM solutions are shown on Table 2.

Organisms

Bioaccumulation experiments were performed using daphnids (*D. magna*) as the model organism. They came from a culture maintained in the laboratory under controlled lighting, temperature and

feeding conditions. Daphnids were fed daily with unicellular algae *Selenastrum capricornutum*, also cultured in the laboratory. Three times a week, neonates were picked out and bred separately. Organisms used in contamination experiments were 6 to 8 day old adult daphnids that did not have eggs in their brood chamber yet. They were not fed the day of exposure. One hour before exposure, they were transferred in clean mineral water in order to clear their gut.

| | Stock solution | Exposure media | ABS ₂₇₀ | Biodegradability |
|------------------------------------|--------------------|----------------|--------------------|---------------------|
| Commercial humic acids | 51 | 0-10 | 55 | 3% |
| Artificial substrate | 1000 | 0-30 | 5.1 | 88% |
| Filtered water from aeration basin | 28,37 ^a | 0-21.6 | 25.3 | ~ 30 % ^b |
| Fresh algae components | 41 | 0-20.4 | 8.6 | 73% |
| Fanned algae components | 18 | 0-8.8 | 8.7 | 61% |

^a two samples were collected at the same sewer treatment plant pilot within two weeks.

^b the biodegradability the water from an aeration basin was not measured. It was estimated from biodegradability of sewage treatment plant effluent data found in [19].

Table 2: Dissolved organic matters (DOC) characteristics: concentrations in the stock solution and in exposure media (mg/L DOC), absorptivity at 270 nm (ABS₂₇₀, L/g/cm) and 18 day-biodegradability (%)

Experimental set-up.

For each type of DOM, daphnids were exposed for 4 hours in water spiked with one PAH and DOM, at room temperature, in the dark to avoid photo-degradation of PAHs. Nominal fluoranthene, pyrene and benzo[*a*]pyrene concentrations were respectively 25 µg/L, 2 µg/L and 1 µg/L. The density of daphnids was 100 (± 10) organisms per liter, except in experiments with HA, for which it was about 250 organisms per liter. The DOM concentration range in exposure media for each type of DOM is shown on Table 2. All concentrations were between 0 and 30 mg/L DOC, which is within the range of DOM concentrations in treated urban effluents or polluted rivers [19]. Depending on the amount of biological material and DOM stock solution available, two or three daphnids replicate samples were prepared in each beaker, and four to six DOM concentrations could be tested.

No toxic effect (mortality or mobility inhibition) was observed in any beaker. Parallel control experiments in uncontaminated media were conducted. They are here-after referred to as daphnid blanks. In order to reduce the result variability due the physiology of organisms, each series of experiments (one PAH and one DOM) was performed with daphnids that had been collected the same day and bred in the same media. No comparison was made between results that had not been obtained the same day with the same pool of daphnids.

Sample treatment and spectrofluorimetric measurement

For each measurement, fifteen organisms were removed, gently rinsed with Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, USA) water and put in a glass tube with 4 ml of organic solvent. The sample was sonicated for 1 minute using a 3-mm-Ø sonicating horn (Vibracell™ 72434, 50 Watts, Bioblock Scientific, France). The tube was then stored in the dark at 4°C until analysis (no more than one

week). The sample was filtered on a GF/F filter and put in 1-cm quartz cuvette for fluorescence analysis of the daphnid extract.

The emission fluorescence spectrum of the daphnid extract was recorded using a ultraviolet-visible spectrofluorimeter (FP-750, Jasco, Nantes, France) equipped with a 150W Xenon lamp (Pelican Products, Torrance, CA, USA). Excitation and emission band widths were set at 5 nm. The recording speed was 250 nm/min. Excitation wavelengths were set at 287 nm, 275 nm and 265 nm respectively for fluoranthene, pyrene and benzo[*a*]pyrene. Emission spectra were recorded between 350 and 500 nm. Fluorescence measurements were performed at room temperature.

Filtrates of daphnid extracts were slightly yellow because of lipids contained in daphnids dissolved in the solvent and not removed by filtration. However, despite daphnid blank extracts exhibited a non-zero baseline, no fluorescence peaks were observed. Fluorescence of daphnid blanks exposed to DOM was identical to that of nonexposed daphnid blanks.

Data processing

The intensities of the measured peaks were corrected for baseline mainly due to daphnids lipids by subtracting the fluorescence intensity at the bottom of the peak (Table 1).

The analysis of spectra in daphnid extract was based on the protocol developed in Gourlay et al. [21]. Briefly, when the spectra to be compared have the same shape, maximum fluorescence intensities $F_{\lambda_{max}}$ in daphnid extract spectra at λ_{max} (Table 1) are linearly related to PAH content: $[\text{PAH}]_{\text{org}} = \alpha \cdot F_{\lambda_{max}}$, α being constant within the same series of bioaccumulation.

Previous studies with pyrene (unpublished data) and fluoranthene [21] showed that without DOM in the media, the spectra of the daphnid extracts always had the same shape whatever the exposure time or the PAH concentration in water. We verified in this study that the shape of the spectra of these two PAHs measured in daphnids extracts always was neither influenced by the presence of DOM in the media (Fig. 2).

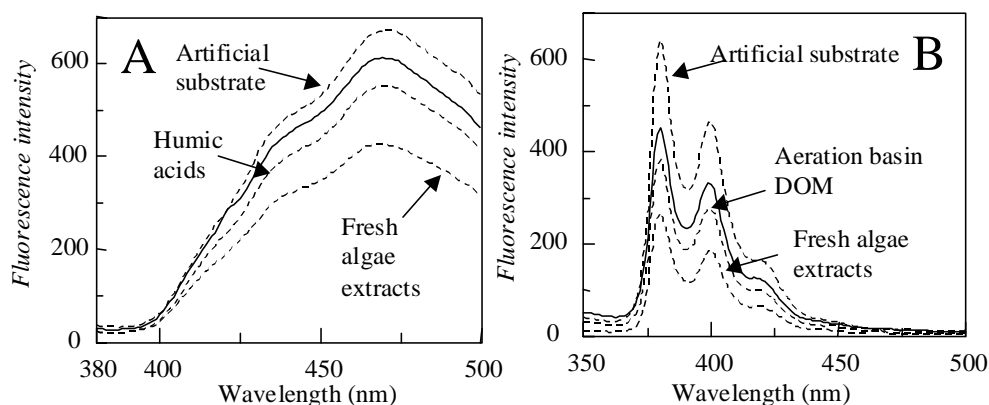


Figure 2 : Fluorescence spectra of daphnid extracts after exposure to fluoranthene (A) or pyrene (B) without (continuous line) or with different kinds of dissolved organic matter ([DOM] dotted lines).

In benzo[*a*]pyrene experiments, the shape of the spectrum of daphnids extracts was shown to evolve with exposure time [21]. After a short exposure, the spectrum displayed two distinct peaks with maxima at 407 and 429 nm. Then it evolved to a spectrum with a wider and unique peak, with

maximum wavelength at 417 nm. This evolution was due to another fluorescent compound that progressively appeared in the extract and that was very likely a BaP metabolite. Gourlay et al. [21] compared fluorescence peaks with HPLC BaP measurements in organisms and demonstrated that: $[BaP]_{org} = \alpha_1 \cdot F_{407nm} + \alpha_2 \cdot F_{417nm}$ whatever the shape of the BaP spectrum. The deformation of the peak due to the BaP metabolisation was estimated with the parameter $R = F_{407nm}/F_{417nm}$. However, in each experiment with DOM, R was constant with a maximum relative standard deviation of 14%, indicating that the presence of DOM does not influence BaP metabolism in daphnids. The BaP content in daphnid extract could be linearly related to F_{407nm} : $[BaP]_{org} = F_{407nm} (\alpha_1 + \alpha_2/R) = \beta \cdot F_{407nm}$. Due to the linear relation between F_{max} and the PAH content in daphnid extracts, the relative effect of DOM on PAH bioaccumulation after a 4 hour exposure was estimated with the ratio F/F_0 , F_0 being the mean F_{max} in daphnid extract exposed to PAH only and F being F_{max} in daphnid extract exposed to PAH and DOM.

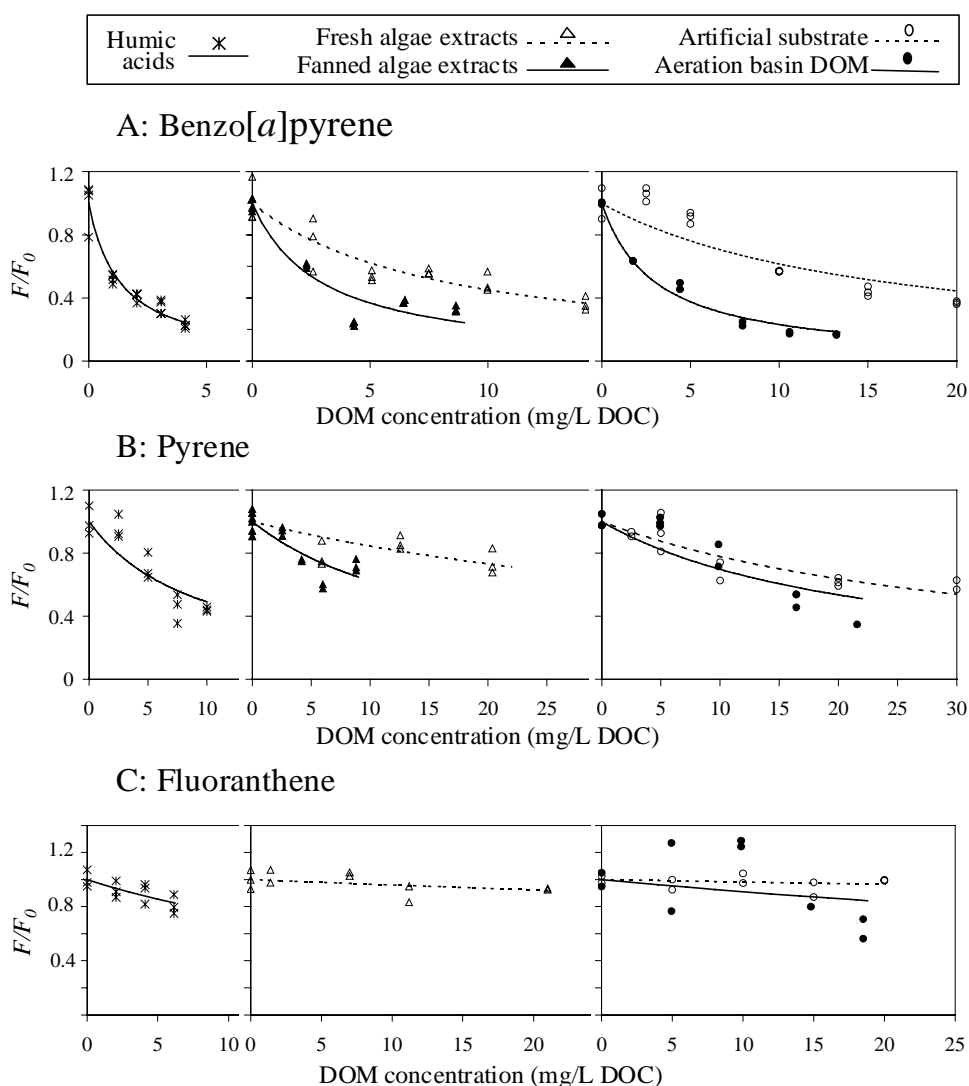


Figure 3 : *Relative bioaccumulation of benzo[a]pyrene (A), pyrene (B) and fluoranthene (C) in D. magna against dissolved organic matter (DOM) concentration in the media. F is a linear estimator of the bioaccumulation, F_0 being the estimator in a media without DOM. DOM are humic acids (on the left), algae extracts (in the center), an artificial substrate of a sewage treatment plant pilot and DOM from water of the aeration basin of the plant (on the right); dissolved organic carbon (DOC); not detected (ND).*

RESULTS

Benzo[*a*]pyrene (Fig. 3A). the decreasing of F/F_0 indicated that the bioaccumulation of BaP was reduced with increasing concentrations of DOM. The reduction was more pronounced with humic substances: Bioaccumulation was 80% less in the 4 mg/L DOC solution of HA compared to a media without DOM. The reduction was less pronounced with other DOM: A 50% reduction was observed in the presence of approximately 4.5 mg/L DOC from WAB or fanned algae extracts, 10 mg/L DOC from fresh algae extracts or 15 mg/L DOC from the artificial substrate.

Pyrene (Fig. 3B). The 4-hour bioaccumulation of pyrene also decreased with increasing concentrations of DOM. With the same DOC content in the solution, humic substances lead to the lowest bioaccumulation. The reduction of pyrene bioaccumulation due to DOM was overall weaker than the reduction of BaP bioaccumulation. A maximal 55% reduction was observed with 10 mg/L HA-DOC.

Fluoranthene (Fig. 3C). The bioaccumulation of fluoranthene was only significantly affected by humic substances. A maximal 25 % reduction was observed with 6.1 mg/L HA-DOC. Experiments with fanned algae extracts could not be performed properly, due to technical problems. Other DOM did not significantly affect fluoranthene bioaccumulation in the range of tested DOM concentrations.

DISCUSSION

K_{DOC} estimation: Methodology and model

Kukkonen et al. [5,14] proposed a model for bioaccumulation of organic contaminants by *D. magna* in the presence of DOM. It is based on the assumption that only so-called free contaminants are available. Bound PAHs are too large or too polar to cross biological membranes [9]. In this model, the bioconcentration factor (ratio of concentrations of PAHs in organisms and in the media at steady-state) in the presence of the bioconcentration factor DOM (BCF_{DOM}) is linearly related to f_{free} , the free fraction of PAHs. The BCF_0 being the bioconcentration factor without any DOM in the exposure media, the following relation can be written :

$$BCF_{DOM} = f_{free} BCF_0 \quad (1)$$

f_{free} is expressed with the carbon-normalized DOM concentration [DOC], the carbon-normalized partition coefficient K_{DOC} defined from the concentration of PAHs bound to DOM ($[PAH]_{DOM}$) and the concentration of free PAH in water ($[PAH]_{free}$) by :

$$K_{DOC} = \frac{[PAH]_{DOM}}{[PAH]_{free} [DOC]} \Leftrightarrow f_{free} = \frac{1}{1 + K_{DOC} [DOC]} \quad (2)$$

Combining Equations 1 and 2, this model draws a relationship between biological data (BCF_0 and BCF_{DOM}) and chemical and physical parameters (K_{DOC} and [DOC]):

$$BCF_{DOM} = \frac{BCF_0}{1 + K_{DOC} [DOC]} \quad (3)$$

This model has been validated in several studies [3, 5, 8, 12]. Haitzer et al. [10-12] used this equation to estimate partition coefficients K_{DOC} from the observed reductions of bioconcentration in the presence of DOM.

Similarly, we define a biologically-determined partition coefficient $K_{DOC}(biol)$ from the reduction of bioaccumulation in daphnids exposed to DOM after a 4-hour exposure:

$$\frac{F_{DOM}}{F_0} = \frac{1}{1 + K_{DOC}(biol)[DOC]} \quad (4)$$

Both F_{DOM} and F_0 being respectively the fluorescence peak heights in daphnids extracts exposed or not to DOM. Although the steady state is not reached in Equation 4, we show hereafter that the significance of K_{DOC} is exactly the same in both methodologies.

Bioaccumulation of PAHs in *Daphnia magna* has been well described by a one-compartment toxicokinetic model [6, 25]:

$$\frac{d[PAH]_{org,t}}{dt} = k_u [PAH]_{water} - k_d [PAH]_{org,t} \quad (5)$$

with $[PAH]_{org,t}$ the PAH concentration in the organism, $[PAH]_{water}$ the total PAH concentration in the water (assumed to be constant during the exposure), k_u the uptake rate and k_d the depuration rate. During the uptake period, the concentration in organisms increases, following the equation :

$$[PAH]_{org,t} = [PAH]_{water} \frac{k_u}{k_d} (1 - e^{-k_d t}) \quad (6)$$

When the steady state is reached, the bioconcentration factor BCF can be estimated by calculating the PAH concentrations ratio in organisms and in the media, leading to the following relationship:

$$[PAH]_{org,t} = [PAH]_{water} \frac{k_u}{k_d} \Leftrightarrow \frac{[PAH]_{org,\infty}}{[PAH]_{water}} = BCF = \frac{k_u}{k_d} \quad (7)$$

Combining Equations 6 and 7, the bioaccumulation kinetic can be described by :

$$[PAH]_{org,t} = [PAH]_{water} BCF (1 - e^{-k_d t}) \quad (8)$$

Following the results obtained by Nikkilä and Kukkonen [25] on the toxicokinetic of pyrene in the presence of DOM, we assume that the depuration process k_d is not influenced by DOM. This assertion is supported by the constancy of the metabolism rate indicator R among experiments with different DOM concentrations. Finally:

$$\frac{F}{F_0} = \frac{[PAH]_{org,t,DOM}}{[PAH]_{org,t,0}} = \frac{[PAH]_{water} BCF_{DOM} (1 - e^{-k_d t})}{[PAH]_{water} BCF_0 (1 - e^{-k_d t})} = \frac{BCF_{DOM}}{BCF_0} \quad (9)$$

Relation to Equation 9 shows that the methodology is equivalent to the one developed by Kukkonen et al. [5, 4] and used in Haitzer et al. [6, 10-12], although the exposure time is only four hours.

Using Equation 4 and experimental values of F_{DOM}/F_0 , we determined $K_{DOC}(biol)$ by non-linear regressions for each combination of DOM and PAH. Figure 3 shows experimental F_{DOM}/F_0 values and corresponding regression curves, whereas $K_{DOC}(biol)$ are presented in Figure 4. Significant regressions were obtained in the case of BaP and pyrene with any kind of DOM and for fluoranthene with humic acids only.

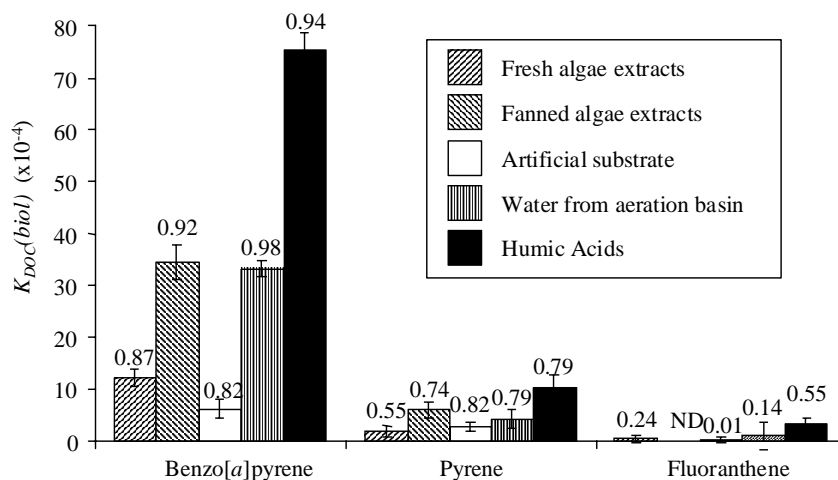


Figure 4 : Estimated biological partitioning coefficients $K_{DOC}(biol)$. Determination coefficients r^2 are noticed on the top of each bar. ND: not determined.

Influence of the PAH hydrophobicity on its K_{DOC}

The PAH binding on organic matter is primarily due to hydrophobic interactions [26]. As expected, the most hydrophobic benzo[a]pyrene displayed the greatest partition coefficients. Pyrene $K_{DOC}(biol)$ were intermediate and fluoranthene $K_{DOC}(biol)$ were the lowest. This decreasing binding capacity could be related to the increasing aqueous solubility of the compound S_{water} , a hydrophobicity indicator [26].

Variability due to the determination technique

Table 3 shows $K_{DOC}(biol)$ from this study and K_{DOC} data found in the literature for the three PAHs and different DOM. The analytical methods used to determine K_{DOC} are reported, since their differences may explain part of the great variability among results reviewed in this table. As an example, Kukkonen and Pellinen [27] found that K_{DOC} for BaP and a river DOM measured by the dialysis method was 3.3 times higher than the one measured by the reverse-phase separation technique. The methods that do not interfere with the equilibrium between PAH and DOM lead to higher K_{DOC} than the methods that require an extraction of free compounds [27]. Indeed, PAHs and DOM interact by various modes of binding and adsorption [2]. During the extraction procedures, some weak bonds may be broken and the free fraction overestimated. The free fraction estimation is therefore not directly measurable by a chemical analysis. The estimation of K_{DOC} we used in this study estimates the free fraction of PAH through an evaluation of the bioavailable fraction. The bioaccumulation of PAHs in organisms may affect the equilibrium between DOM and PAHs in the media and introduce a bias for the free fraction measurement. However, the binding constant $K_{DOC}(biol)$ is directly related to the bioavailable fraction that is more relevant for ecotoxicological issues.

| PAH ^a | Dissolved organic matter | Analytical technique | K_{DOC} (*10 ⁻⁴ L/kg DOC) | Ref. |
|----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|---|------------|
| Benzo-[a]-pyrene | Fresh algae extracts | Biological | 12.1 | This study |
| | Fanned algae extracts | Biological | 34.4 | This study |
| | Artificial substrate | Biological | 6.2 | This study |
| | Filtered water from aeration basin | Biological | 33.2 | This study |
| | Aldrich humic acids | Biological | 75.6 | This study |
| | Aldrich humic acids | Dialysis | 50-80 | [31] |
| | Natural humic substances | Biological | 20 - 49 | [12] |
| | Aquatic and sediment humic acids | Dialysis | 16-78 | [13] |
| | Nordic Reference fulvic acid | Dialysis | 25-60 | [32] |
| | Lake Kontiolampi (humic boreal lake) | Dialysis | 21-121 | [32] |
| | NDOM ^b from boreal lakes | Dialysis | 1-22 | [5] |
| | NDOM from Finland rivers and lake | Biological | 19.6-48.1 | [15] |
| | NDOM from Spanish rivers | Biological | 0.7-1.6 | [15] |
| Pyrene | Fresh algae extracts | <i>Biological</i> | 1.8 | This study |
| | Fanned algae extracts | Biological | 6.0 | This study |
| | Artificial substrate | Biological | 2,8 | This study |
| | Filtered water from aeration basin | Biological | 4.3 | This study |
| | Aldrich humic acids | Biological | 10.4 | This study |
| | Aldrich humic acids | FQ ^c | 11.9 | [33] |
| | Suwanee river humic acids | FQ ^c | 1.4-3.5 | [23] |
| | Suwanee river humic acids | Dialysis | 5.2-9.2 | [34] |
| | Natural humic substances | Biological | 1.2 - 6.3 | [12] |
| | HA from coal wastewater | SPME ^e | 2.5 | [35] |
| | Nordic Reference Fulvic Acid | Dialysis | 0.6-2.0 | [32] |
| | Lake Kontiolampi | Dialysis | 1.0-5.9 | [32] |
| | NDOM from Finland rivers and lake | Biological | 1.4-4.4 | [15] |
| | NDOM from Spanish rivers | Biological | 1.8-4.2 | [15] |
| | Fluor-anthene | <i>Aldrich humic acids</i> | <i>Biological</i> | 3.4 |
| Aldrich humic acids | | FQ ^e | 11.5 | [33] |
| humic acids from coal wastewater | | SPME ^e | 2.0 | [35] |

^a PAH: Polycyclic aromatic hydrocarbon; ^b NDOM: Natural dissolved organic matter; ^c FQ: Fluorescence quenching; ^d SPME: Solid-phase micro-extraction.

Table 3 :Dissolved organic carbon (DOC) K_{DOC} estimations: results from this study and from the literature

Influence of the DOM humic properties

A second source of variability for K_{DOC} may be the DOM source (also reported in Table 3). Indeed, organic matter is mainly composed of undefined substances although some macroscopic properties (hydrophobicity, biodegradability, etc.) can be identified. Kukkonen et al. [14] and Haitzer et al. [10] showed that K_{DOC} may greatly vary among DOM that have similar hydrophobic properties but different origins. However, our results with humic acids are in accordance with those summarized in Table 3. Moreover, we found larger partition coefficients with humic acids than with other DOM reported in Table 3. This result confirms the greater ability for humic substances to interact with PAH [2].

As shown on Figure 4, nonhumic DOM also significantly affected the bioaccumulation of PAH at moderate DOM concentrations. The $K_{DOC} (biol)$ we obtained for pyrene and BaP and these DOM are in the same order of magnitude as some natural DOM K_{DOC} such as DOM from Spanish rivers [15].

Influence of the DOM biodegradability

The artificial substrate was chosen for its similarity to domestic sewer effluents regarding biodegradability. It is more than 90% biodegradable and is mainly composed of proteins and sugars, and contains few lipids (the maximum concentration 30 mg/L DOC corresponds to only 0.23 mg/L of fats, that is less than 0.1 mg/L DOC). This substrate and its biodegradation product collected in the aeration basin were considered in this study as urban DOM models. Fresh algae extracts are also mainly composed of proteins. Algae extracts were used as a model for autochthonous DOM of ecosystems. They are also biodegradable, fanned algae extracts being more degraded DOM than fresh algae extracts. Humic substances were used as a model for refractory substances remaining after the biodegradation process, as confirmed by their negligible biodegradability.

The absorptivity of DOM was negatively related to its biodegradability. During the biodegradation process of organic matter, the most soluble and less aromatic substances are directly assimilated by bacteria, whereas complex macromolecules need first to be hydrolyzed to become bacterial substrates [18]. Small and non aromatic molecules disappear rapidly, and the residual organic material is enriched with refractory soluble microbial exudates from bacterial activity [28]. Thus, the remaining organic matter becomes more and more aromatic along the biodegradation process.

The binding capacity was demonstrated to increase with the aromaticity of DOM [5, 12, 24, 29, 30]. For each PAH, we also found that $K_{DOC} (biol)$ increased with the aromaticity of the DOM, expressed with ABS_{270} , (correlation coefficients between 0.88 and 1), although fanned algae extracts showed a surprisingly low absorptivity compared to their $K_{DOC} (biol)$. Our results also demonstrate that $K_{DOC} (biol)$ could be negatively related to the biodegradability of DOM. Binding capacities were lowest for highly degradable matters such as the artificial substrate of fresh algae extracts, intermediate for DOM from the aeration basin and fanned algae extracts, and largest for humic substances.

CONCLUSION

Using a convenient measurement protocol based on spectrofluorimetry, we were able to compare bioaccumulation of PAHs in *D. magna* exposed to different media. In the presence of dissolved organic matter from different origins, reductions of the bioconcentration could be observed in all experiments with the most hydrophobic PAHs. The estimated partition coefficients were in good agreement with those obtained earlier with other methods. The ability for nonhumic and nonstable substances to bind PAHs was demonstrated. A qualitative relation was found between the ability for DOM to interact with PAHs and Equation 1 its aromaticity, and Equation 2 its biodegradability.

Urban effluents (domestic or industrial wastewaters, treated effluents, sewer overflows, etc.) are a main vehicle for PAHs towards the aquatic ecosystem. They also convey high levels of non humic and degradable organic material and they can induce eutrophication and high concentrations of

DOM of planktonic origin. This study shows the need to consider such material to predict the fate of PAHs in receiving waters. Moreover, since urban effluents have been proved not to be stable [18,19], the partitioning and the bioavailability of PAHs may evolve with the biodegradation of discharged organic matter in the receiving waters. The methodology proposed here, combining a short-term exposure that allows to study nonstable materials and a simple spectrofluorimetric measurement, provides an interesting way to systematically study the effect of the degradation of organic matter on the bioavailability of PAHs during the naturally occurring mineralization of organic matter in rivers.

BIBLIOGRAPHY

1. Neff, JM. 1979. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons In The Aquatic Environment. Sources, Fates And Biological Effects*. Applied Sciences, London, UK.
2. Haitzer M, Höss S, Traunspurger W, Steinberg C. 1998. Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms – A review -. *Chemosphere* 37:1335-1362.
3. McCarthy JF. 1983. Role of particulate organic matter in decreasing accumulation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Daphnia magna*. *Arch Environ Contam Toxicol* 12:559-568.
4. Leverssee GJ, Landrum PF, Giesy JP, Fannin T. 1983. Humic acids reduce bioaccumulation of some polycyclic aromatic hydrocarbons. *Can J Aquat Sci* 40:63-69.
5. Kukkonen J and Oikari A. 1991. Bioavailability of organic pollutants in boreal waters with varying levels of dissolved organic material. *Water Res* 25:455-463.
6. Haitzer M, Akkanen J, Steinberg C, Kukkonen JVK. 2001. No enhancement in bioconcentrations of organic contaminants by low levels of DOM. *Chemosphere* 44, 165-171.
7. McCarthy LF, Jimenez BD. 1985. Reduction in bioavailability to bluegills of polycyclic aromatic hydrocarbons bound to dissolved humic material. *Environ Toxicol Chem* 4:511-521.
8. Freidig AP, Garicano E, Busser FJM. 1998. Estimating impact of humic acid on bioavailability and bioaccumulation of hydrophobic chemicals in guppies using kinetic solid-phase extraction. *Environ Toxicol Chem* 17:998-1004.
9. Landrum PF, Reinhold MD, Nihart SR, Eadie BJ. 1985. Predicting the bioavailability of organic xenobiotics to *Pontoreia hoyi* in the presence of humic and fulvic materials and natural dissolved organic matter. *Environ Toxicol Chem* 4:459-467.
10. Haitzer M, Burnison BK, Höss S, Traunspurger W, Steinberg C. 1999. Effects of quantity, quality, and contact time of dissolved organic matter on bioconcentration of benzo[a]pyrene in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ Toxicol Chem* 18:459-465.
11. Haitzer M, Höss S, Traunspurger W, Steinberg C. 1999. Relationship between concentration of dissolved organic matter (DOM) and the effect of DOM on the bioconcentration of benzo[a]pyrene. *Aquat Toxicol* 45:147-158.
12. Haitzer M, Abbt-Braun G, Traunspurger W, Steinberg C. 1999. Effects of humic substances on the bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons: Correlations with spectroscopic and chemical properties of humic substances. *Environ Toxicol Chem* 18:2782-2788.
13. De Paolis F and Kukkonen J. 1997. Binding of organic pollutants to humic and fulvic acids: Influence of pH and the structure of humic material. *Chemosphere* 34:1693-1704.

14. Kukkonen J, McCarthy JF, Oikari A. 1990. Effects of XAD-8 fractions of dissolved organic carbon on the sorption and bioavailability of organic micropollutants. *Arch Environ Contam Toxicol* 19:551-557.
15. Akkanen J, Penttinen S, Haitzer M, Kukkonen JVK. 2001. Bioavailability of atrazine, pyrene and benzo[a]pyrene in European river waters. *Chemosphere*. 45:453-462.
16. Namour Ph, Müller MC. 1998. Fractionation of organic matter from wastewater treatment plants before and after a 21-day biodegradability test: A physical-chemical method for measurement of the refractory part of affluent. *Water Res* 32:2224-2231.
17. Ma H, Allen HE, Yin Y. 2001. Characterization of isolated fractions of dissolved organic matter from natural waters and a wastewater effluent. *Water Res* 35:985-996.
18. Henze M. 1992. Characterization of wastewater for modelling of activated sludge processes. *Water Sci Technol* 25:1-15.
19. Tusseau-Vuillemin MH, Le Reveillé G. 2001. Le carbone organique biodégradable dans les eaux traitées des stations d'épuration du bassin de la Seine. *Ingénieries* 25:3-12.
20. Seidl M, Servais P, Mouchel JM. 1998. Organic matter transport and degradation in the river Seine (France) after a combined sewer overflow. *Water Res* 32:3569-3580.
21. Gourlay C, Miège C, Tusseau-Vuillemin MH, Mouchel JM, Garric J. 2002. The use of spectrofluorimetry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons bioaccumulation and biotransformation in *Daphnia magna*. *Polycycl Aromat Comp* 22:501-516
22. Pernelle JJ, Gaval G, Cotteux E, Duchène PH. 2001. Influence of transient substrate overloads on the proliferation of filamentous bacterial populations in an activated sludge pilot plant. *Water Res* 35:129-134.
23. Schlautman MA, and Morgan JJ. 1993. Effects of aqueous chemistry on the binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by dissolved organic materials. *Environ Sci Technol* 27:961-969.
24. Gauthier TD, Seitz WR, Grant CL. 1987. Effects of structural and compositional variations of dissolved humic materials on pyrene K_{OC} values. *Environ Sci Technol* 21:243-248.
25. Nikkilä A, Kukkonen JVK. 2001. Effects of dissolved organic material on binding and toxicokinetic of pyrene in the waterflea *Daphnia magna*. *Arch Environ Contam Toxicol* 40:333-338.
26. Schwarzenbach R, Gschwend P, Imboden DM. 1993. *Environmental Organic Chemistry*. John Wiley, New York, NY, USA.
27. Kukkonen J, Pellinen J. 1994. Binding of organic xenobiotics to dissolved organic macromolecules: Comparison of analytical methods. *Sci Total Environ* 152:19-29.
28. Dignac MF, Ginestet P, Ryabacki D, Bruchet A, Urbain V, Scribe P. 2000. Fate of wastewater organic pollution during activated sludge treatment: Nature of residual organic matter. *Water Res* 34:4185-4194.
29. McCarthy JF, Roberson LE, Burrus LW. 1989. Association of benzo[a]pyrene with dissolved organic matter: Prediction of K_{DOM} from structural and chemical properties of the organic matter. *Chemosphere* 19:1911-1920
30. Chin YP, Aiken GR, Danielsen KM. 1997. Binding of pyrene to aquatic and commercial humic substances: The role of molecular weight and aromaticity. *Environ Sci Technol* 31:1630-1635
31. McCarthy JF and Jimenez BD. 1985. Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons and dissolved humic material: Binding and dissociation. *Environ Sci Technol* 19:1072-1076.

32. Akkanen J, Kukkonen JVK. 2001. Effects of water hardness and dissolved organic material on bioavailability of selected organic chemicals. *Environ Toxicol Chem* 20:2303-2308.
33. Laor Y, Rebhun M. 1997. Complexation-Fluococulation: A new method to determine binding coefficients of organic contaminants to dissolved humic substances. *Environ Sci Technol* 31:3558-3564.
34. Granier LK, Lafrance P, Campbell PGC. 1999. An experimental design to probe the interactions of dissolved organic matter and xenobiotics: bioavailability of pyrene and 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl to *Daphnia magna*. *Chemosphere* 38:335-350.
35. Pörschmann J, Kopinke FD, Pawliszyn J. 1998. Solid-phase microextraction for determining the binding state of organic pollutants in contaminated water rich in humic organic matter. *J Chromatogr* 816:159-167.

ARTICLE 3

The ability of dissolved organic matter (DOM) to influence benzo[a]pyrene bioavailability increases with DOM biodegradation

(A paraitre dsan *Ecotoxicology and environmental Safety*)

Catherine GOURLAY^{*.1,2}, Marie-Hélène TUSSEAU-VUILLEMIN¹, Jean-Marie MOUCHEL²,
Jeanne GARRIC³

¹Cemagref, UR Hydrosystèmes et Bioprocédés, Parc de Tourvoie, BP 44, 92163 Antony cedex, France.

²Centre d'Enseignement et de Recherches Eau Ville Environnement, ENPC, Cité Descartes, 77455 Marne La Vallée cedex 02, France.

³Cemagref, 3b quai Chauveau, CP 220, 69336 Lyon cedex 9, France;

Abstract

The biodegradation of two substrates was monitored in reactors, along with the ability of dissolved organic matter (DOM) to influence benzo[a]pyrene bioavailability as DOM biodegradation progressed. Substrates were composed of algae extracts and an artificial substrate that mimics raw wastewater, which were considered as autochthonous and anthropogenic allochthonous models for DOM, respectively. The soluble microbial products formed during biomass activity were also studied. The aromaticity of DOM was investigated with specific ultra-violet absorbance. Partitioning coefficients between DOM and benzo[a]pyrene, $K_{DOC}(biol)$, were biologically determined by means of 4-hour bioaccumulation experiments on *Daphnia magna*.

Parent as well as degraded substrates always significantly reduced the bioaccumulation of benzo[a]pyrene at environmental DOM concentrations. Soluble microbial products also significantly affected the benzo[a]pyrene bioaccumulation. $K_{DOC}(biol)$ ranged between 2×10^4 and 4×10^5 L/kg. As the artificial wastewater biodegraded, DOM aromaticity increased, as did $K_{DOC}(biol)$. During the biodegradation of algae extract DOM, $K_{DOC}(biol)$ increased, whereas their aromaticity slightly decreased.

Key-words:

Dissolved organic matter, biodegradation, bioavailability, partitioning coefficient, K_{doc} , aromaticity, benzo[a]pyrene, *Daphnia magna*, bioconcentration, soluble microbial products.

1. INTRODUCTION

Organic matter plays a dominant role on many aspects of the aquatic environment. Its availability controls the bacterial loop in aquatic ecosystems and consequently affects most living organisms. It

also affects the fate and the bioavailability of micro-contaminants (Stumm and Morgan, 1981). In the water column, a large fraction of hydrophobic persistent organic pollutants (POPs) may bind to dissolved organic matter (DOM), which modifies their bioavailability to aquatic organisms (see review in Haitzer et al., 1998). Most studies report that the presence of DOM in the exposure media reduces the bioaccumulation of POPs in pelagic crustaceans (Leversee et al., 1983, Kukkonen and Oikari, 1991, Haitzer et al., 2001), in fishes (McCarthy and Jimenez, 1985a, Freidig et al., 1998) or in benthic organisms (Landrum et al., 1985, Haitzer et al., 1999a). The generally accepted assumption is that only the unbound fraction of contaminants (also referred to as the free fraction) is bioavailable to these organisms (Landrum et al., 1985).

The magnitude of the sorption of contaminants depends on the characteristics of DOM. Because of their high hydrophobicity, humic substances have a great ability to bind POPs (Kukkonen et al., 1990). Most published studies focus on the effect of humic substances or humic-rich natural waters on the bioavailability of POPs (Haitzer et al., 1998). However, recent studies showed that non-humic natural riverine DOM (with low aromaticity and low carboxylic content) could also affect the bioavailability of POPs (Akkanen et al., 2001) and also that highly biodegradable DOM was able to reduce the bioavailability of some polycyclic aromatic hydrocarbons (Gourlay et al., 2003).

Water bodies under anthropogenic influence contain high levels of non-humic allochthonous organic matter of urban origin from industrial or domestic effluents (Namour and Muller, 1998). Moreover, this organic matter may be subject to further changes in the medium. Tusseau-Vuillemin and Le Reveille (2001) found that 25–61% of DOM from wastewater treatment plant effluents was biodegradable. In the highly anthropized river Seine (France) area, 80% of DOM in combined sewer overflows and 40% of DOM in river water are biodegradable (Seidl et al., 1998). Since anthropogenic nutrient discharges may also enhance eutrophication, anthropized waters may also contain high levels of autochthonous biodegradable DOM of algal origin. Mean and Kirchmann (2001) measured that 68% of DOM produced during a phytoplanktonic bloom was biodegraded within 18 days. Not only can DOM impact on the bioavailability of POPs, but the progressive biodegradation of DOM is likely to modify the bioavailability of POPs again. However, no comprehensive study on the effect of the DOM present in anthropized waters on the bioavailability of POPs is available, although they carry the highest concentrations of micro-contaminants.

This study aimed to evaluate the ability of two types of DOM to influence the bioavailability of benzo[a]pyrene (BaP) and the changes in this influence as DOM is biodegraded. Two types of DOM were studied. Soluble microbial products (SMP), i.e. DOM formed by the bacterial activity during the substrate biodegradation, were also analysed for their relative importance in refractory DOM composition and their influence on the bioavailability of BaP.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Water, organic matter, chemicals and solvents.

A solution of 1 mg/L benzo[a]pyrene (BaP) in methanol was prepared in the laboratory from solid PAH powder (purity: 98%, Aldrich, Steinheim, France). A mixture of high-purity dichloromethane and methanol (4:1 v/v) (LiChroSolv, Merk Eurolab, Fontenay-sous-Bois, France) was used for the extraction of BaP in organisms.

Mineral water (Evian[®], Evian, France; pH: 7.2, dissolved solids: 309 mg/L, conductivity: 567 $\mu\text{S}/\text{cm}$, organic carbon <0.3 mgC/L) was used both for experiments and daphnid culture. Its composition is stable, with a neutral pH and a moderate mineralization.

Raw wastewater and activated sludge were sampled at the Noisy-Le-Grand (France) combined sewer treatment plant. Wastewater was filtered on a pre-combusted 0.7- μm glass-fibre filter (GF/F Whatmann[®], Kent, UK) and used within 4 hours after sampling. Activated sludge was kept under constant aeration until use.

Wastewater and river waters may have highly variable compositions and may contain some toxic compounds that render the biological experiments difficult. In order to obtain reproducible results, model substrates were used to evaluate the influence of DOM on BaP bioavailability. A commercially available mixture composed of meat and vegetal extracts and sugars (Viandox[®], Rueil Malmaison, France) was chosen for that purpose as a model for allochthonous anthropogenic DOM. It contains 42 g/L of carbohydrates, 173 g/L of proteins and 0.77 mg/L of fats (Pernelle et al., 2001). So-called artificial wastewater was prepared by diluting Viandox to 1% in mineral water. As a model for autochthonous DOM, a solution of algae extracts was prepared as follows: *Selenastrum capricornutum* were cultured, concentrated by decanting and autoclaved for 90 min at 120°C to accelerate cell lysis. The solution was filtered on a pre-combusted GF/F filter in order to preserve only the dissolved fraction. Both substrates were prepared the day of the experiment.

2.2. Biodegradation experiments

The biodegradation of each model substrate was monitored in a 6-L cylindrical, open reactor equipped with a mechanical stirrer. The temperature was controlled at 15°C. We put 4.5 litres of the initial DOM stock solution in the reactor, with a 4.5-ml activated sludge inoculum. The solution was regularly aerated in order to retain oxic conditions. The biodegradation process was monitored for approximately 15 days. We particularly focused on the first days, when biodegradation was the most rapid. Degrading solutions were regularly sampled and filtered on pre-combusted GF/F Whatmann filters. For each sample, the dissolved organic carbon concentration (DOC) and the particulate organic carbon concentration (POC) were measured using a Carbon Analyzer (O.I. Analytical, College Station, TX, USA). The absorbance at 254 nm (A_{254}) of the filtrate was measured using a spectrophotometer (Lambda 11 Perkin-Elmer, Courtabeuf, France) and the specific ultra-violet absorbance ($\text{SUVA} = A_{254}/\text{DOC}$ in $\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{L}$) was calculated. Other aliquots were periodically sampled, filtered and used to test the influence of DOM on the bioaccumulation of BaP by daphnids, as described below.

In order to validate the use of Viandox[®] as a model for an artificial wastewater, the biodegradation of the real wastewater sample was also monitored under the same conditions. DOC, POC and SUVA were regularly measured for 22 days.

2.3. Soluble microbial product experiments

Soluble microbial products (SMP) released into the solution from biomass activity and decay were produced as suggested by Hejzlar and Chudoba (1986): 4 L of a glucose solution (685 mg/L DOC)

was prepared in mineral water with additional nutrients and 10 mL of activated sludge. Its biodegradation at 15°C was monitored under oxic conditions. Biomass activity in the batch (data not presented) showed that the glucose biodegradation was very fast and completed during the first 3 days. Since glucose is totally degradable, the dissolved fraction of DOM after 4 days was only composed of newly formed SMPs, as observed by Hezjlar and Chudoba (1986). The 4th day, the solution was filtered and analysed for its DOC, SUVA and tested for its influence on the bioaccumulation of BaP.

2.4. Bioaccumulation experiments

The influence of the DOM on the bioavailability of BaP was measured following the method detailed in Gourlay et al. (2003). Bioaccumulation experiments were performed using 5- to 7-day-old daphnids (*D. magna*). One hour before exposure, the organisms were moved into clean mineral water in order to clear their gut. DOC was measured in the stock solution just before the experiment. Five or six exposure solutions were prepared by diluting the DOM solution in mineral water to a final volume of 300 mL. DOM concentrations in exposure media ranged from 0 to 30 mg/L DOC, which is within the range of DOM concentrations in urban effluents or polluted rivers (Tusseau-Vuillemin and Le Réveillé, 2001). An additional solution was prepared with no DOM. The solutions were next spiked with 300 µL of the BaP solution, to a final nominal concentration of 1 µg/L. Exposure solutions were left to equilibrate for 1 hour before introducing the organisms. This duration was shown to be sufficient to allow interactions between BaP and DOM (McCarthy and Jimenez, 1985b, Schlautman and Morgan, 1993, Krop et al., 2001). Thirty daphnids were exposed to each of the solutions for 4 hours at room temperature in the dark.

After exposure, organisms were removed and gently rinsed with milli-Q water. Two samples of 15 organisms were put in two glass tubes with 4 mL of organic solvent. Samples were sonicated for 1 min. The tubes were then stored in the dark at 4°C until analysis. The samples were filtered on a GF/F filter and put in a 1-cm quartz cuvette for fluorescence analysis of the daphnid extract. We previously verified that no significant BaP was retained in the filter.

BaP content in daphnid extract was measured by spectrofluorimetry (Gourlay et al., 2002). The emission fluorescence spectrum of the extract was recorded between 350 and 500 nm. Excitation wavelengths were set to 265 nm. Fluorescence measurements were performed at room temperature. The intensities of the measured peaks were corrected for baseline by subtracting the minimum fluorescence intensity at the left of the peak. Gourlay et al. (2002) showed that the BaP concentration in daphnids could be linearly related to the fluorescence intensity of daphnid extract at 407 nm (F_{407}) and 417 nm (F_{417}).

One control blank solution was prepared with DOM and daphnids only. DOC measured at the beginning and at the end of the exposure did not significantly evolve during the 5-hour experiment. No fluorescence was measured on the extracts of daphnids exposed in the control blank solution.

For two experiments, the BaP concentrations in the beakers were measured by spectrofluorimetry after exposure using liquid-liquid extraction in dichloromethane. We verified that, although lower than the nominal initial concentration, BaP concentration was constant among the beakers, whatever the presence and the concentration of DOM ($[\text{BaP}]_{\text{water}} = 0.61 \pm 0.07 \mu\text{g/L}$, $n = 6$ and $[\text{BaP}]_{\text{water}} = 0.59 \pm 0.06 \mu\text{g/L}$, $n = 6$).

2.5. Data processing

The processing of biodegradation was scaled with reference to a biodegradation index f_{ref} ranging from 0 to 1. f_{ref} was computed as the ratio between the final and the current DOC concentration ($DOC(t_f)$ and $DOC(t)$, respectively): $f_{ref} = DOC(t_f)/DOC(t)$. Practically, f_{ref} gives an estimation of the refractory DOM fraction in the total DOM and increases up to 1 at the end of the biodegradation experiment, when all the remaining DOM is supposed to be refractory.

From bioaccumulation experiments, partitioning coefficients between DOM and BaP, $K_{DOC}(biol)$ were determined. We verified that the ratio F_{417}/F_{407} was constant within each series of experiments (Gourlay et al., 2003). The relative effect of DOM on PAH bioaccumulation was estimated with the ratio F/F_0 , F_0 being the average F_{407} in the two pseudo-replicates of daphnid extracts exposed to BaP only and F being F_{407} in daphnid extract exposed to BaP and DOM.

The reduction of bioaccumulation in the presence of DOM can be explained by the formation of DOM–BaP complexes that are too large and too polar to cross biological membranes (Landrum et al., 1985). Therefore, the bioaccumulation in the presence of DOM can be related to the bioavailable fraction of PAHs, which is referred to as the freely dissolved fraction of PAHs in the solution. A carbon-normalised partition coefficient K_{DOC} is commonly used to estimate the free PAH concentration, which leads to the following expression relating the bioavailable fraction to DOC (Gourlay et al., 2003):

$$\frac{F}{F_0} = \frac{1}{1 + K_{DOC}[DOC]} \quad (1)$$

From Equation (1), a biologically determined partitioning coefficient $K_{DOC}(biol)$ could be estimated from non-linear regression of F/F_0 against DOC data points (XLStat[®] software). $K_{DOC}(biol)$ measures the ability of DOM to influence and reduce the bioavailability of BaP to daphnids.

3. RESULTS

3.1. Changes in organic matter concentrations in the reactors

The changes in particulate and dissolved organic carbon in the batch during the biodegradation of the model substrates and the real wastewater are displayed on Figure 1. All substrates were highly degradable: after 15 days, 76% of the start algal extracts and 90% of the artificial wastewater were biodegraded. After 22 days, 83% of the real wastewater was biodegraded. More than 60% of initial DOM disappeared in less than 2.2 days in the three experiments. According to Billen and Servais (1989), this fast biodegradation corresponds to the digestion of easily degradable molecules of the substrate by bacteria. Concurrently, we observed an increase in particulate organic carbon corresponding to newly formed biomass. Then the biodegradation process of DOM slowed down and particulate organic matter concentrations decreased, because of biomass mortality and degradation. The formation and then the degradation of the microbial biomass during the biodegradation of the substrates indicates that SMPs are very likely to be present in the remaining DOM.

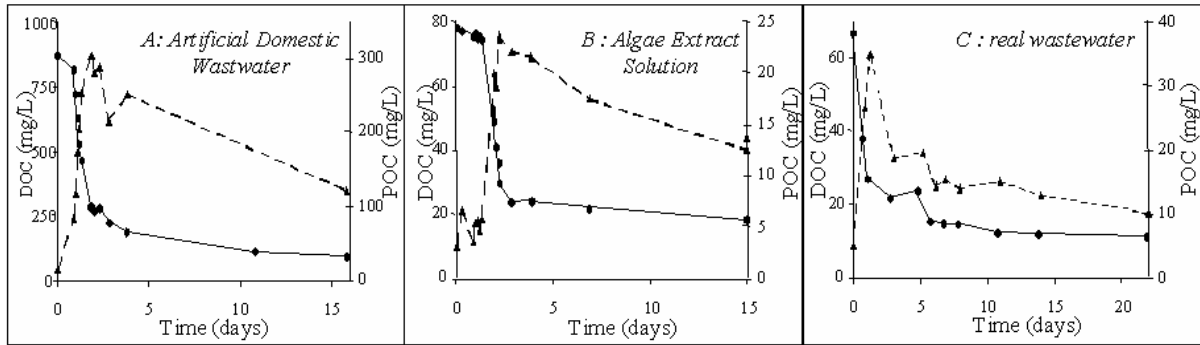


Figure 1: Particular (dotted line, POC) and dissolved (continuous line, DOC) organic carbon concentration (mg C/L) changes during the biodegradation of the three substrates.

SMPs formed by the total biodegradation of glucose accounted for 36.3 mg/L DOC, which represents 5% of the initial DOC content. This result is in agreement with Shin and Kang (2003), who observed that SMPs from activated sludge fed with glucose were 4% of the initial DOC content. Since SMP production follows complex kinetics depending on the substrate and the type of microorganisms (Lapidou and Rittman, 2002), it is difficult to precisely assess the fraction of SMPs that is present in the reactor during the substrate degradation. However, a crude estimation can be obtained assuming that the concentration of SMPs ($DOC_{SMP}(t)$) amounts to 5% of DOC decrease, as found in the glucose degradation experiment:

$$DOC_{SMP}(t) = 0.05 (DOC(0) - DOC(t)) \quad (2)$$

The DOC balance during a biodegradation process includes three terms : a constant non-degradable (over the time scale considered in the experiments) DOC pool, losses from of a degradable DOC pool, and new production of a smaller amount of non-degradable SMP pool. Our data suggest that SMPs would represent 50%, 25% and 16% of the remaining DOM at the end of the biodegradation of the artificial wastewater, the real wastewater and the algae extracts, respectively.

3.2. Changes in DOM aromaticity

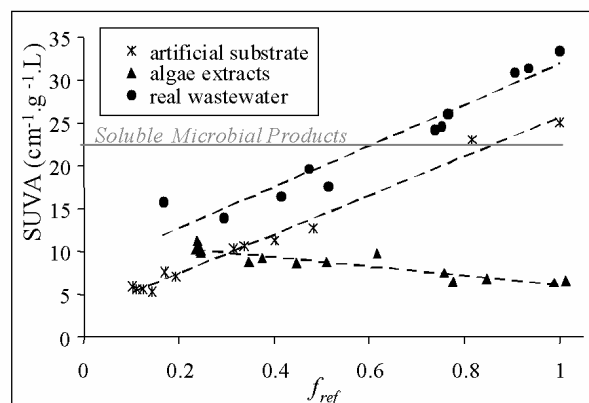


Figure 2: Changes in the specific UV absorbance at 254 nm (SUVA, in $\text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{L}$) during the biodegradation of the artificial domestic wastewater (crosses), the real wastewater (circles) and algae extracts (triangles). The SUVA value of soluble microbial products is also reported.

Figure 2 shows the 254-nm specific ultra-violet absorbance (SUVA) of degrading DOM plotted against the biodegradation index. According to Traina et al. (1990), the specific absorbance at 240–280 nm can be considered as an indicator of the aromaticity of DOM. Initially, the three substrates displayed very low SUVA, compared to natural humic substances (for example $SUVA = 27\text{--}62 \text{ cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{L}$ for various humic substances, Haitzer et al., 1999c). The aromaticity of the artificial wastewater DOM increased during the biodegradation, whereas the aromaticity of algae extract DOM exhibited a slight decrease. Real wastewater aromaticity evolved similarly to artificial wastewater, the real wastewater having a higher SUVA. The similarity of POC, DOC and SUVA changes with the biodegradation of the artificial and the real wastewater allows us to validate the use of the artificial substrate as a model for domestic wastewater.

The SUVA value measured on the SMP sample is reported on Figure 2 ($SUVA_{SMP} = 22.5 \text{ cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{L}$). It compares well with data obtained by Shin and Kang (2003), who measured SMP SUVA obtained from glucose degradation between 17 and $19 \text{ cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{L}$.

3.3. Changes in DOM influence BaP bioavailability

All the tested types of DOM significantly reduced the bioaccumulation of BaP in daphnids at the tested concentrations (0–30 mg/L DOC). The effect of DOM from the artificial wastewater and from algae on the bioaccumulation of BaP at four different biodegradation times is displayed on Figure 3A and 3B. For each DOM solution, the relative bioaccumulations of BaP by daphnids (F/F_0) in the presence of increasing amounts of DOM are plotted, as well as the regression curve following Equation 1. The specific effect of DOM increases as biodegradation progresses. As an example, 32 mg/L DOC from fresh algae extracts are necessary to obtain a 50% bioaccumulation reduction, whereas the same effect is obtained with only 3.5 mg/L DOC of 15-day degraded algae extracts. Similarly, 16-mg/L DOC from the 0.8day degraded artificial substrate gives the same 50% effect on BaP bioaccumulation as 2.8-mg/L DOC from the 16- day degraded substrate. The bioaccumulation of BaP was reduced by 50% in the presence of 4.3 mg/L DOC from SMPs.

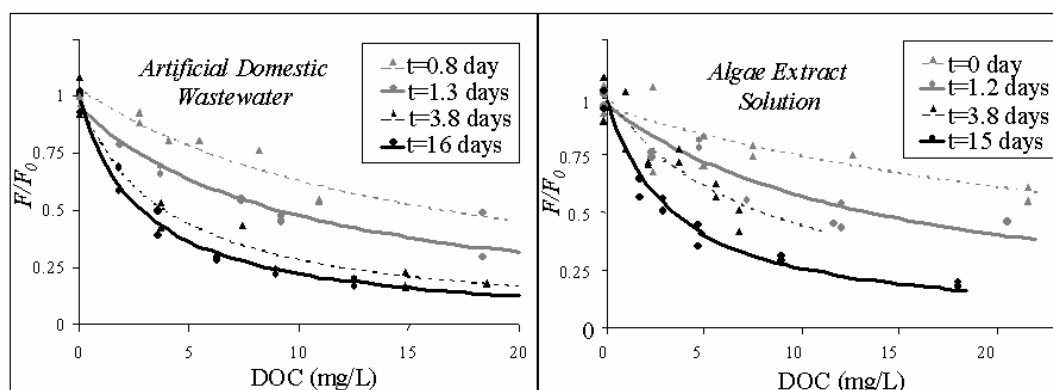


Figure 3: Relative bioaccumulation of benzo[a]pyrene in daphnids (F/F_0) in the presence of organic matter from artificial wastewater and algae extracts, at different biodegradation times, from the initial substrate to a 16-day biodegraded solution, as a function of organic carbon concentration (DOC, mg/L)

A biologically determined partitioning coefficient $K_{DOC}(biol)$ could be estimated for all the bioaccumulation experiments. Figure 4 shows the changes in $K_{DOC}(biol)$ along with the biodegradation of allochthonous or autochthonous DOM. For both substrates, the partitioning coefficient increases as DOM is more biodegraded. $K_{DOC}(biol)$ varies between 2×10^4 and 30×10^4 L/kg for DOM from algae and between 6×10^4 and 36×10^4 L/kg for DOM from the degrading artificial wastewater. The $K_{DOC}(biol)$ estimated for SMPs ($24.8 (\pm 3.5) \times 10^4$ L/kg) is also reported on Figure 4.

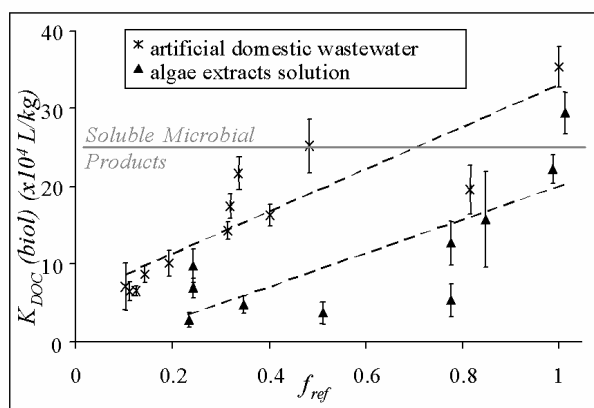


Figure 4: Changes in the biologically determined partition coefficients between dissolved organic matter and benzo[a]pyrene ($K_{DOC}(biol)$, in L/kg) during the biodegradation of the artificial domestic wastewater (crosses) and algae extracts (triangles) substrates. The $K_{DOC}(biol)$ value of soluble microbial products is also reported.

4. DISCUSSION

4.1. Validity of $K_{DOC}(biol)$ estimation and comparison with natural DOM

A very similar technique was used by Haitzer et al. (1999a, 1999b) to estimate K_{DOC} the bioaccumulation measurement performed after 48 hours of exposure, when equilibrium between the organisms and the media was achieved. Since the DOM samples studied here are biodegradable, they may evolve during the exposure. Our experimental protocol had to be as short as possible, which is why we did not measure the bioaccumulation at steady-state. However, Gourlay et al. (2003) have shown that short-term and steady-state exposure experiments lead to the same estimation of $K_{DOC}(biol)$, under a generally accepted first-order toxico-kinetic hypothesis. Consequently, we assume that $K_{DOC}(biol)$ from this study and $K_{DOC}(biol)$ obtained from the method by Haitzer et al. (1999a) are comparable. Moreover, Akkanen and Kukkonen (2003) showed that the equilibrium dialysis method and the biological methods were in good agreement for the estimation of K_{DOC} . Consequently, K_{DOC} values from this study were also compared to those obtained with the equilibrium dialysis technique. The partitioning coefficients obtained in this study with artificial non-refractory DOM are on the same order of magnitude as the DOM partitioning coefficients from European rivers estimated with the equilibrium dialysis technique ($0.7\text{--}24 \times 10^4$ L/kg, Akkanen et al., 2001). Although slightly lower, they are also on the same order of magnitude as the K_{DOC} estimated with the biological technique for

natural stable humic substances ($20\text{--}49 \times 10^4$ L/kg, Haitzer et al., 1999b). Our data show that biodegradable or recently stabilised DOM may have an effect comparable to long-term stable DOM as humic substances.

4.2. How does DOM biodegradation affect BaP bioavailability?

The SUVA of the artificial wastewater DOM increased during the biodegradation process. The molecular composition of the artificial wastewater is complex, with mainly non-aromatic, hydrosoluble sugars and proteins, leading to a low global SUVA. It may also contain some aromatic compounds. During the biodegradation process, the smallest and most easily hydrolysable molecules are quickly assimilated by bacteria, whereas complex macromolecules, and particularly aromatic molecules, are less easily degraded (Henze, 1992). Thus, the proportion of aromatic compounds increases while other compounds are degraded, which leads to a global increase in the aromaticity of DOM. The same phenomenon occurs during the biodegradation process of the real wastewater effluent, as SUVA also increased. Indeed, the increase in the aromaticity of DOM during the biodegradation of wastewater was previously observed: Dignac (1998) found that the SUVA of raw and treated wastewater DOM were, respectively, 9 and 23 $\text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{L}$ and that they contained 7% and 32% of aromatic compounds, respectively. Imai et al. (2001, 2002) found that the specific absorbance at 260 nm of a raw domestic wastewater DOM sample was lower (approximately 6 $\text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{L}$) than measured in treated wastewaters from several sewer treatment plants (11–19 $\text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{L}$). In the experiment with the artificial wastewater, we found a positive correlation between the binding capacity of DOM with BaP, $K_{DOC}(\text{biol})$, and aromaticity (correlation coefficient: 0.85), as previously observed in most studies on natural DOM (McCarthy et al., 1989, Kukkonen and Oikari, 1991, Akkanen et al., 2001) and humic substances (Haitzer et al., 1999c). Interactions between DOM and hydrophobic organic compounds are primarily hydrophobic interactions (Schwarzenbach et al., 1993). Therefore, the increasing presence of aromatic structures that form hydrophobic sites in DOM may explain the increase in the affinity of DOM for hydrophobic compounds.

However, an anti-correlation was obtained (poor correlation coefficient: -0.55) between SUVA and $K_{DOC}(\text{biol})$ in experiments with algal extracts: the more degraded the algae extracts, the more they bind BaP and the less aromatic they appear. The very low SUVA of autochthonous fresh or degraded DOM was previously observed. Fukushima et al. (1996) found that the 260-nm specific absorbance of DOM of aquatic origin produced in a lab pond was 12 ± 4 $\text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{L}$ and did not significantly evolve with DOM biodegradation on a sand filter. Despite their low aromaticity, algae DOM strongly influence the bioaccumulation of BaP, which means that algal extract DOM contains some hydrophobic sites for BaP binding. Some refractory substances, called algaenans, have already been isolated from algae residues (Allard et al., 1998). Algaenans are a component of microalgae cell walls and are defined as non-hydrolysable, poorly soluble biopolymers. They are composed of long aliphatic chains (Derenne et al., 1992), which should form hydrophobic sites and bind hydrophobic contaminants. Since algaenans are also highly refractory to biodegradation (Allard et al., 1998), their proportion in the degraded algal solution may increase during biodegradation, leading to a global increase in the binding capacity of DOM with BaP.

Although the aromatic structures within DOM cycles may favour the binding of POPs onto organic matter, the data presented here show that SUVA is not a good indicator of the binding potential of

model organic matter mixture for POPs. However, the proportion of refractory residual hydrophobic compounds appears to be a common process, explaining the increased affinity for BaP during biodegradation.

As the degradation progressed, the relative proportion of SMP increases. Therefore, the increase in $K_{DOC}(biol)$ during the biodegradation process may also be due to the increasing presence of SMPs in the solution. SMPs were proved to significantly influence the bioavailability of BaP at low concentrations ($K_{DOC}(biol) = 24.8 \times 10^4 \pm 3.5 \times 10^4$ L/kg). They contain some aromatic structures, as revealed by their high SUVA. They are also composed of large macromolecules; 73% of SMPs have a molecular weight over 10 kD (Shin and Kang, 2003). These characteristics may explain the high propensity of SMPs to bind BaP (Chin et al., 1997).

4.3. Fractionation of DOM into biodegradability classes: relevance of aromaticity and binding capacity

In the reactor, the DOM solution ($DOC(t)$) can be theoretically fractionated into biodegradable compounds ($DOC_{biodeg}(t)$), initial present refractory compounds (DOC_{ref}) and SMPs produced during the biodegradation process ($DOC_{SMP}(t)$). In the following, we postulate that each fraction can be characterised by a specific SUVA ($SUVA_{biodeg}$, $SUVA_{ref}$ and $SUVA_{SMP}$ respectively) and a specific binding capacity ($K_{DOC, biodeg}$, $K_{DOC, ref}$ and $K_{DOC, SMP}$ respectively). Consequently, the 254-nm absorption of the global solution will be given by:

$$SUVA(t).DOC(t) = SUVA_{biodeg} DOC_{biodeg}(t) + SUVA_{ref} DOC_{ref} + SUVA_{SMP} DOC_{SMP}(t) \quad (3)$$

Equation 3 can be rewritten as a linear function of $SUVA(t)$ against f_{ref} (see details in Appendix):

$$SUVA(t) = SUVA_{biodeg} 1.05[1 - f_{ref}] + SUVA_{ref} [1.05 - 0.05 DOC(0)/DOC(t)] f_{ref} + SUVA_{SMP} 0.05[DOC(0)/DOC(t) f_{ref} - 1] \quad (4)$$

For each DOM origin, $SUVA_{biodeg}$ and $SUVA_{ref}$ were estimated from linear regressions of $SUVA(t)$ against f_{ref} . Regression curves are shown on Figure 2. The measured value for $SUVA_{SMP}$ was an input of the regression. Results are displayed in Table 1, showing the relatively low aromaticity of biodegradable compounds, whatever their origin ($SUVA_{biodeg} < 13$ cm⁻¹.g⁻¹.L). Refractory initial molecules of the artificial and the real wastewater effluent are more aromatic than SMPs. On the contrary, the refractory initial molecules from algae extracts have a very low SUVA. This finding supports the importance of aliphatic molecules in the refractory algae extracts.

It should be underlined that this estimation only gives an order of magnitude of the aromatic characteristics of the substrates. It is based on the assumption of a unique SUVA for each DOM, although they may be composed of highly varied molecules. Satisfying determination coefficients ($r^2 > 0.85$) and significant parameters (t -test, $p < 0.01$) were obtained for the three regressions, which tends to corroborate this assumption. We also assumed that the $SUVA_{SMP}$ value measured from glucose degradation could represent the SUVA of SMPs formed during any other substrate degradation.

| | R^2, n^a | $SUVA_{biodeg}^b$ | $SUVA_{ref}^b$ |
|--------------------------------|------------|-------------------|----------------|
| Algae extract solution | 0.86, 17 | 12.0 ± 0.3 | 2.9 ± 1.1 |
| Artificial domestic wastewater | 0.99, 12 | 3.8 ± 0.4 | 25.8 ± 1.3 |
| Real wastewater | 0.83, 12 | 9.9 ± 1.9 | 32.7 ± 6.7 |

^a R^2, n : determination coefficient and number of points in the linear regression.

^b standard deviations are calculated from those of the linear regression estimators.

Table 1: Estimated specific ultra-violet absorbance for biodegradable ($SUVA_{biodeg}$) and refractory ($SUVA_{ref}$) dissolved organic matter in $cm^{-1}.g^{-1}.L$ (\pm standard deviations)

The same linear equation theoretically links $K_{DOC}(t).DOC(t)$ and $DOC(t)$, since the partitioning coefficient K_{DOC} between BaP and DOM follows the relationship:

$$K_{DOC}(t) \cdot DOC(t) = K_{DOC_{biodeg}} \cdot DOC_{biodeg}(t) + K_{DOC_{ref}} \cdot DOC_{ref} + K_{DOC_{SMP}} \cdot DOC_{SMP}(t) \quad (5)$$

Consequently, $K_{DOC_{biodeg}}$ and $K_{DOC_{ref}}$ were estimated in the same way. Results are displayed in Table 2 and regression curves are reported on Figure 4.

A significant estimation was obtained from the regression with data from the artificial substrate experiment (t -test, $p < 0.01$). Biodegradable as well as refractory compounds from the artificial substrate have a significant influence on the binding of BaP. $K_{DOC_{ref}}$ values obtained for refractory compounds are similar to those of natural humic substances (Kukkonen et al., 1990, Haitzer et al., 1999) and are higher than measured $K_{DOC_{SMP}}$. For DOM of algal origin, we were not able to obtain significant K_{DOC} values for DOM fractions. This shows that the assumption of a single binding capacity for each DOM biodegradability class may not always be a relevant model for the estimation of the global binding capacity of a degrading DOM. However, more studies are needed in order to bring out the relevance of biogeochemical fractionation of DOM to estimate its binding capacity for organic micropollutants.

| | R^2, n^a | $K_{DOC_{biodeg}}^b$ | $K_{DOC_{ref}}^b$ |
|--------------------------------|------------|----------------------|-------------------|
| Algae extract solution | 0.61, 10 | $-0.3 \pm 3.9^*$ | $19.8 \pm 12.3^*$ |
| Artificial domestic wastewater | 0.78, 12 | 6.8 ± 2.0 | 41.6 ± 11.7 |

^a R^2, n : determination coefficient and number of points in the linear regression.

^b standard deviations are calculated from those of the linear regression estimators.

*: values obtained from non-significant parameter estimators (t -test, $p > 0.05$)

Table 2: Estimated partitioning coefficients for biodegradable ($K_{DOC_{biodeg}} \times 10^4 L/kg$) and refractory ($K_{DOC_{ref}} \times 10^4 L/kg$) dissolved organic matter (\pm standard deviation).

5. CONCLUSION

We monitored the biodegradation of two different substrates and evaluated the changes in aromaticity and influence on the bioavailability of benzo[a]pyrene. Both substrates were chosen as model mixtures for allochthonous and autochthonous DOM found in anthropized ecosystems. Both substrates were highly biodegradable and significantly affected BaP bioavailability. The more degraded

they were, the higher their K_{DOC} values were. This is explained by the fact (1) that refractory compounds have a high binding capacity, whereas labile biodegradable DOM has a weaker effect and (2) that, during the biodegradation of labile DOM, the pool of DOM is enriched by SMPs that highly affect BaP bioavailability.

We observed that refractory algae components as well as degraded artificial wastewater DOM decreased the bioavailability of BaP by 50% at DOM concentrations lower than 4 mg/L DOC, which is in the range of DOM concentrations in river waters. Conversely, initial non-degraded products had a much lower influence on the bioavailability of BaP. This study confirms the need to consider such types of DOM in addition to more widely studied humic substances when estimating the bioavailability of organic pollutants in surface freshwaters.

Urban discharges increase DOM concentrations in rivers, either of autochthonous (algal blooms triggered by nutrient discharges) or allochthonous origin (organic matter from sewer treatment plants, stormwater or sewer overflows). While persistent organic pollutants are only slightly degraded by the aquatic microorganisms, the transformation of DOM inside the microbial food web will likely greatly modify the bioavailability of POPs. This study points out the need to consider the dynamics of biodegradable DOM when evaluating the bioavailability of organic pollutants.

6. APPENDIX

Mathematical expressions of DOM biodegradability fractions

In the reactor, at any time t , the DOM content can be expressed as the sum of biodegradable and refractory compounds and some SMPs:

$$DOC(t) = DOC_{biodeg}(t) + DOC_{ref} + DOC_{SMP}(t) \quad (a)$$

At the end of the experiment (t_f), only refractory compounds and SMPs remain in the solution.

$$DOC_{ref} = DOC(t_f) - DOC_{SMP}(t_f) \quad (b)$$

Since DOC_{SMP} can be approximated by $DOC_{SMP}(t) = 0.05 (DOC(0) - DOC(t))$ (Equation 2), DOC_{ref} can be written as:

$$\begin{aligned} DOC_{ref} &= DOC(t_f) - 0.05 [DOC(0) - DOC(t_f)] \\ DOC_{ref} &= 1.05 DOC(t_f) - 0.05 DOC(0) \end{aligned} \quad (c)$$

The biodegradable compounds can be expressed as a function of $DOC(t)$ (Equation a). :

$$DOC_{biodeg}(t) = DOC(t) - DOC_{ref} - DOC_{SMP}(t) \quad (d)$$

Using the estimation of $DOC_{SMP}(t)$ (Equation 2) and DOC_{ref} (Equation c)

$$\begin{aligned} DOC_{biodeg}(t) &= DOC(t) - 1.05 [DOC(t_f) - 0.05 DOC(0)] - 0.05 [DOC(0) - DOC(t)] \\ DOC_{biodeg}(t) &= 1.05 (DOC(t) - DOC(t_f)) \end{aligned} \quad (e)$$

Finally, the Equation 3 can be rewritten as:

$$\begin{aligned} SUVA(t).DOC(t) &= SUVA_{biodeg} 1.05 [DOC(t) - DOC(t_f)] \\ &+ SUVA_{ref} [1.05 DOC(t_f) - 0.05 DOC(0)] \\ &+ SUVA_{SMP} 0.05 [DOC(0) - DOC(t)] \end{aligned} \quad (f)$$

Equation g is obtained when dividing Equation f by $DOC(t)$ and using the definition of f_{ref} :

$$\begin{aligned} SUVA(t) &= SUVA_{biodeg} 1.05 [1 - f_{ref}] \\ &+ SUVA_{ref} [1.05 f_{ref} - 0.05 DOC(0)/DOC(t) f_{ref}] \\ &+ SUVA_{SMP} 0.05 [DOC(0)/DOC(t) f_{ref} - 1] \end{aligned} \quad (g)$$

REFERENCES

- Akkanen J, Penttinen S, Haitzer M, Kukkonen JVK. 2001. Bioavailability of atrazine, pyrene and benzo[a]pyrene in European river waters. *Chemosphere* 45, 453-462
- Akkanen J., Kukkonen J.V.K. 2003. Measuring the bioavailability of two hydrophobic organic compounds in the presence of dissolved organic matter. *Env. Toxicol. Chem.* 22, 518-524
- Allard B, Templier J, Largeau C. 1998. An improved method for the isolation of artifact-free algaenans from microalgae. *Org. Geochem.* 28, 543-548
- Billen G. and Servais P. 1989. Modélisation des processus de dégradation de la matière organique en milieu aquatique. In Bianchi M. et al., (Eds), *Micro-organismes dans les écosystèmes océaniques*. Masson, Paris, France, pp. 219-245.
- Chin Y.-P., Aiken G. R. Danielsen K. M. 1997. Binding of pyrene and commercial humic substances: the role of molecular weight and aromaticity. *Environ. Sci. Technol.* 31, 1630-1635
- Derenne S., Largeau C., Berkloff C., Rousseau B., Wilhelm C., Hatcher P.G. 1992. Non-hydrolosable macromolecular constituents from outer walls of *Chlorella fusca* and *Nanochlorum eucaryotum*. *Phytochem.* 31, 1923-1929
- Dignac M.F. 1998. Caractérisation chimique de la matières organique au cours du traitement des eaux usées par boues activées. Ph.D thesis. Paris VI University, France.
- Freidig AP, Garicano E, Busser FJM. 1998. Estimating impact of humic acid on bioavailability and bioaccumulation of hydrophobic chemicals in guppies using kinetic solid-phase extraction. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 998-1004
- Fukushima T, Chul J Imai A, Matsushige K. 1996. Dissolved organic carbon in a eutrophic lake; dynamics, biodegradability and origin. *Aquatic Sciences* 58, 139-157
- Gourlay C, Miège C, Tusseau-Vuillemin MH, Mouchel JM, Garric J. 2002. The use of spectrofluorimetry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons bioaccumulation and biotransformation in *Daphnia magna*. *Polycyclic Arom. Comp.* 22, 501-516
- Gourlay C, Tusseau-Vuillemin MH, Garric J, Mouchel JM. 2003. Effect of dissolved organic matter of various origins on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 1288-1294
- Haitzer M, Akkanen J, Steinberg C, Kukkonen JVK. 2001. No enhancement in bioconcentrations of organic contaminants by low levels of DOM. *Chemosphere* 44, 165-171.
- Haitzer M, Höss S, Traunspurger W, Steinberg C. 1998. Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms - A review. *Chemosphere* 37, 1335-1362.
- Haitzer M, Höss S, Traunspurger W, Steinberg C. 1999a. Relationship between concentration of dissolved organic matter (DOM) and the effect of DOM on the bioconcentration of benzo[a]pyrene. *Aquat. Toxicol.* 45, 147-158
- Haitzer M, Burnison BK, Höss S, Traunspurger W, Steinberg C. 1999b. Effects of quantity, quality, and contact time of dissolved organic matter on bioconcentration of benzo[a]pyrene in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 459-465
- Haitzer M, Abbt-Braun G, Traunspurger W, Steinberg C. 1999c. Effects of humic substances on the bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons : correlations with spectroscopic and chemical properties of humic substances. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2782-2788.

- Hejzlar J. and Chudoba J. 1986. Microbial polymers in the aquatic environment. I - production by activated sludge microorganisms under different conditions. *Water Res.* 20, 1209-1216
- Henze M. 1992. Characterization of wastewater for modelling of activated sludge processes. *Water Sci. Technol.* 25, 1-15.
- Imai, T. Fukushima, K. Matsushige, Y-H Kim, 2001. Fractionation and characterization of dissolved organic matter in a shallow eutrophic lake, its inflowing rivers and other organic matter sources. *Water Res.* 35, 4019-4028
- Imai, T. Fukushima, K. Matsushige, Y-H Kim, K Choi, 2002. Characterization of dissolved organic matter in effluents from wastewater treatment plants *Water Res.* 36, 859-870
- Krop H.B., Van Noort P.C.M., Govers H.A.J. 2001. Determination and theoretical aspects of the equilibrium between dissolved organic matter and hydrophobic organic micropollutants in water (Kdoc). *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 169, 1-122
- Kukkonen J and Oikari A. 1991. Bioavailability of organic pollutants in boreal waters with varying levels of dissolved organic material. *Water Res.* 25, 455-463.
- Kukkonen J, McCarthy JF, Oikari A. 1990. Effects of XAD-8 fractions of dissolved organic carbon on the sorption and bioavailability of organic micropollutants. *Arch Environ. Contam. Toxicol.* 19, 551-557
- Landrum PF, Reinhold MD, Nihart SR, Eadie BJ. 1985. Predicting the bioavailability of organic xenobiotics to *Pontoreia hoyi* in the presence of humic and fulvic materials and natural dissolved organic matter. *Environ. Toxicol. Chem.* 4, 459-467
- Lapidou C.S. and Rittmann B.E. 2002. A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Res.* 36, 2711-2720
- Leversee GJ, Landrum PF, Giesy JP, Fannin T. 1983. Humic acids reduce bioaccumulation of some polycyclic aromatic hydrocarbons. *Can. J. Aquat. Sci.* 40, 63-69.
- McCarthy JF, Jimenez BD. 1985a. Reduction in bioavailability to bluegills of polycyclic aromatic hydrocarbons bound to dissolved humic material. *Environ. Toxicol. Chem.* 4, 511-521
- McCarthy JF, Jimenez BD. 1985b. Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons and dissolved humic material: binding and dissociation. *Environ. Sci. Technol.* 19, 1072-1076.
- McCarthy JF, Roberson LE, Burrus LW. 1989. Association of benzo(a)pyrene with dissolved organic matter : prediction of K_{DOM} from structural and chemical properties of the organic matter. *Chemosphere* 19, 1911-1920
- Mean B. and Kirchmann D.L. 2001. Dynamics and molecular composition of dissolved organic material during experimental phytoplankton blooms. *Marine Chemistry* 75, 185-199
- Namour Ph and Müller MC. 1998. Fractionation of organic matter from wastewater treatment plants before and after a 21-day biodegradability test: a physical-chemical method for measurement of the refractory part of effluent. *Wat. Res.* 32, 2224-2231.
- Pernelle JJ, Laval G, Cotteux E, Duchène PH. 2001. Influence of transient substrate overloads on the proliferation of filamentous bacterial populations in an activated sludge pilot plant. *Wat Res.* 35, 129-134
- Schlautman MA, Morgan JJ. 1993. Effects of aqueous chemistry on the binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by dissolved organic materials. *Environ. Sci. Technol.* 27, 961-969.
- Schwarzenbach R, Gschwend PM, Imboden DM. 1993. *Environmental Organic Chemistry*. John Wiley & Sons., New York. USA. 680 p.

- Seidl M, Servais P, Mouchel JM. 1998. Organic matter transport and degradation in the river Seine (France) after a combined sewer overflow. *Water Res.* 32, 3569-3580
- Shin H.S. and Kang S.T., 2003. Characteristics and fates of soluble microbial products in ceramic membrane bioreactor at various sludge retention times. *Water Res.* 37, 121-127
- Stumm W. Morgan J.J. 1981. *Aquatic Chemistry. An introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters.* John Wiley & Sons. New York.
- Traina S.J., Novak J., Smeck N.E. 1990. An ultra-violet absorbance method of estimating the percent aromatic carbon content of humic acids. *J. Environ. Qual.* 19, 151-153
- Tusseau-Vuillemin MH, Le Reveillé G. 2001. Le carbone organique biodégradable dans les eaux traitées des stations d'épuration du bassin de la Seine. *Ingénieries* 25, 3-12.

ARTICLE 4

Influence of algal and bacterial particulate organic matter on benzo[a]pyrene bioaccumulation in *Daphnia magna*.

(A paraitre dans *Science of the Total Environment*)

Catherine Gourlay^{1,2*}, Jean-Marie Mouchel², Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin¹, Jeanne Garric³

¹Cemagref, UR Hydrosystèmes et Bioprocédés, Parc de Tourvois, BP 44, 92163 Antony cedex, France.

²Centre d'Enseignement et de Recherches Eau Ville Environnement, ENPC, Cité Descartes, 77455 Marne La Vallée cedex 02, France.

³Cemagref, 3b quai Chauveau, CP 220, 69336 Lyon cedex 9, France.

ABSTRACT

In order to better assess the influence of organic matter on the bioavailability of hydrophobic organic contaminants, the effect of algae and POM of bacterial origin on the bioaccumulation of benzo[a]pyrene in *Daphnia magna* was evaluated. The bioaccumulation was monitored with increasing concentrations of particulate organic matter (POM) and dissolved organic matter (DOM).

In all experiments, the presence of POM greatly reduced the bioaccumulation of benzo[a]pyrene. The reduction was more pronounced in the presence of algae, for which we observed a 99% reduction effect in the presence of 6×10^5 cell/mL (equivalent to 5.3 mgC/L). The bioaccumulation of benzo[a]pyrene was decreased by 49% by organic matter of bacterial origin at 4.7 mgC/L.

Assuming that benzo[a]pyrene was partitioned between water, DOM and POM and supposing that *D. magna* accumulated free benzo[a]pyrene via respiration and POM-bound BaP via ingestion, bioaccumulation data allowed to estimate the dietary uptake rate of benzo[a]pyrene as well as partitioning coefficients K_{POC} and K_{DOC} .

Despite the ingestion of contaminated particles, we could not observe any dietary uptake of benzo[a]pyrene in daphnids. We verified, as usually supposed, that the bioaccumulation of benzo[a]pyrene to *D. magna* occurs mainly via direct contact. Very high partitioning coefficient ($\log K_{POC}$ between 5.2 and 6.2) were estimated. This study pointed out the great influence of biogenic organic matter on the fate and the bioavailability of benzo[a]pyrene in aquatic ecosystems.

KEY-WORDS:

bioaccumulation, *Daphnia magna*, organic matter, algae, partitioning coefficients, dietary exposure.

1. INTRODUCTION

In aquatic environments, the fate of hydrophobic persistent organic pollutants (POPs) is strongly influenced by organic matter. Indeed, a large fraction of contaminants bind to particulate and dissolved organic matter (POM and DOM respectively) (Schwarzenbach et al., 1993), which determines their repartition in the environment and affects their bioavailability.

Most studies report that the presence of DOM in water reduces the bioconcentration of POPs in numerous aquatic organisms (Haitzer et al., 1998). The intensity of the reduction effect depends on the DOM concentration, and the chemical characteristics of DOM and POPs. The generally-accepted assumption is that only the truly dissolved fraction of POPs (also referred to as the "free fraction") is bioavailable to these organisms who concentrate pollutants from water through direct contact and respiration (Landrum et al., 1985).

Suspended particles also greatly bind organic pollutants, the organic fraction of particles being mainly responsible for binding (Schwarzenbach et al., 1993; Koelmans et al., 1997). However, the effect of binding to POM on the bioavailability of contaminants is far less understood (Suffet et al., 1994) and may be equivocal (Spacie et al., 1995). In the one hand, POPs that are bound to POM cannot cross biological membranes, and consequently may be unavailable for bioconcentration. In the other hand, some particles are a food source for living organisms and the ingestion of these contaminated particles may enhance the bioaccumulation.

The bioaccumulation of contaminants from diet has been widely studied in marine or freshwater benthic organisms (Loonen et al., 1997; Kukkonen and Landrum, 1998; Lotufo, 1998) or bivalves (Baumard et al., 1999; Okay et al., 2000; Verrengia Guerrero et al., 2003). These organisms ingest large amounts of particles, the presence of POM usually enhances the bioaccumulation of POPs. The effect of POM on the bioavailability of POPs to fish is equivocal. Depending on the fish species and the hydrophobicity of the contaminant, POM may reduce or enhance its bioavailability (Schrapp and Opperhuizen, 1990). Much less is known on the effect of POM on the bioavailability of POPs to pelagic invertebrates, although they are widely used for bioaccumulation and toxicity tests in water. The dietary exposure for these organisms was usually neglected *a priori*. Most studies focused on the impact of DOM on the bioavailability (Suffet et al., 1994).

Waters bodies under anthropogenic influence contain high levels of organic matter of urban origins such as industrial or domestic effluents, sewer overflows, road runoff, etc... For instance, Tusseau-Vuillemin and Le Réveillé (2001) measured that the average organic carbon concentration in various wastewater treatment plant (WWTP) effluents around Paris (France) was about 18 mgC/L, 66% of which was from POM. Servais et al. (1999) found out that POM in sewer during a rain could reach up to 146 mgC/L. Since anthropogenic nutrient discharges may also enhance eutrophication, anthropized water bodies may contain high levels of organic matter from algal origin. Particles from urban effluents or eutrophic waters are highly organic (Servais et al., 1999; Suzumura et al., 2004); consequently they may bind POPs as well as be preferential food source for pelagic zooplankton. Therefore, these types of organic matter are very likely to influence the bioavailability of POPs in anthropized waters that also carry the highest concentrations of micro-pollutants. Moreover, unlike refractory and stable humic substances, DOM and POM in anthropized systems are highly reactive and subject to transformation

processes (biodegradation, aggregation, humification...). Accordingly, in order to fully understand the bioavailability of POPs in anthropized systems, the effect sub-product reactive organic matter should be also examined.

In this study, the effect of three types of POM on the bioaccumulation of benzo[a]pyrene (BaP) to a widely spread crustacean *Daphnia magna* was investigated. BaP is a polycyclic aromatic hydrocarbon of great concern due to its carcinogenic and mutagenic properties. Since BaP is highly hydrophobic and lipophilic, it is accumulated in aquatic organisms and is also strongly bound to organic matter (Neff, 1979). The tested POM were a green algae and two POM of bacterial origin at different biodegradation stages. From data of bioaccumulation in the presence of various POM concentrations, a methodology was proposed to estimate partitioning coefficients between BaP and POM and to assess the relative importance of dietary and contact exposure routes.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Water, organic matter, chemicals and solvents.

1 mg/L dilution in methanol of benzo[a]pyrene (BaP) was prepared in the laboratory from PAH solid powder (purity: 98%, Aldrich, Steinheim, France). A mixture of high purity dichloromethane and methanol (4:1 v/v) (LiChroSolv, Merk Eurolab, Fontenay-sous-Bois, France) was used for the extraction and the measurement of BaP in organisms.

Mineral water (Evian[®], pH: 7.2, dissolved solids: 309 mg/L, conductivity: 567 μ S/cm) was used in all exposure experiments as well as for daphnid culture Gourlay et al. (2003). Organic matter of bacterial origin was obtained from a reactor containing a substrate (Viadox[®], Rueil Malmaison, France) mainly composed of easily biodegradable DOM and activated sludge. Briefly, the substrate was first inoculated with activated sludge. The initial composition of the mixture was 890 mgC/L of dissolved organic carbon (DOC), mainly Viadox, and 17 mg/L of particulate organic carbon (POC) coming from the activated sludge. Samples were collected after 3 days of incubation, at the end of the maximum biomass growth period (452 mgC/L DOC and 132 mgC/L POC) and after 7 days, while the culture had started its endogenous phase (210 mgC/L DOC and 128 mgC/L POC). Details of the biodegradation protocol and monitoring are available elsewhere (Gourlay et al., submitted).

Algal organic matter was obtained from monocellular algae *Selenastrum capricornutum*. Algae were cultured in the lab in Lefevre-Czarda medium (Agence Française de Normalisation, 1980), at 25 °C, under controlled permanent light.

2.2 Organic matter-related measurements

The media was stirred prior to all measurements. DOM and POM were separated by filtration on a pre-combusted 0.7 μ m glass-fiber filter (GF/F Whatmann[®], Kent, UK). The filter was dried and weighted. POM and DOM were quantified respectively by POC measurements in the filter

and DOC in the solution using a Carbon Analyzer (solid and liquid modules, O.I. Analytical, College Station, TX, USA).

Algae concentrations in water were estimated from absorbance measurements at 687 nm (chlorophyll-a maximum absorbance). The calibration between A_{687} and algae concentrations (in number of cells per ml, initially measured by microscope counting) lead to the following relation:

$$C_{alg} (\text{cell/ml}) = 8.57 \times 10^6 \cdot A_{687} + 600 \quad (r^2 = 0.99, n=7) \quad (1)$$

The organic carbon content in algae was previously measured at 9.3 ± 1.4 pg C/cell (n=17).

2.3. Bioaccumulation experiments

Bioaccumulation experiments were performed using 5-7 days-old daphnids (*D. magna*). One hour before exposure, they were transferred into clean mineral water in order to clear their gut.

Just before use, the organic matter stock solution was sampled for POC and DOC measurements. For each experiment, four to seven exposure media with different organic matter concentrations were prepared by diluting the organic matter stock solution in mineral water. One reference media did not contain any organic matter. Media were spiked by diluting the BaP solution in methanol by 1 ‰ so that the nominal BaP concentration in exposure media was 1 µg/L. Exposure media were allowed to settle for one hour before introducing the daphnids (1 per 10 ml). Daphnids were exposed at 20°C in the dark.

Three experiments with algal organic matter were conducted : a bioaccumulation kinetic with 3 exposure media (Ak); a 4-hr bioaccumulation experiment (A4) and a 24-hr bioaccumulation experiment (A24), both with 6 exposure media. Initial algal concentrations ranged from 0 to 6×10^5 cell/mL. Algae concentrations were measured at the beginning and at the end of exposure. In case of organic matter of bacterial origin, half of the organic matter stock solution was first filtered so as to preserve DOM only. Bioaccumulation experiments were conducted in parallel with the filtered and the raw organic matter stock solution. Five or six exposure media were prepared by diluting the organic matter solution. Organic matter concentrations ranged from 0 to 47 mgC/L. Exposure lasted only 4 hours, in order to limit organic matter biodegradation. Experiments are here after referred to as B3 and B7, depending on the age of the organic matter sample (sampled after 3 days and 7 days of biodegradation respectively).

During the exposure in the presence of POM, we observed that some particles settled and that daphnids grazed settled particles at the bottom of the beaker. Consequently, we assumed that the settling did not affect the bioavailability of BaP.

2.4. Control experiments

Because of the large amount of methanol, we were not able to monitor efficiently DOC and POC in contaminated media. Hence, the evolution of DOC and POC in the solution was studied in a control experiment. Four uncontaminated media (no BaP) were prepared: with water only, with algae and with each type of organic matter of bacterial origin. POC and DOC concentrations were in the same range as in the contaminated media. Media were analyzed for their DOC concentration prior daphnid exposure and for their DOC and POC concentration

after daphnid exposure (after 4 hours in experiment with bacterial POM, after 4 and 24 hours in experiments with algae).

2.5. BaP measurements in daphnids

BaP in daphnids were measured by mean of spectrofluorimetry according to Gourlay et al. (2002). After exposure, 10 organisms were removed, gently rinsed with milli-Q[®] water and put in a glass tubes with 4 ml of organic solvent. Samples were sonicated for 1 minute. Tubes were then stored in the dark at 4°C until analysis. The samples were filtered on a GF/F filter and put in 1-cm quartz cuvette for fluorescence analysis of the daphnid extract. We previously verified that no significant BaP was retained on the filter (Gourlay et al., 2002). The emission fluorescence spectrum of the daphnid extract was recorded between 350 and 500 nm. Excitation wavelengths were set at 265 nm. Fluorescence measurements were performed at room temperature. Intensities of the measured peaks were corrected for baseline fluorescence. BaP in the sample was obtained from the corrected fluorescence intensities of daphnid extract at 407 nm (F_{407}) and 417 nm (F_{417}), following the equation previously established by Gourlay et al. (2002) :

$$C_{daph} = 3.66.10^{-2}F_{407} - 1.62.10^{-2}F_{417} \quad (2)$$

2.6. Data analysis

In the media, the contaminant is either in a truly dissolved state (C_{free} in ng/L), either bound to POM (C_{POC} in ng/L), either bound to DOM (C_{DOC} in ng/L). Supposing a simple partitioning between the water and each organic matter fraction (DOM and POM), The BaP concentrations can be expressed with the OC-normalized partitioning coefficients of BaP to DOM (K_{DOC}) and POM (K_{POC}) and the total concentration of BaP in the water (C_{total} in ng/L)

$$\begin{aligned} C_{free} &= \frac{C_{total}}{1 + K_{DOC}[DOC] + K_{POC}[POC]} \\ C_{DOC} &= \frac{C_{total} K_{DOC}[DOC]}{1 + K_{DOC}[DOC] + K_{POC}[POC]} \\ C_{POC} &= \frac{C_{total} K_{POC}[POC]}{1 + K_{DOC}[DOC] + K_{POC}[POC]} \end{aligned} \quad (3)$$

The bioaccumulation in daphnids can be properly modeled by a one compartment first-order kinetic (McCarthy, 1983). Only truly dissolved contaminants in the water phase can enter the organisms via direct contact (direct uptake rate k_u in L/g/hr) (Landrum et al., 1985), whereas POM-bound contaminants can be accumulated via ingestion (dietary uptake rate k_i in L/g/hr). The depuration rate k_d (in hr⁻¹) is supposed to be constant and independent from the presence of organic matter (Nikkilä and Kukkonen, 2001). Consequently, in the presence of organic matter, the concentration of BaP in daphnids ($C_{daph, OM}$) can be modeled with the following relationship:

$$\frac{dC_{daph, OM}}{dt} = k_u C_{free} + k_i C_{POC} - k_d C_{daph, OM}$$

$$C_{daph,OM} = \frac{k_u C_{free} + k_i C_{POC}}{k_d} (1 - e^{-k_d t}) \quad (4)$$

Combining (3) and (4), this model draws a relationship between bioaccumulated concentrations ($C_{daph,OM}$) and chemical and physical parameters:

$$C_{daph,OM} = \frac{C_{total}}{1 + K_{DOC}[DOC] + K_{POC}[POC]} \frac{k_u}{k_d} \left(1 + \frac{k_i}{k_u} K_{POC}[POC]\right) (1 - e^{-k_d t}) \quad (5)$$

In a water-only medium, all BaP is bioavailable and daphnids accumulate through respiration only:

$$C_{daph,O} = C_{total} \frac{k_u}{k_d} (1 - e^{-k_d t}) \quad (6)$$

Assuming that C_{total} is almost constant within the beakers (as previously verified in Gourlay et al. (submitted)), the relative effect of organic matter on bioaccumulation can be estimated with the ratio of bioaccumulated concentrations with and without organic matter.

$$\frac{C_{daph,OM}}{C_{daph,O}} = \frac{k_u \cdot C_{free} + k_i \cdot C_{POC}}{k_u \cdot C_{total}} = \frac{1 + \frac{k_i}{k_u} K_{POC}[POC]}{1 + K_{DOC}[DOC] + K_{POC}[POC]} \quad (7)$$

Non linear regression of $C_{daph,OM}/C_{daph,O}$ against DOC and POC data points allow to estimate the partitioning coefficients K_{POC} , K_{DOC} and the uptake rates ratio k_i/k_u . The Levenberg-Marquardt method was applied with the XLStat software. The software allowed to estimate parameters and their standard deviations based on the hypothesis of a normal distribution of data errors. Optimized parameters were restricted to positive values during calibration.

3. RESULTS

3.1. Evolution of organic matter concentrations

The media with daphnids and water only contained initially 0.5 mg-C/L DOC. It was not significantly different after the 24-hr exposure (t-test, $P > 0.05$). Similarly, no significant POM appeared in the media after exposure (t-test, $P > 0.05$). In experiments with bacterial organic matter, DOC and POC did not evolve significantly within 4 hours (t-test, $P > 0.01$, maximal 17% variation). This shows that there was no significant organic matter degradation within 4 hours. In experiments with algae, DOC remained below 1 mgC/L and was not significantly different from the DOC in the water only treatment (t-test, $P > 0.05$) whereas POC decreased during the exposure because of the ingestion of algae by daphnids.

In media with algae, the algae concentration was monitored at the beginning and at the end of exposure. After a 4 hr-exposure, a maximum 10% variation in algae concentration was observed, which was similar to results obtained in blank experiments without any daphnids. After a 24 hr-exposure, however, algal concentration always decreased. Depending on algae initial concentration, 40% to 72 % algae disappeared during the bioaccumulation experiment after 24

hours. In a reference media with 4×10^5 cell/mL and no daphnids, the algae numbers decreased by 22% after 24 hours in the dark, which will be referred as the no-ingestion decrease and can be due to algae degradation or settlement. Ingestion rates were estimated from the decrease of algal concentration, previously corrected for the no-ingestion decrease, following Allen et al. (1995). The ingestion by daphnids was also monitored in uncontaminated test solutions in order to verify that neither BaP nor carrier solvent affected the ingestion rate (Figure 1). The ingestion rate was controlled by algae concentration under low food availability conditions, while a maximum constant ingestion rate at 7×10^4 cell/daphnid/hr was reached for algae concentration higher than 4×10^5 cell/mL.

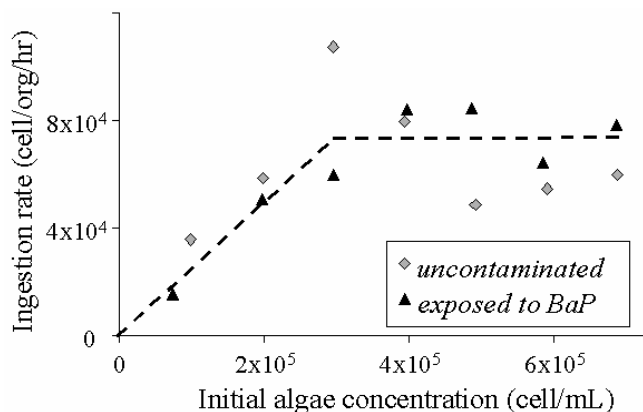


Figure 1: Ingestion rates of algae by uncontaminated and benzo[a]pyrene-contaminated daphnids.

3.2. Influence of organic matter on BaP bioaccumulation.

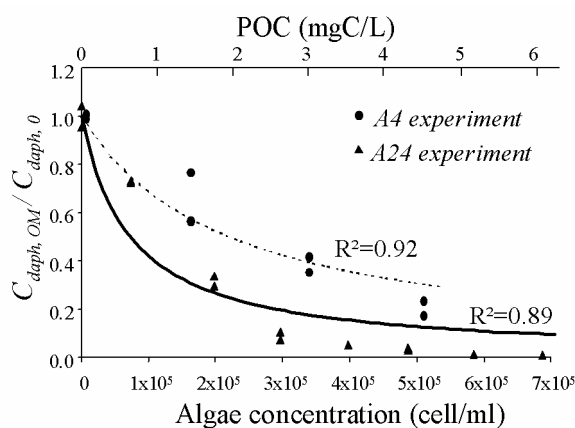


Figure 2: Relative bioaccumulation of benzo[a]pyrene in the presence algae: experimental data, regression curves (following an hyperbolic model detailed in Equation 7) and determination coefficients R^2 between simulated and experimental data. Dotted line and circles: 4hr-bioaccumulation. Continuous line and triangles: 24 hr-bioaccumulation

The presence of algae in the media reduced the bioaccumulation of BaP in daphnids and the reduction was dependent on the on the concentration of algae (Figures 2 and 3). The more concentrated algae, the less bioaccumulated BaP (Figure 2). The bioaccumulation of BaP in the 24-hr exposure was reduced by 68% in the medium containing 10^5 algae cells/mL and by more than 99% in the medium containing $6 \cdot 10^5$ cell/mL. Moreover, the reduction effect was more pronounced when the exposure lasted longer (Figure 3). For example, with an initial

concentration of 2.2×10^5 cell/mL, the bioaccumulation was reduced by 32%, 71% and 93% after 4hrs, 8hrs and 24 hrs respectively.

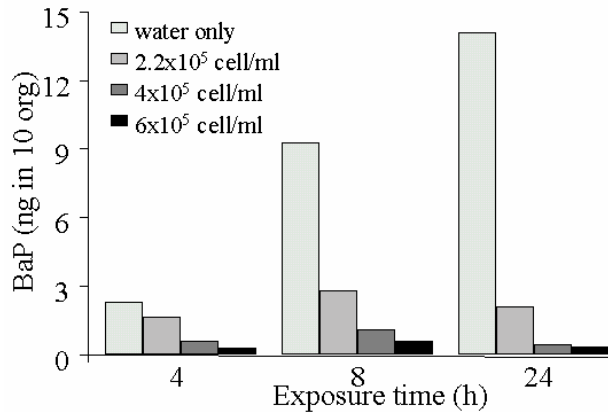


Figure 3: Bioaccumulation of benzo[a]pyrene in daphnids; effect of exposure time and algae concentration in the media.

The bioaccumulation of BaP was reduced by the presence of DOM from the Viandox degradation experiments and the addition of POM in the media reduced again the bioaccumulation (Figure 4). In experiments B3 for example, the addition of 3.6 mgC/L DOC induced a 34% -reduction of bioaccumulation, while with an additional 1 mgC/L POC, the bioaccumulation was reduced by 49%. The maximum reduction (91%) was observed with the highest organic carbon concentrations, i.e. 36 mgC/L DOC and 10 mgC/L POC in the B3 set of experiments.

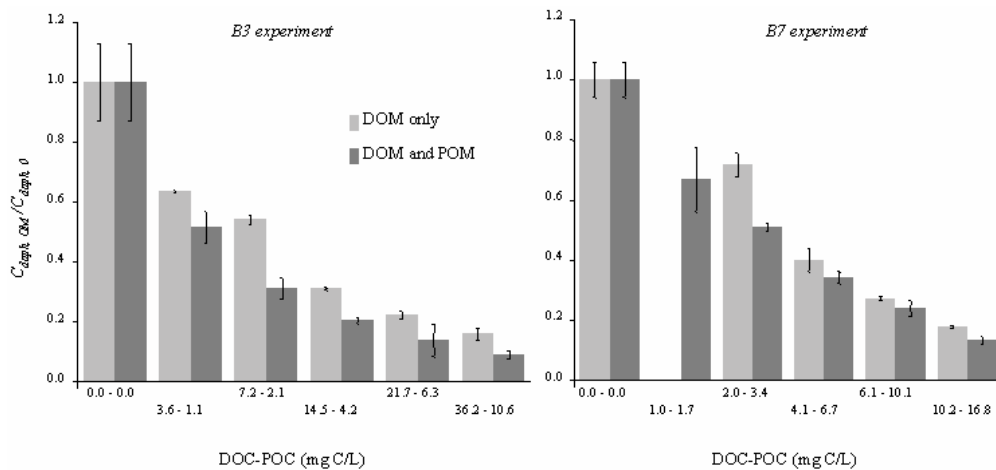


Figure 4: Relative bioaccumulation of benzo[a]pyrene in daphnids in the presence of DOM only and DOM and POM from the biodegradation reactor.

3.3. Estimation of partitioning coefficients

In the case of algae, we were able to fit the experimental data with the model given in Equation 7 from A4 and A24 experiments (Figure 2). Since DOC concentration was very low in the algae control solution (< 1 mgC/L), DOM was neglected in the regression analysis. The estimated dietary uptake rates k_i were null (actually, $k_i/k_w K_{POC}$ reached the minimum zero boundary during the minimizations). The obtained OC-normalized partitioning coefficients, K_{POC} were $49 (\pm 12)$

$\times 10^4$ and $149 (\pm 38) \times 10^4$ L/kg in experiments A4 and A24 respectively (Table 1). It should be noted that, in A24 experiment, the model with optimized K_{POC} poorly fitted bioaccumulation data with the highest algae concentrations.

From B3 and B7 experiments, we first estimated K_{DOC} from bioaccumulation data in media with DOM only (Table 1). Then K_{POC} and k_i/k_u were estimated from Equation 6 using previously determined K_{DOC} values. As in experiments with algae, the optimized k_i were null. K_{POC} were lower than K_{DOC} for algae, ($46.3 (\pm 6.1) \times 10^4$ and $15.7 (\pm 3.7) \times 10^4$ L/kg for B3 and B7 respectively) the partitioning coefficient was lower for “older” 7 days- old biomass than for the fresh 3 days-old one.

For sake of comparison to literature data, dry weight-normalized partitioning coefficients (K_p) were also calculated as $K_{POC} \cdot f_{OC}$, f_{OC} being the organic carbon content of POM. Measured f_{OC} were 0.41, 0.32 and 0.34 respectively for algae and POM from B3 and B7 experiments. Log values of K_p are given in Table 2.

| Experimental conditions | name | K_{DOC} (L/kg) | K_{POC} (L/kg) | r^2 , n |
|--|------|------------------------------|------------------------------|-----------|
| <u>Algae <i>Selenastrum capricornutum</i></u> | | | | |
| 4 hr-exposure | A4 | n.d. | $49 (\pm 12) \times 10^4$ | 0.92, 8 |
| 24 hr-exposure | A24 | n.d. | $149 (\pm 38) \times 10^4$ | 0.89, 16 |
| <u>OM from biodegradation reactor (4 hr bioaccumulation)</u> | | | | |
| 3 rd day: Filtered | B3 | $14.3 (\pm 1.6) \times 10^4$ | | 0.96, 14 |
| Raw | | | $46.3 (\pm 6.1) \times 10^4$ | 0.97, 14 |
| 7 th day: Filtered | B7 | $20.1 (\pm 2.9) \times 10^4$ | | 0.96, 11 |
| Raw | | | $15.7 (\pm 3.7) \times 10^4$ | 0.96, 13 |

Table 1 : OC-normalized partitioning coefficients between BaP and POM (K_{POC} in L/kg) and DOM (K_{DOC} in L/kg), depending on organic matter type (OM). Estimations were made from Equation 7. Determination coefficients (r^2) and number of data points (n) are noticed.

4. DISCUSSION

4.1. Effect of organic matter on the bioaccumulation

The influence of POM on BaP bioaccumulation depends on the organisms (Spacie et al., 1995). As an example, the BaP bioaccumulation in mussels was increased when algae were added to the media (Okay et al., 2000), whereas the BaP bioaccumulation in *D. magna* was decreased in the presence of POM (yeast cells) (McCarthy, 1983). In the present study, the reduction effect on BaP bioaccumulation in *D. magna* observed by McCarthy (1983) was confirmed. The effect of POM on the bioavailability of POPs to *D. magna* was similar to the one of DOM, observed in numerous studies (Haitzer et al., 1998): POM acts as a trap for contaminants and prevent them from being bioaccumulated.

We were not able to estimate any significant bioaccumulation of BaP from diet in any experiment although we observed a strong ingestion of algae by daphnids. These observations tend to show

that BaP ingested in the gut along with contaminated algae was not assimilated into the organism. It is very likely to be excreted along with fecal pellets, under another POM-bound form. From a similar experiment with yeast cells, McCarthy (1983) was able to estimate a positive dietary uptake rate k_i for BaP bound to yeast cells. He estimated that about 20% of ingested BaP with yeast cells was assimilated.

4.2. Pertinence of “biologically-determined” K_{POC}

| Compound | Log K_{OW} | POM type | Log K_p | Reference |
|--------------------|--------------|---|-----------|-------------------------------|
| Phenanthrene | | <i>Bothyococcus braunii</i> fresh | 4.1 | Salloum et al., 2002 |
| | | degraded | 4.4 | |
| Pyrene | 5.18 | <i>Selenastrum capricornutum</i> | 4.6 | Casserly et al., 1983 |
| Hexachlorobenzene | 5.7 | Unicell <i>Scenedesmus</i> spp. | 4.6 | Koelmans et al., 1993 |
| Hexachlorobenzene | 5.7 | <i>Chlorella fusca</i> | 5.1 | Geyer et al., 1984 |
| PCB 49 | 5.8 | <i>Selenastrum capricornutum</i> (with various lipid content) | 4.3-5.3 | Halling-Sorensen et al., 2000 |
| DDT | 6.2 | | 5.0-5.7 | |
| 3,3',5,5'-PCB | 6.3 | <i>Selenastrum capricornutum</i> | 4.8-5.4 | Stange and Swackhamer, 1994 |
| | | <i>Anabaena</i> sp. | 4.1-4.6 | |
| Aroclor 1254 (PCB) | 6.8 | Bacteria, alive | 5.7 | Weber et al., 1983 |
| | | Bacteria, dead | 5.6 | |
| | | Algae, alive | 6.1 | |
| | | Algae, dead | 5.8 | |
| BaP | 6.2 | Yeast cells | 5.3 | McCarthy, 1983 |
| BaP | 6.2 | Yeast cells | 4.9 | McCarthy and Black, 1988 |
| BaP | 6.2 | Four marine algae | 4-4.7 | Wang and Chow, 2002 |
| BaP | 6.2 | <i>Selenastrum capricornutum</i> | 5.3-6 | This study |
| | | Bacteria fresh | 5.2 | |
| | | Bacteria, old | 4.7 | |

Table 2: log values of dry-weight normalized partitioning coefficients ($\log K_p$) between persistent organic compounds and biogenic particles.

In Table 2, K_p data for BaP and organic compounds having similar hydrophobicity and bacterial and algal POM are reported. “Biologically determined “ partitioning coefficients from this study are in accordance with those reported data, obtained using physico-chemical techniques. We confirm the strong affinity of biogenic organic matter for hydrophobic organic compounds.

In order to compare with previous results obtained with DOM (Gourlay et al., 2003), the solution was equilibrated for one hour before introducing organisms. The choice for a short equilibrium period was also supported by many other studies that showed that the partitioning was very fast and complete within less than two hours (Geyer et al., 1984; Koelmans et al., 1993; Wang and Chow, 2002). However, the kinetic of binding between organic compounds and algae is controversy. Recent studies showed that, although a quick binding occurs during the first hour, one can observe a slower kinetic along days (Koelmans et al., 1999). Stange and Swackhamer (1994) described a two-phase uptake, consisting of a rapid adsorption onto the surface of the cell, and then a slow accumulation. For example, $\log K_p$ between *S. Capricornutum* and 3,3',5,5'-TCB was about 4.8 after half an hour and 5.1 after 3 days equilibration (Stange and Swackhamer,

1994). The two step kinetic might partly explain why K_{POC} for algae was greater in after 24 hour exposure than after 4-hour exposure.

Weber et al. (1983) previously observed that the binding of hydrophobic compounds was quite similar for dead and alive bacterial biomass, alive biomass binding slightly more than dead one (Table 2). We observed that POM from B3 bound BaP slightly more than POM from B7. After 3 days of degradation, the POM is mainly composed of living biomass that assimilate the substrate (Gourlay et al., submitted). On the contrary, after 7 days, there is no more readily assimilable substrate and the culture has started its endogenous activity, (i.e. alive biomass is fed with dead biomass). Consequently, POM sampled the 3rd day is composed of alive bacteria mainly, whereas POM in the reactor the 7th day is therefore very likely to be composed of dead and alive biomass. Hence, our results are in accordance with the ones obtained by Weber et al. (1983).

4.3. Limitation of the hyperbolic model for longer bioaccumulation experiments

Although the influence of organic matter on the 4-hour bioaccumulation was well described by a hyperbolic model (Equation 7) the same equation could not properly describe the bioaccumulation after 24 hr-exposure. Indeed, the reduction effect was more pronounced for higher algal concentrations than it was simulated. Several hypothesis may be proposed to explain this tendency: First, it should be noted that the model was based on a constant POM concentration. The initial POC data were used in the regression but, contrary to 4 hr-experiment, algae greatly decreased during the 24 hr-exposure. Consequently, the real POC should be much lower than the initial ones. When performing the regression using the final POC concentration (estimated from final algae concentrations) the regression was slightly better ($r^2=0.91$, $n=16$) whereas estimated K_{POC} was much higher ($380 (\pm 87) \times 10^4$ L/kg, $\log K_p=6.2$). Secondly, although the global POC decreased in algae experiments (as observed in experiments in uncontaminated media), daphnids are very likely to excrete fecal particles along the 24 hr-exposure. Daphnids may excrete more fecal POM in media with higher algae concentration (and higher food availability). The enhancement of the reduction effect under high food condition may be explained by a high binding capacity for this new formed fecal POM. Finally, daphnids may be able to depurate BaP along the 24 hour exposure, and initiate some biological processes that did not appear along the 4 hr-exposure. The depuration process may be favored by a higher ingestion activity, leading to lower BaP concentration in media with higher algae concentrations.

More experiments should be needed in order to better understand the evolution of the organic matter composition and the fate of contaminants in the media, as well as the toxico-kinetic of BaP in *D. magna* along a 24-hour exposure.

4.4. Perspective: Repartition of BaP in aquatic media

On Figure 5 are presented theoretical examples of BaP repartition in various water bodies, including the biodegrading solution in the reactor (diluted 10 times, in order to better simulate a

sewer effluent). Typical organic matter concentrations found in urban waters (Servais et al, 1998; Servais et al, 1999; Tusseau-Vuillemin and Le Réveillé, 2001) and eutrophic rivers (Garnier et al, 1998) were taken from literature data. K_{POC} obtained for fresh old biomass were used to estimate the repartition in urban waters, whereas K_{POC} for algae was set at 10^6 L/kg. K_{DOC} for the fresh effluent and algal exudates were obtained from Gourlay et al. (2003).

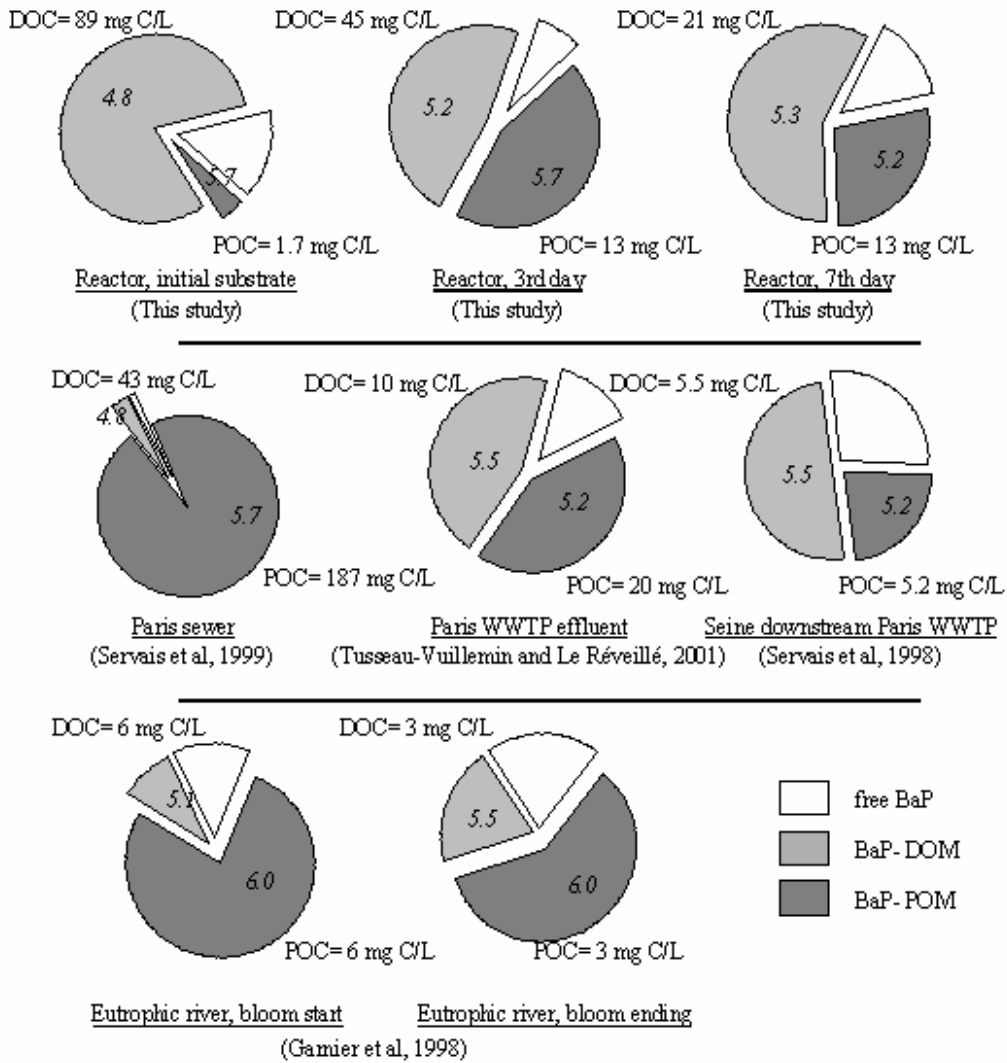


Figure 5 : *Repartition of benzo[a]pyrene between water, DOM and POM in various anthropized waters. Log $K_{P/DOC}$ are indicated in italic letters.*

The repartition of BaP strongly evolves along with the transport and the evolution of wastewater (from the sewer to the river): almost all BaP is bound to POM in the sewer, whereas about 30% of BaP is truly dissolved (and bioavailable) in the river downstream the WWTP. The DOM-bound fraction becomes more and more important, because (1) its binding capacity increases when DOM is mineralized and becomes more refractory and (2) POM concentrations and binding capacity decrease. The speciation of BaP also changes along a phytoplanktonic bloom, because of the changes in organic matter concentrations and DOM quality: the truly dissolved, bioavailable fraction increases while algal organic matter disappears at the end of the bloom.

These estimations show that the repartition of BaP is strongly influenced by organic matter quantity and quality and differs greatly depending on aquatic media. The presence of biogenic organic matter is consequently of great importance in the fate of organic contaminants in altered ecosystems. Moreover, the repartition and the bioavailability of contaminants may be subject to strong evolution in the media, because of the non stability of organic matter.

This study points out the need to consider (1) both particulate and dissolved organic matter and (2) organic matter dynamics when evaluating the fate of contaminants in aquatic media submitted to anthropogenic pressure.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the PIREN-Seine Research Program. Laïla El Jouhari and Catherine Lorgeoux are kindly acknowledged for their assistance in experimental work.

REFERENCE LIST

- Agence Française de Normalisation. Essais des Eaux, détermination de l'inhibition de croissance de *Scenedesmus subspicatus* par une substance. 1980. AFNOR, Paris, France.
- Allen Y, Callow P, Baird DJ. A mechanistic model of contaminant induced feeding inhibition in *Daphnia magna*. Environ. Toxicol. Chem. 1995; 14: 1625-1630.
- Baumard P, Budzinski H, Garrigues P, Narbonne JF, Burgeot T, Michel X, Bellocq J. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) burden of mussels in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. Mar Environ Res 1999; 47: 415-439.
- Casserly DM, Davis EM, Downs TD, Guthrie RK. Sorption of organics by *Selenastrum Capricornutum*. Wat Res 1983; 17: 1591-1594.
- Geyer HJ, Politzki G, Freitag D. Prediction of ecotoxicological behaviour of chemicals: relationship between n-octanol/water partition coefficient and bioaccumulation of organic chemicals by algae *Chlorella*. Chemosphere 1984; 13: 269-284.
- Garnier J, Billen G, Hanset P, Testard P, Coste M. Chapitre 13: Développement algal et eutrophisation dans le réseau hydrographique de la Seine. In Meybeck M, de Marsily G, Fustec E. editors. La Seine en son bassin: fonctionnement écologique d'un système fluvial anthropisé Elsevier, Paris, 1998, pp. 483-529
- Gourlay C, Miège C, Tusseau-Vuillemin MH, Mouchel JM, Garric J. The use of spectrofluorimetry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons bioaccumulation and biotransformation in *Daphnia magna*. Polycycl Aromat Comp 2002; 22: 501-516.
- Gourlay C, Tusseau-Vuillemin MH, Garric J, Mouchel JM. Effect of non-humic dissolved organic matter from various origins and biodegradabilities on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Daphnia magna*. Environ Toxicol Chem 2003; 22: 1288-1294.
- Gourlay C, Tusseau-Vuillemin MH, Mouchel JM, Garric J. The ability of dissolved organic matter (DOM) to influence benzo[a]pyrene bioavailability increases along DOM mineralization. Ecotox. Environ. Saf. submitted.

- Haitzer M, Hoss S, Traunspurger W, Steinberg C. Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms - a review. *Chemosphere* 1998; 37: 1335-1362.
- Halling-Sorensen B, Nyholm N, Kusk KO, Jacobsson E. Influence of Nitrogen Status on the Bioconcentration of Hydrophobic Organic Compounds to *Selenastrum capricornutum*. *Ecotox Environ Saf* 2000; 45: 33-42.
- Koelmans AA, Gillissen F, Makatita W, Van Den Berg M. Organic carbon normalisation of PCB, PAH and pesticide concentrations in suspended solids. *Wat Res* 1997; 31: 461-470.
- Koelmans AA, Jimenez CS, Lijklema L. Sorption of chlorobenzenes to mineralizing phytoplankton. *Environ Toxicol Chem* 1993; 12: 1425-1439.
- Koelmans AA, van der Woude H, Hattink J, Niesten DJM. Long-term bioconcentration kinetics of hydrophobic chemicals in *Selenastrum capricornutum* and *Microcystis aeruginosa*. *Environ Toxicol Chem* 1999; 18: 1164-1172.
- Kukkonen JVK, Landrum PF. Effect of particle-xenobiotic contact time on bioavailability of sediment-associated benzo(a)pyrene to benthic amphipod, *Diporeia* spp. *Aquat Toxicol* 1998; 42: 229-242.
- Landrum PF, Reinhold MD, Nihart SR, Eadie BJ. Predicting the bioavailability of organic xenobiotics to *Pontoporeia hoyi* in the presence of humic and fulvic materials and natural dissolved organic matter. *Environ Toxicol Chem* 1985; 4: 459-467.
- Loonen H, Muir DCG, Parson JR, Govers HAJ. Bioaccumulation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins in sediment by oligochaetes: influence of exposure pathway and contact time. *Environ Toxicol Chem* 1997; 16: 1518-1525.
- Lotufo GR. Bioaccumulation and sediment-associated fluoranthene in benthic copepods: uptake, elimination and biotransformation. *Aquat Toxicol* 1998; 44: 1-15.
- McCarthy JF. Role of particulate organic matter in decreasing accumulation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Daphnia magna*. *Arch Environ Cont Toxicol* 1983; 12: 559-568.
- McCarthy JF, Black MC. Partitioning between dissolved organic macromolecules and suspended particles; Effects on bioavailability and transport of hydrophobic organic chemicals in aquatic systems. In: Adams WJ, Chapman GA, Landis, editors. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment Vol. 10*, American Society of Testing and Materials, Philadelphia. 1988. pp. 233-246
- Neff J M. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment: Sources, Fate and Biological Effects*. London, Applied Science Publishers LTD. 1979.
- Nikkilä A, Kukkonen JVK. Effect of dissolved organic material on binding and toxicokinetics of pyrene in the waterflea *Daphnia magna*. *Arch Environ Cont Toxicol* 2001; 40: 333-338.
- Okay OS, Donkin P, Peters LD, Livingstone DR. The role of algae (*Isochrysis galbana*) enrichment on the bioaccumulation of benzo[a]pyrene and its effects on the blue mussel *Mytilus edulis*. *Environ Poll* 2000; 110: 103-113.
- Salloum MJ, Chefetz B, Hatcher PG. Phenanthrene sorption by aliphatic-rich natural organic matter. *Environ Sci Technol* 2002; 36: 1953-1958.
- Schrap SM, Opperhuizen A. Relationship between bioavailability and hydrophobicity: reduction of the uptake of organic chemicals by fish due to the sorption on particles. *Environ Toxicol Chem* 1990; 9: 715-724.

- Schwarzenbach R, Gschwend PM, Imboden DM. Environmental Organic Chemistry. John Wiley & Sons, New York, USA, 1993
- Servais P, Billen G, Garnier J, Idlafkih Z, Mouchel JM, Seidl M, Meybeck M. Chapitre 11: Carbone organique: origines et biodégradabilité. In: Meybeck M, de Marsily G, Fustec E. editors. La Seine en son bassin: fonctionnement écologique d'un système fluvial anthropisé Elsevier, Paris, 1998, pp. 483-529
- Servais P, Seidl M, Mouchel JM. Comparison of parameters characterising organic matter in a combined sewer during rain events and dry weather. Water Environ Res 1999; 71: 408-417.
- Spacie A, McCarthy LS, Rand GM. Bioaccumulation and bioavailability in multiphase systems. In: Rand GM editor. Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, environmental fate and risk assessment. Taylor & Francis, USA. 1995. pp. 493-521
- Stange K, Swackhamer DL. Factors affecting phytoplankton species-specific differences in accumulation of 40 polychlorinated biphenyls (PCBs). Environ Toxicol Chem 1994;13: 1849-1860.
- Suffet LH, Jafvert CT, Kukkonen JVK, Servos MR, Spacie A, Williams LL, Noblet JA. Synopsis of discussion session: influences of particulate and dissolved material on the bioavailability of organic compounds. In: Hamelink JL, Landrum PF, Bergman HL, Benson WH, editors. Bioavailability: Physical, Chemical and Biological Interactions. CRC Press. 1994. pp. 93-108
- Suzumura M, Kokubun H, Arata N. Distribution and characteristics of suspended particulate matter in a heavily eutrophic estuary, Tokyo Bay, Japan. Mar. Pollut. Bull. 2004; 49: 496-503.
- Tusseau-Vuillemin MH, Le Réveillé G. Le carbone organique biodégradable dans les eaux traitées des stations d'épuration du bassin de la Seine. Ingénieries 2001; 25: 3-12.
- Verrengia Guerrero NR, Taylor MG, Wider EA, Simkiss K. Influence of particle characteristics and organic matter content in the bioavailability and bioaccumulation of pyrene by clams. Environ Poll . 2003; 121: 115-122.
- Wang WX, Chow ATS. Benzo[a]pyrene absorption and exposure pathways in the green mussel *Perna viridis*. Environ Toxicol Chem 2002; 21: 451-458.
- Weber WJ, Voice TC, Pirbazari M, Hunt GE, Ulanoff DM. Sorption of hydrophobic compounds by sediments, solid and suspended solids - II: sorbent evaluation studies. Wat Res 1983; 10: 1443-1452.

ARTICLE 5

Semipermeable Membrane Device-availability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in river waters and wastewater treatment plant effluents

(Polycyclic Aromatic Compounds, 2004, Vol 24, pp. 805-824)

C. Miège¹, C. Gourlay², M.-H. Tusseau-Vuillemin³, D. Wang², S. Durand¹, J. Garric¹, J.-M. Mouchel²

¹Cemagref, 3 bis quai Chauveau, CP 220, 69336 Lyon Cedex 09, France. ²CEREVE, ENPC, 6-8, avenue Blaise Pascal, Cité Descartes, 77455 Marne La Vallée, France. ³Cemagref, Parc de Tourvoie, BP 44, 92163 Antony Cedex, France

ABSTRACT

River waters and wastewater treatment plant effluents contain hydrophobic organic compounds (HOCs) such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) which are persistent, bioaccumulative and dangerous for the environment. The biological risk assessment of HOCs requires the estimation of their bioavailable fraction in addition to the total contamination of the media. The bioavailability of HOCs depends on the characteristics of the aquatic environments. In particular, the presence of organic matter (OM) usually reduces the bioavailability of HOCs by trapping them and preventing them from crossing biological membranes.

The SPMD (Semi-Permeable Membrane Device) technique is used to evaluate bioavailable fractions of HOCs. We tested the influence of aquatic and more particularly OM characteristics upon the SPMD-availability of PAHs, in several river waters (up and downstream a big town) and in wastewater treatment plant effluents. 13 priority PAHs were analyzed in total water and in SPMDs. Aquatic environments were characterised for their pH, ionic strength, temperature, chlorophyll A and suspended solids contents. Total and dissolved OM were characterised for aromaticity, biodegradability, molecular weight and hydrophobicity. The total PAHs contamination increased downstream the river ; wastewater effluents were proven to be a source of SPMD-available PAHs. We attempted to establish relationships between the characteristics of organic matter and the SPMD-availability in order to initiate an aquatic environment typology : the SPMD-availability was negatively related to dissolved OM molecular weight and aromaticity and positively related to biodegradability.

Keywords

Semi-Permeable Membrane Device, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; Aquatic environment typology, River waters, Wastewater treatment plant effluents.

1 – INTRODUCTION

River waters and wastewater treatment plant effluents contain hydrophobic organic compounds (HOCs) such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) which are persistent, bioaccumulative and dangerous for the environment. The biological risk assessment of HOCs requires the estimation of their bioavailable fraction in addition to the total contamination of the media. The bioavailability of HOCs depends on the characteristics of the aquatic environments. In particular, HOCs may be bound by suspended or dissolved organic matter (OM), making them more mobile and less biodegradable by biological/chemical processes. The presence of OM usually also reduces the bioavailability of HOCs [1-4]. The generally accepted assumption, which can be referred to as the “free pollutant model” is that pollutants that are bound to OM are too large to cross biological membranes [5]. The intensity of interactions between OM and HOCs, and consequently the bioavailability of HOCs, depend on OM characteristics. However, the influence of environmental conditions on the bioavailability of HOCs need to be better understood.

The evaluation of bioavailable contaminants in situ remains very difficult because of (i) the influence of environmental conditions and (ii) the low concentrations found in real media. As a tool to sample and evaluate in situ bioavailable HOCs, Semi-Permeable Membrane Devices (SPMDs) have been developed by J.N. Huckins, J.D. Petty et al from the CERC (Columbia Environmental Research Center, Columbia, MO) in the beginning of the 90's [6,7]. SPMDs are passive sampling devices consisting of a tubular layflat low density polyethylene (LDPE) membrane with a 1000 daltons (about 10 Å) nominal molecular weight cutoff, and containing a thin film of a high-molecular weight lipid (triolein) which is a major non polar lipid found in aquatic organisms. The passive sampling is driven by membrane-lipid-water partitioning and can be applied to non ionic compounds with log Kow values > 1. Because nearly all environmental contaminants are only slightly smaller than 10 Å (1000 d), mainly truly dissolved organic contaminants diffuse through the membrane and are concentrated by the triolein [7]. Moreover, the cross-sectional diameters of biological membranes range from 4 to 45 Å [8]. Therefore the SPMD-available fraction of contaminants in the media is considered to be similar to the readily bioavailable fraction [7].

The most common applications of SPMDs are the determination of the presence, source and time-weight-average concentrations of HOCs in various aquatic environments (natural waters [9-11] or wastewater effluents [12,13]) and in the atmosphere [14,15]. They can also be used as surrogates for, or in addition to, biomonitoring studies to improve estimates of HOCs exposure [16,19] and to predict concentrations of specific contaminants in the tissues of organisms [11]. Recently, Leppänen et al [20] have tested the influence of sediments on HOCs bioavailability using SPMDs. Ravelet et al [21] used SPMDs in the laboratory to study the influence of various aquatic dissolved organic matters (DOM) on PAHs bioavailability.

In this study, we tested the efficiency of SPMD to concentrate PAHs in several contaminated environments, and we more particularly focused on the role of organic matter (OM) upon SPMD-availability of PAHs. SPMDs were deployed in river water (up and downstream a large town) and in wastewater treatment plant (WWTP) effluents. The EPA priority PAHs were analyzed in whole samples and in SPMDs. Aquatic environments were characterised for their pH, ionic strength, temperature, chlorophyll A and suspended solids contents. Total and dissolved

organic carbon were measured, and in order to initiate a typology of OM and assess its influence on PAH bioavailability, OM was characterised by its aromaticity assessed by its specific UV adsorption, biodegradability, molecular weight and hydrophobicity.

2 - MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemicals

Acetonitrile, acetone, dimethyl formamide, toluene, heptane of "pestipur" grade were obtained from SDS (Peypin, France). Heptane, methanol, acetonitrile, toluene, of LichroSolv grade were obtained from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q water system (Millipore, Molsheim, France). Standard nitrogen grade was obtained from Air Liquide (Paris, France). Filtrations were conducted on pre-combusted GF-F Whatmann glass fiber filter. Chromabond C18 6 ml / 2g cartridges (Macherey-Nagel, Hoerd, France) were used for river water extraction. Silica cartridges Chromabond 6 mL / 1 g (Macherey-Nagel, Hoerd, France) were used for SPMD purification. Priority PAHs at 10 mg.L⁻¹ in acetonitrile were obtained from Cil-Cluzeau (Ste Foy la Grande, France).

2.2. Characteristics of the aquatic environments

We have sampled 3 stations inside the Seine watershed : (i) Orgeval : a small forested river which is a tributary of the Grand Morin and Marne rivers, (ii) Saint-Maurice locks: immediately upstream of Paris, on the Marne river, (iii) Andrésy locks, on the Seine river, about 10 km downstream of the main wastewater treatment plant of Paris. We carried out with 2 measurement campaigns : in February and in April 2003.

In May 2003, we have sampled effluents of 4 WWTP near Lyon (France), having various capacities, influent origins and treatment processes. Their characteristics are as follows (theoretical daily) :

AS1 : capacity : 3500 p.e., daily load : 900 m³/j, 230 BOD₅ kg/j, activated sludge with continuous aeration, effluent of urban origin (domestic wastewaters and urban run-off), on the Saône river.

AS2 : capacity : 8000 p.e., daily load : 1600 m³/j, 430 BOD₅ kg/j, activated sludge, domestic wastewaters and urban run-off plus hand-craft and industrial effluents (food processing industries, chemistry), on the Rhône river.

BF1 : capacity : 45000 p.e., daily load : 9670 m³/j, 1800 BOD₅ kg/j, biofilters, with plated settling tanks, domestic wastewaters and urban run-off plus hand-craft and industrial effluents (food processing industries, chemistry), on the Saône river.

BF2 : capacity : 35000 p.e., daily load : 6000 m³/j, 2000 BOD₅ kg/j, biofilters, with plated settling tanks, domestic wastewaters and urban run-off plus hand-craft and industrial effluents (food processing industries, chemistry), on the Rhône river.

Aquatic environments were characterized by their pH, ionic strength, temperature, chlorophyll A and suspended solids contents. Total and dissolved organic carbon were also measured, and OM

was characterised by its aromaticity (assessed by specific UV adsorption), biodegradability (according to [22]), molecular weight and hydrophobicity (according to [21]).

Some aquatic environment parameters were not characterized with the same periodicity than the SPMD measurements. As for the study of the influence of the aquatic environments on the SPMD-availability (section 3.3.), we have to show data points when they were measured at the same time, this is the reason why the comparison of the SPMD measures with the suspended matter content or SUVA or biodegradable DOC leads to different number of data points in Figures 4, 5 and 6.

2.3. SPMD sampling

This passive in situ integrative sampling device was described in detail by Huckins [7].

We used standard SPMDs (0.96 cm long, 2.5 cm wide, 75-90 μm wall thickness, filled with 1 mL of triolein) obtained from Exposmeter (Tavelsjo, Sweden).

In order to avoid or limit biofouling, SPMD were dipped twice a week during 5 min in a copper sulfate solution (1 g/L), and gently wiped.

SPMDs were exposed in river water for 3, 7 and 21 or 14 days (first and second campaign respectively), with duplicate devices for each time of exposure, except for the first campaign in Andrésy (only 3 SPMD analyzed, no duplicate).

SPMDs were exposed during 3, 7 and, when possible, 14 days in treated wastewater, depending on the quality of the effluents. When biofouling was too important, devices were removed. We set 3 SPMDs in each site.

After exposure and before extraction, SPMDs were washed with a tissue impregnated with ultrapure water in order to remove sorbed particles and associated PAHs.

We proceeded with blanks with unexposed SPMD, and with SPMD exposed on site to the atmosphere (just during the setting and the removal of the SPMDs) in order to evaluate possible contamination while setting, removing or washing the devices.

2.4. PAH analytical procedure

2.4.1. Sample pretreatment

Extraction of water samples : As for rivers, two liters of raw water were filtered on pre-combusted GF-F Whatmann glass fiber filter (0.7 μm nominal pore diameter). PAHs adsorbed on suspended solids were retained in the filter which was extracted by Soxhlet (with 80 mL of heptane during 7 h). PAHs in filtered water were solid-phase-extracted using C-18 silica cartridges. Cartridges were conditioned with 6 ml of methanol and then 6 ml of milli-Q water. One liter of the filtered water was percolated. Elution was achieved with 6 ml of acetonitrile and 6 ml toluene.

As for effluents, they were liquid-liquid extracted (3 successive fold during 3 min checking with 50 mL of heptane / L of sample).

After addition of 250 μ L of dimethyl formamide to the extract, they were concentrated with a rotary evaporator (at 40 °C) and under nitrogen flow to 250 μ L. The final volume was adjusted to 1 mL with acetonitrile for HPLC injection.

Extraction by dialysis for SPMD samples and purification : SPMDs were extracted by dialysis in heptane for 48 h. Recoveries were previously tested with spiked SPMDs and they range from 91 to 111 % according to the PAH (n = 5, RSD < 9 %). The extract was evaporated with a rotary evaporator (at 40 °C) until 1 mL. It was then purified by percolation over a silica cartridge (preconditioned at 105 °C during 4 h and conditioned by percolation of 5 mL of a mixture of heptane/toluene (2/1)) and eluted with 10 mL of a mixture of heptane/toluene (2/1). After addition of 250 μ L of dimethyl formamide to the extract, heptane and toluene were evaporated with a rotary evaporator (at 40 °C) and under nitrogen flow. The final volume was adjusted to 1 mL with acetonitrile for HPLC injection.

2.4.2. HPLC analysis

The HPLC system consisted of a Kontron 422 S pump coupled with a Jasco FP 920 fluorescence detector (UVK-LAB Service, Trappes, France). A 250 x 3 mm Bakerbond PAH-16 Plus column including guard column was used (Machery Nagel, Hoerd, France). An Igloo-Cil oven (Interchim, Montluçon, France) was used for setting up the column temperature.

Acetonitrile and water were used as elution solvents at a flow rate of 1 mL.min⁻¹. The gradient elution program was : 60 % acetonitrile and 40 % water during the first 3 minutes, followed by a linear gradient up to 70 % acetonitrile after 17 min, followed by another linear gradient up to 100 % acetonitrile after 30 min, and isocratic elution with 100 % acetonitrile for 5 min. The column temperature was maintained at 30 °C. The fluorescence excitation and emission wavelengths were changed during the chromatographic separation in order to obtain better sensitivity. The excitation/emission wavelengths were set as follows : 280/340 nm from the acenaphthene to the anthracene elution, 280/430 nm from the fluoranthene to the chrysene elution and 285/460 nm from the benzo[b]fluoranthene to the indeno[123cd]pyrene elution.

The 16 priority PAHs were analyzed except naphthalene (because of its volatility and poor recovery after extraction), acenaphthylene (because it does not fluoresce) and phenanthrene (because of interfering compounds). Detection limits range from 4 pg injected for benz[a]anthracene and benzo[k]fluoranthene to 160 pg injected for indeno[123cd]pyrene.

The whole protocol including in situ sampling and laboratory analysis is summarized in Table 1.

Matières organiques et biodisponibilité des HAP

| Site | Type | Sampling Period | Duration, (number of replicates) | Water analysis (technique), (number of replicates) |
|------------|---|-------------------------|---|--|
| Orgeval | Small forest river | Feb. 03 | 3d (2), 7d (2), 21d (2) | Filtered water (SPE), particles (Soxhlet) (3) |
| St Maurice | Anthropic river upstream Paris | Feb 03 | 3d (2), 7d (2), 21d (2) | Filtered water (SPE), particles (Soxhlet) (3) |
| Andrésy | Anthropic river downstream Paris | April 03 | 3d (2), 7d (2), 14d (2) | Filtered water (SPE), particles (Soxhlet) (3) |
| | STP | Feb 03 | 3d (1), 7d (1), 21d (1) | Filtered water (SPE), particles (Soxhlet) (3) |
| | April 03 | 3d (2), 7d (2), 14d (2) | Filtered water (SPE), particles (Soxhlet) (3) | |
| AS2 | Small WWTP (domestic effl.) | May 03 | 3d (1), 7d (1), 14d (1) | Raw and filtered water (LLE, 1) |
| BF2 | Large WWTP (domestic /industrial effl.) | May 03 | 3d (2), 7d (1) | Raw and filtered water (LLE, 1) |
| BF1 | Large WWTP (domestic /industrial effl.) | May 03 | 3d (2), 7d (1) | Raw and filtered water (LLE, 1) |
| AS1 | Small WWTP(domestic /industrial effl.) | May 03 | 3d (1), 7d (1), 14d (1) | Raw and filtered water (LLE, 1) |

d : day ; SPE : solid phase extraction ; LLE : liquid-liquid extraction; effl.: effluents

Table 1 : Sampling and analytical protocols.

3 - RESULTS AND DISCUSSION

3.1. PAH concentrations in the total water compartment

Figure 1 shows the total high weight and low weight PAH concentrations for each site. We define PAHs with 3 aromatic cycles and $\log K_{ow}$ lower than 5 as low weight PAHs (Ace, Flu, Ant), and PAHs with more than 4 aromatic cycles and $\log Kow$ higher than 5 as high weight PAHs (10 PAHs, from Fla to IndP).

In WWTP effluents, high weight PAHs were mainly represented by Fla and Pyr (with similar concentrations). The 3 most hydrophobic PAHs (IndP, BghiP and DaA) were systematically absent. This can be explained by their absence or low concentration above the wastewater treatment plant and by lost by adsorption during the successive steps of the wastewater treatment.

Concentrations increase from Orgeval (the small forest river) to St Maurice and Andrésy (upstream and downstream of Paris), which reveals the influence of urban contamination. For river waters, we have found a higher level contamination during the first campaign, which can be explained by the household heating in winter that induces higher PAHs atmospheric emissions and then higher contamination of aquatic environments by precipitation or deposition.

The level of contamination of treated wastewaters and river waters are similar. Among the WWTP, the AS1 effluent is significantly less contaminated, whereas BF2 displays the highest

PAHs concentrations. However, due to its important treatment capacity (35000 p.e.), the PAH discharge to the river is by far the highest at BF2 (6000 m³.d⁻¹).

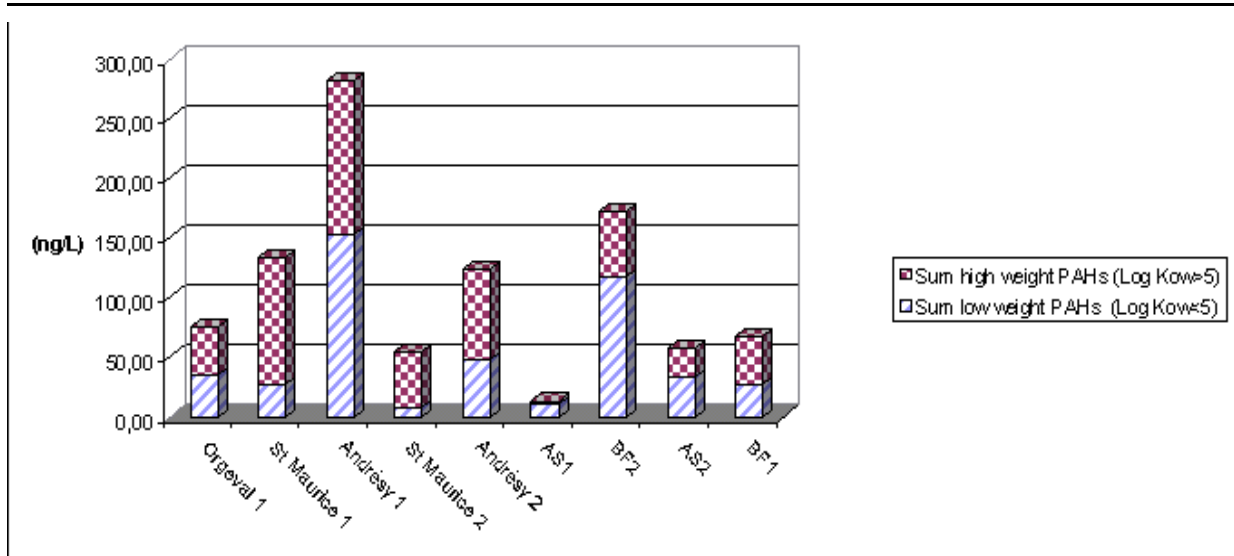


Figure 1 : Total PAH concentrations, 1 : first campaign in February, 2 : second campaign in April (with Orgeval dried up).

3.2. SPMD measurements

3.2.1. In situ SPMD sampling efficiency

The accumulation of HOCs in the SPMD can be simply modelled by considering that the system is reduced to two compartments with a diffusion process in between : the contaminated water and the whole SPMD (membrane and triolein) [7]. The accumulation rate into the SPMD is supposed proportional to the SPMD-available concentration in water (external) and the elimination rate from the SPMD is supposed proportional to the concentration in the SPMD (internal) :

$$\frac{dC_{PAH}^{SPMD}}{dt} = kuC_{PAH}^{water} - keC_{PAH}^{SPMD} \quad (1)$$

with : C_{PAH}^{SPMD} : the concentration of PAH in the SPMD (ng/g),

C_{PAH}^{water} : the SPMD-available concentration of PAH in water (ng/L),

ku : the accumulation rate constant (L.d⁻¹.g⁻¹),

ke : the elimination rate constant (d⁻¹).

During the first accumulation phase, the PAH elimination from SPMD is negligible and the accumulation increases linearly with time. After the second intermediary accumulation phase, the equilibrium is finally reached (phase 3).

SPMDs were exposed as described in the experimental part 2.3. Biofouling was limited in river waters and SPMDs were not damaged during the exposure, while previous experiments without copper treatment nor wiping showed a serious deterioration of the SPMDs. In sewage treatment plant outlets, we were forced to remove some SPMDs before the end of the 14 days exposure because of the hard exposure conditions (high water velocity, high suspended solids) and strong biofouling. Consequently SPMDs were exposed for only 7 days in BF2 and AS2 effluents.

During the first campaign in river, SPMDs were set during 21 days. But devices in Orgeval that were removed at 21 days contained systematically and significantly much lower quantities of PAHs than devices that were removed at 3 or 7 days. This can be explained by a possible PAHs photodegradation during exposure. Indeed, SPMDs were deployed right under the water surface because of the very low water level in Orgeval (about 30 cm deep). For the other sites, SPMDs were deployed at more than 1 meter deep, where light is very limited, which avoids most photodegradation processes. Therefore, the data obtained after 21 days exposure at Orgeval were not used in this study.

The mean relative standard deviation (RSD) among all PAHs replicates measurements was 18 %, and 75 % of RSD among replicates measurements were below 24 %, which is quite satisfactory. This deviation is comparable to RSD of PAHs in replicate SPMDs reported in other studies (6-31 % from [23] and 14-56 % from [19]). As shown in Figure 2, for the second campaign in St Maurice, accumulation was linearly increasing for all PAHs measured during the 14 days exposure period, with correlation coefficients (R^2) higher than 0.9. Linearity of the accumulation over a 14 days exposure period was also verified in Andrésy (second campaign), Orgeval (second campaign), AS1 and BF1 effluents. For BF2 and AS2 effluents, linearity was verified over a 7 days period because of the hard exposure conditions which forced us to remove SPMDs before 14 days.

The linear accumulation of PAHs can be described by the following equation :

$$C_{PAH}^{SPMD} \times M_{SPMD} = C_{PAH}^{water} \times R_s \times t \quad (2)$$

With : R_s : the uptake rate constant ($L \cdot d^{-1}$), i.e. the volume of water cleared per unit time, as defined by Huckins et al.

M_{SPMD} : the SPMD mass (g),

t : the exposure time (d).

Accordingly, we calculated the SPMD-available concentration of PAH in water as :

$$C_{PAH}^{water} = \frac{M_{SPMD} \cdot C_{PAH}^{SPMD}}{R_s \cdot t} \tag{3}$$

Rs values depend on the contaminant, the SPMD size as well as environmental conditions. They are estimated for each compound from laboratory calibration. In this study, we used the R_s values for PAHs determined for standard SPMDs by Huckins at 10 °C for river waters and 18 °C for effluents [24].

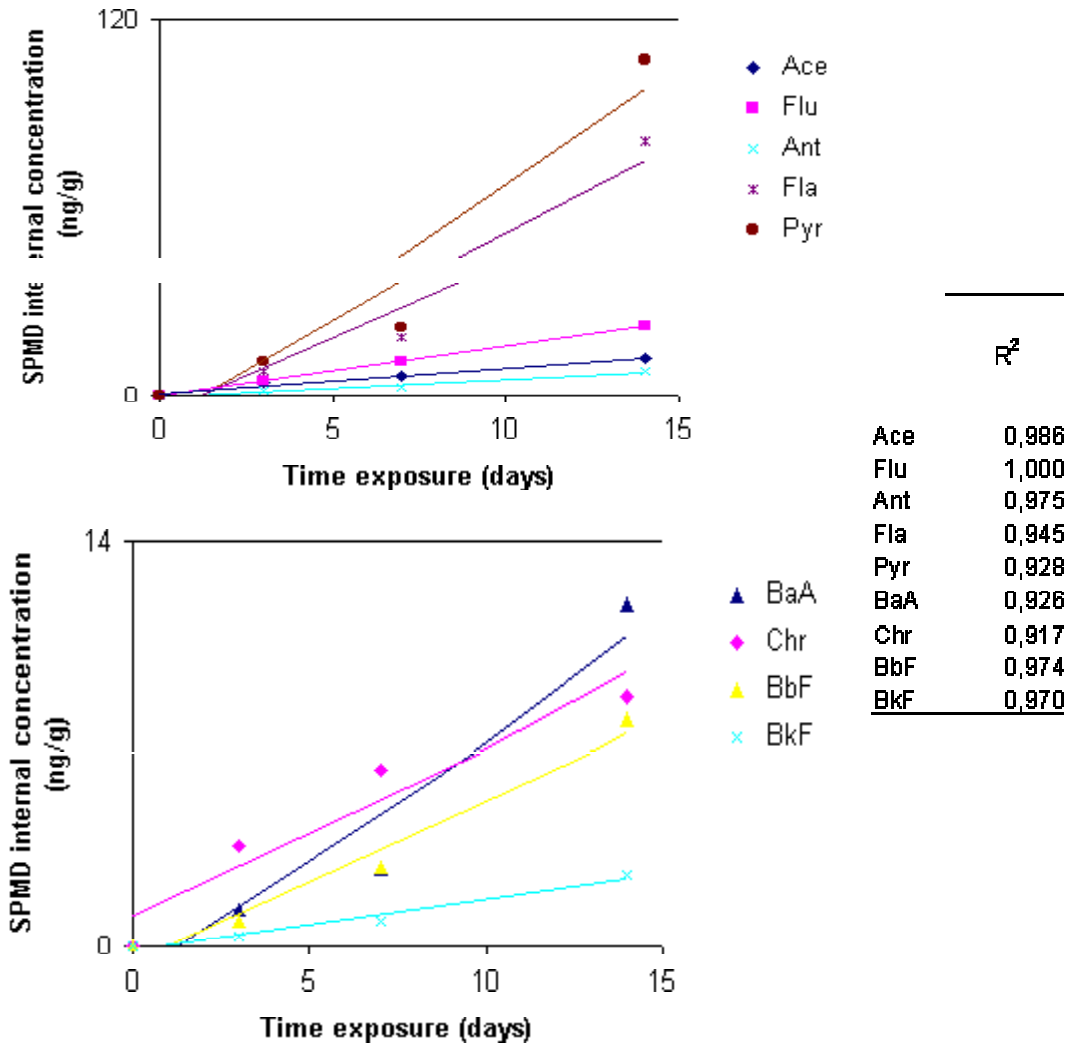


Figure 2 : Accumulation curves in St Maurice (second campaign) and correlation coefficients (R^2).

SPMD-available concentrations of PAHs should be lower than the total concentrations, but this was not always in accordance with our results (as seen in Figure 3) : the SPMD-available concentration of PAH represented 50 to 450 % of the total concentration in the water. This phenomenon was already observed elsewhere. Stuer-Lauridsen et al [23] found that the SPMD-available concentration of PAHs in water represented 30 to 437 % of the total concentrations as

measured by liquid-liquid extraction in wastewater. Axelman [19] also observed that the SPMD-water concentration may represent up to 9 to 10 fold the concentration of PAH in the water.

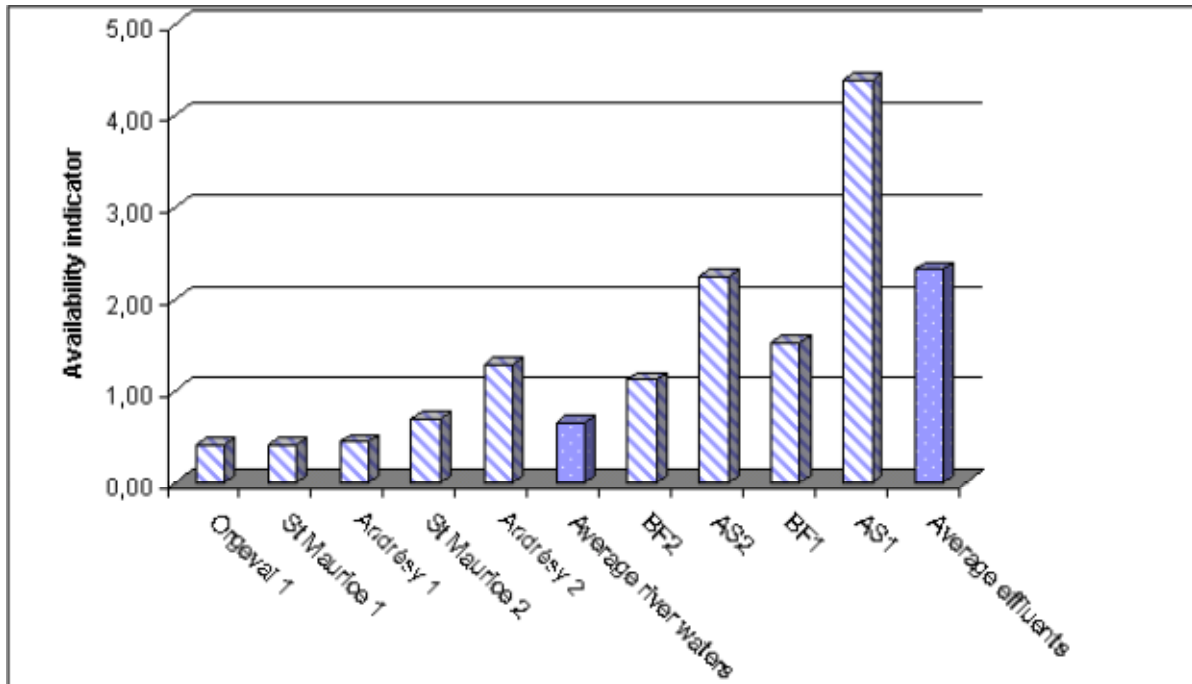


Figure 3 : Availability indicator (ratio SPMD-available concentration / total PAH concentration) and average values in river waters and effluents.

These unexpected results could be explained by the time averaged concentrations obtained from SPMDs that are compared with average concentrations obtained from several instantaneous samplings. Indeed, during the exposure time, we observed a high RSD among PAHs concentration from successive instantaneous samplings (up to 34 % for the sum of the 13 PAHs in Andréy, second campaign). Another possible explanation is that the R_s values proposed by Huckins et al. might not be applicable with the exposure conditions encountered in these studies. They might be underestimated and then they lead to overestimated SPMD-available concentrations (from equation 3). It is just like our SPMDs were able to concentrate much more PAHs than what was predictable from reported R_s coefficients. Actually, in previous well controlled laboratory experiments devoted to 5 selected PAHs, we found higher R_s values [25]. The reason for the observed discrepancies is however unclear. Temperatures and water velocity may influence the kinetic of PAH accumulation inside the device, but available experimental data do not allow to extrapolate R_s values for any temperature or agitation conditions. Temperatures in river water were in the range from 5 to 11 °C and 14 to 20 °C for effluents, which is generally lower than the reference temperature studied by Huckins (10 °C and 18 °C respectively used for river waters and effluents). Since R_s coefficients are expected to increase with temperature, this factor cannot be retained as a possible explanation. Previous work [26] indicated that a 50 times increased shear flow along the SPMD surface by (from 0.01 to 0.50 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) induces only a slightly higher sampling rates R_s for the higher K_{ow} PAHs (from 8 % for pyrene to 40 % for benzo[b]fluoranthene), and no significant R_s increase for the lower K_{ow} PAHs.

As linearity and repeatability are satisfying, and since biofouling was avoided, we conclude that Huckins values cannot be directly used in our study to obtain quantitative results, but that SPMD nevertheless behaved as expected with a linear accumulation.

Nevertheless, in order to provide standardized results, SPMD-available concentrations were computed using the R_s values proposed by Huckins et al.

3.2.2. SPMD-availability in river waters and WWTP effluents

In this paragraph, results are presented as a unit-less ratio (SPMD-available concentration / total PAH concentration) in order to keep into account the level of contamination in total water samples. Because possibly higher than 1, this ratio is not representative of a real fraction of SPMD-available PAHs inside the total water compartment, we shall simply call it availability indicator of PAHs. The higher the indicator, the more the PAHs are SPMD-available and the more the PAHs are possibly available to aquatic organisms.

Figure 3 shows the indicator values for the sum of the 13 PAHs and for each site. The average availability indicator in treated wastewater is much higher than what was obtained for the river water, while the total PAH concentration was approximately the same for both types of aquatic environment, as previously observed (part 3.1). The different factors which could explain such a behavior need to be explored.

3.3. Influence of the exposure characteristics upon the SPMD-availability of PAHs.

In order to initiate a typology of the exposure characteristics according to their influence on the PAH availability to SPMD concentration, correlations between these characteristics and the availability indicators were tested. Exposure characterization was based on water pH, temperature, conductivity, water velocity and suspended matter content. Dissolved and particulate organic matter was measured and OM was characterized for its aromaticity (by SUVA₂₅₄, ie UV₂₅₄/ DOC), and biodegradability. We also carried out experiments in the laboratory to study the influence of the size (molecular weight) and hydrophobicity of OM.

The mean values for each of the descriptors for river waters and for wastewater effluents are reported in Table 2. Temperature, chlorophyll a content and SUVA were not measured in WWTP effluents, but some authors reported SUVA values (measured at 260 nm) ranging from 11 to 19 cm⁻¹.g⁻¹.L according to the treatment [27,28]. M.F. Dignac et al [29] measured a SUVA value (at 254 nm) of 23 in the effluents of the WWTP of Compiègne (near Paris, France). These values are similar to ours in river waters.

We observe that conductivity, suspended matter, total, dissolved and biodegradable organic carbon are significantly higher in effluents.

Matières organiques et biodisponibilité des HAP

| | pH (is) | Conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$ à 25°C) | T° ($^\circ\text{C}$) | Susp. matter (mg/L) | TOC (mg/L) | DOC (mg/L) | Suva ₂₅₄ ($\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{L}$) | Biodeg. DOC (% DOC) |
|------------------------|------------|--|----------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------|--|------------------------|
| Mean values for | | | | | | | | |
| river waters | 7,7 | 547 | 6,8 | 14,71 | 4,93 | 3,35 | 21,67 | 21 % |
| Standard deviations | 0,7 | 177 | 2,1 | 4,66 | 1,38 | 0,98 | 5,30 | |
| Mean values for | | | | | | | | |
| effluents | 7,8 | 1173 | nm | 41,56 | 22,10 | 16,39 | nm | 49 % |
| Standard deviations | 0,2 | 199 | nm | 29,00 | 11,03 | 9,71 | nm | |
| | = | # | / | # | # | # | / | # |

nm : not measured, SUVA : ABS 254 nm/DOC
Table 2 : Mean values and standard deviations for some descriptors of river waters and wastewater effluents.

According to the free pollutant model, bioavailability should decrease with the increase of suspended matter, total and dissolved organic carbon, which is not in accordance with Figure 4. At this step, we can wonder if these 3 quantitative descriptors are determining. Perhaps, they have combined effects ? The well-known solubilization effect of PAHs with the increase of OM content in water may induce an increasing SPMD-availability if these are small size OM that can pass through the SPMD membrane. Qualitative descriptors (aromaticity, biodegradability, hydrophobicity, size) are perhaps more representative of matrix influence upon bioavailability : with regard to the fraction of biodegradable organic carbon, it is higher in effluents, and this can explain the higher SPMD-availability in effluents. Indeed, this descriptor is often correlated with a small size of OM (then less steric obstruction when crossing the biological membrane) or a low aromaticity of OM (then weaker interactions with PAHs). It is just like there are some intra-matrix descriptors (i.e. applicable inside one kind of matrix, as for the quantitative ones) and inter-matrices descriptors (applicable whatever the kind of matrix, as for the qualitative ones). Below, we have chosen to study these 2 kinds of matrices separately.

3.3.1. Influence of physical and chemical- descriptors

We did not observe any correlation between the SPMD availability indicator and pH, conductivity or temperature, whereas some correlations are brought to the fore with the suspended solids concentration.

As shown in Figure 4, the SPMD-availability indicator decreases when the suspended solids concentration increases in effluents and river waters. This can be explained by the free pollutant model since PAHs trapped by suspended matter become less available. This trend must be confirmed with more values. Since this descriptor seems to be applicable inside one kind of matrix (intra-matrix descriptor), it must be considered as a secondary descriptor in the typology.

3.3.2. Influence of organic matter

On the one hand, we did not find any correlation between SPMD availability and TOC, DOC or chlorophyll A content (not enough data in this case). On the other hand, we observed in river waters a decreasing SPMD-availability while OM aromaticity (measured by SUVA) increased

(Figure 5). We verified in situ that aromatic organic matter reduces the availability of contaminants, since aromatic structures in OM may form hydrophobic sites for PAH binding. This phenomenon was already observed in various studies in the laboratory [30,31,32]. In river and effluents, the availability indicator also increases when biodegradable DOC decreases (Figure 6). From [33], we know that SUVA and biodegradable carbon content are correlated : a high value of biodegradable carbon content induces a low SUVA (a low aromatic content).

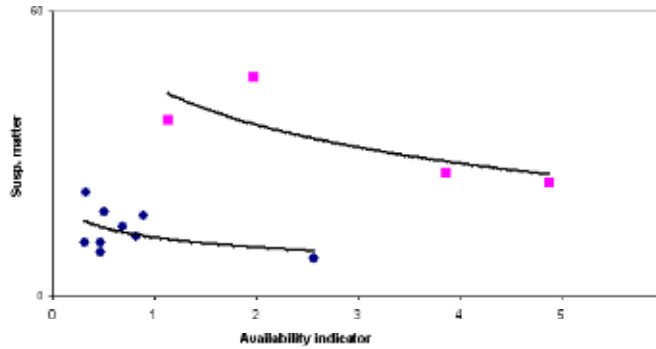


Figure 4 : Influence of the suspended matter content (mg/L) on the availability indicator, in river waters (o) and WWTP effluents ().

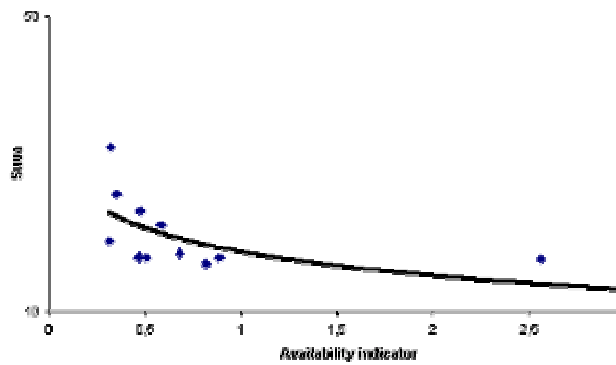


Figure 5 : Influence of SUVA ($cm^{-1}.g^{-1}.L$) on the availability indicator, in river waters (SUVA was not measured in effluents).

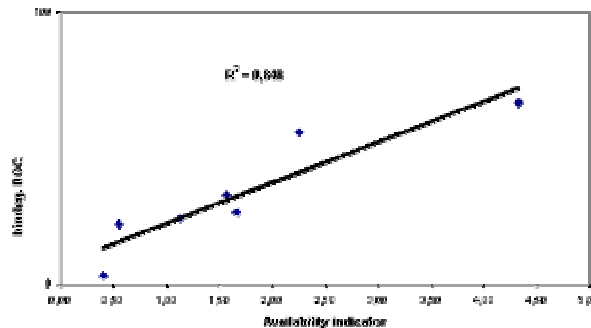


Figure 6 : Influence of biodegradable DOC (% DOC) on the availability indicator, measurements were conducted in rivers and effluents.

We also made some experiments in the laboratory with various DOM characterized by a large range of average molecular weight (Mw), from 610 to 4100 daltons [21]. They are listed on the abscissa of Figure 7. The availability indicator for BaP is reported on the ordinate, in tap water spiked with the DOM at 10 mg/L. We first note that in well-controlled laboratory conditions, the availability indicators are always lower than 1. We observe that the availability indicator increases with the decrease of the average molecular weight. This is in agreement with the free pollutant model : small structures, when they interact with PAHs, induce less steric obstructions when crossing the SPMD membrane than large OM. We also know that lower Mw is correlated with higher biodegradable content and lower aromaticity.

Until now, we did not find any interesting results with the OM hydrophobicity.

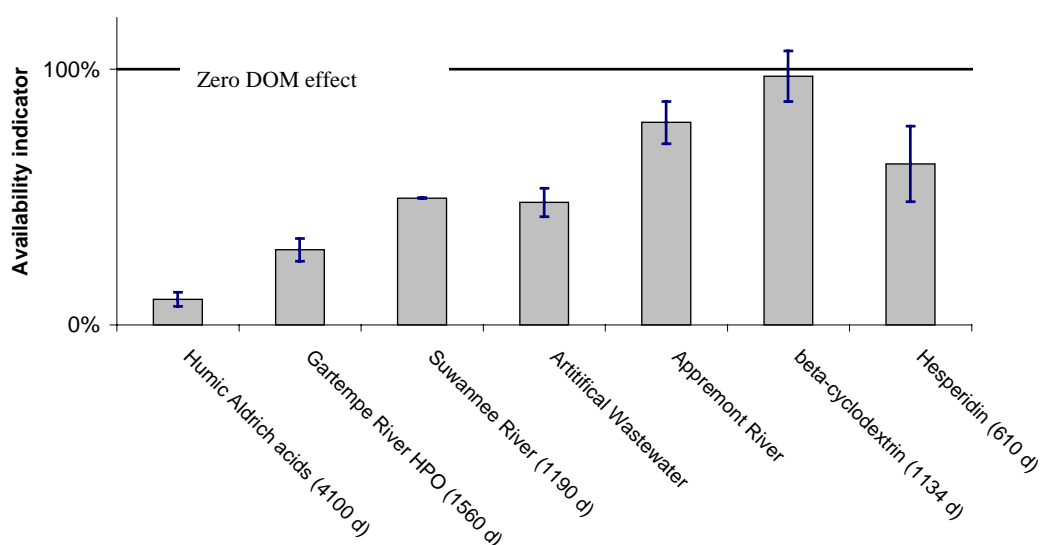


Figure 7 : Influence of average molecular weight Mw (dalton) on the BaP availability indicator, measurement in tap water spiked with 10 mg/L DOM, from [21].

3.4. Conclusion

SPMDs were deployed in various river and sewage treatment plant waters in order to sample bioavailable PAHs in addition to PAHs in the total water. Although this technique may lead to overestimated SPMD-available concentrations in water, it is used as a new tool to understand the influence of aquatic environments on the bioavailability of organic pollutants.

From the in situ experiments, wastewater effluents seems to be a source of SPMD-available PAHs. Whatever the kind of aquatic environment, the SPMD-availability tends to be positively related to the biodegradability and negatively related to the aromaticity of DOM. When considering river waters or WWTP effluents separately, suspended matter content increases while the SPMD-availability decreases. All these tendencies are in good accordance with the free pollutant model but they must be confirmed with more points in other rivers and effluents. The influence of the average OM molecular weight must be confirmed in situ and the OM hydrophobicity must be still studied (in the laboratory and in situ).

Although interesting results regarding factors affecting availability have been obtained, it should be kept in mind that the behaviour of SPMD in situ is still poorly understood since numerous availability indicators higher than one have been obtained. Since the SPMD measurements are dependent of the accumulation kinetic (or R_s dependent) and then strongly influenced by environmental conditions (temperature and water velocity), it is still debatable to compare different sampling points. A significant effort should be made in the future to better assess the SPMD in situ behavior. Reference compounds placed inside the SPMD before exposure may be a valuable way to evaluate in situ R_s values, according to the simple two-compartment model commonly used. However, more work should also be devoted to the in situ behavior of the membrane, and to its possible long-term interactions with dissolved or adsorbed organic matter.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Piren Seine working group for their financial support. We also thank Catherine Lorgeoux and Mohammed Saad from CEREVE and Amandine Pinel from Cemagref for their efficient participation during the in situ campaigns. We finally thank Mr Arnaud Denis from Le Grand Lyon for kindly ensuring the access to WWTP during the effluents sampling.

REFERENCES

- [1] Mc Carthy J.F. 1983. Role of particulate organic matter in decreasing accumulation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Daphnia magna*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 12:559
- [2] Kukkonen J.V.K., Mc Carthy J.F., Oikari A. 1990. Effects of XAD-8 fractions of dissolved organic carbon on the sorption and bioavailability of organic micropollutants. *Environ. Contam. Toxicol.* 19:551
- [3] Akkanen J., Penttinen S., Haitzer M., Kukkonen J.V.K. 2001. Calibrating and field verification of semipermeable devices for measuring polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Environ. Toxicol. Chem.* 20(10):2303
- [4] Haitzer M., Akkanen J., Steinberg C., Kukkonen J.V.K. 2001. Calibrating and field verification of semipermeable devices for measuring polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Chemosphere.* 44(2):165
- [5] Landrum P.F., Reinhold M.D., Nihart S.R., Eadie B.J. 1985. Predicting the bioavailability of organic xenobiotics to *Pontoreia hoyi* in the presence of humic and fulvic materials and natural dissolved organic matter. *Environ. Toxicol. Chem.* 4:459
- [6] Huckins, J. N., W., T. M., Manuweera G. K. 1990. Semipermeable membrane devices containing model lipid : a new approach to monitoring the bioavailability of lipophilic contaminants and estimating their bioconcentration potential. *Chemosphere.* 20(5):533
- [7] Huckins, J. N. 1993. Lipid-containing semipermeable membrane devices for monitoring organic contaminants in water. *Environmental Science and Technology.* 27:2489.
- [8] Timbrell J. A. 1991. Principles of biochemical toxicology, Taylor and Francis ed., 2nd edition, London, chap.3, 27
- [9] Lebo J. A., Zajicek J. L., et al. 1992. Use of semipermeable membrane devices for in situ monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic environments. *Chemosphere.* 25(5):697

- [10] Bennett E. R., Metcalfe T. L., et al. 1996. Semi-permeable membrane devices (SPMDs) for monitoring organic contaminants in the Otonabee river, Ontario. *Chemosphere*. 33(3):363
- [11] Petty J. D., Poulton B. C., et al. 1998. Determination of bioavailable contaminants in the lower Missouri River following the flood of 1993. *Environ. Sci. Technol.* 32(7):837
- [12] Stuer-Lauridsen F., Kjolholt J. 2000. Identification of selected hydrophobic organic contaminants in wastewater with semipermeable membrane devices (SPMDs). *Water Research*. 34(13):3478
- [13] Rohr A. C., Hall E. R., et al. 1996. Use of semipermeable membrane devices for monitoring pulp mill effluents : a preliminary assessment. *Water Quality Research J. Canada*. 31(1):85
- [14] Soderstrom H. S., Bergqvist P. A. 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons in a semiaquatic plant and semipermeable membrane devices exposed to air in thailand. *Environ. Sci. Technol.* 37:47
- [15] Ockenden W. A., Corrigan B. P., et al. 2001. Further developments in the use of semipermeable membrane devices as passive air samplers. *Environ. Sci. Technol.* 35:4536
- [16] Peven C. S., Uhler A. D., Querzoli F. J. 1996. Caged mussels and semipermeable membrane devices as indicators of organic contaminant uptake in Dorchester and Duxbury bays, Massachusetts. *Environ. Toxicol. And Chem.* 15(2):144
- [17] Roe Utvik T. I., Johnsen S. 1999. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the north sea. *Environ. Sci. Technol.* 33:1963
- [18] Moring B. J., Rose D. R. 1997. Occurrence and concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in semipermeable membrane devices and clams (*Corbicula fluminea*) in three urban streams of the Dallas-Fort worth metropolitan area, Texas. *Chemosphere*. 34(3):551
- [19] Axelman J., Naes K., Näf C., Broman D. 1999. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in semipermeable membrane devices and caged mussels (*Mytilus Edulis L.*) in relation to water column phase distribution. *Environmental Toxicol. And Chem.* 18(11):2454
- [20] Leppänen, M. T., Kukkonen J. V. K. 2000. Effect of sediment-chemical contact time on availability of sediment-associated pyrene and benzo(a)pyrene to oligochaete worms and semi-permeable membrane devices. *Aquatic Toxicology*. 49:227
- [21] Ravelet C., Miège C., Croué J-P., Garric J. 2003. Influence of Dissolved Organic Matter (DOM) on the PAH bioavailability : Kdoc determination by SPMD and correlations with different descriptors. In prep for *Water Research*.
- [22] Tusseau-Vuillemin M-H., Dispan J., Mouchel J-M., Servais P. 2003. Biodegradable fraction of organic carbon estimated under oxic and anoxic conditions. *Water Research*. 37(9):2242
- [23] Stuer-Lauridsen F., Kjolhot J. 2000. Identification of selected hydrophobic organic contaminants in wastewater with semipermeable membrane devices (SPMDs). *Water Research*. 34(13):3478
- [24] Huckins J. N., Petty J. D., et al. 1999. Determination of uptake kinetics (sampling rates) by lipid-containing semipermeable membrane devices (SPMDs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water. *Environ. Sci. and Technol.* 33:3918
- [25] Miège C., Ravelet C., Nesa C., Croué J-P., Garric J. 2003. The use of Semi-Permeable Membrane Device (SPMD) to evaluate the Kdoc of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). In prep for *Anal. Chim. Acta*.
- [26] Luellen D. R., Shea D. 2002. Calibrating and field verification of semipermeable devices for measuring polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Environ. Sci. and Technol.* 36:1791
- [27] Imai A., Fukushima T., Matsushige K., Kim Y.H.. 2001. Fractionation and characterization of dissolved organic matter in a shallow eutrophic lake, its inflowing rivers, and other organic matter sources . *Water Res.* 35(17):4019
- [28] Imai A., Fukushima T., Matsushige K., Kim Y.H., Choi K. 2002. Characterization of dissolved organic matter in effluents from wastewater treatment plants. *Water Res.* 36:859

- [29] Dignac M.F. 1998. Caractérisation chimique de la matière organique au cours du traitement des eaux usées par boues activées. Ph.D thesis. Paris VI, University, France.
- [30] Chin Y.-P., Aiken G. R., Danielsen K. M. 1997. Binding of pyrene to aquatic and commercial humic substances: The role of molecular weight and aromaticity. *Environ Sci Technol.* 31(6):1630
- [31] Mc Carthy J-F., Roberson L.E., Burrus L.W. 1989. Association of benzo(a)pyrene with dissolved organic matter : prediction of KDOM from structural and chemical properties of the organic matter. *Chemosphere.* 19:1911
- [32] Smith J.A., Witkowski P.J., Chiou C.T. 1988. Partition of nonionic organic compounds in aquatic systems. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 103:127
- [33] Gourlay C., Tusseau-Vuillemin M-H., Garric J., Mouchel J-M. 2003. The ability of dissolved organic matter (DOM) to influence benzo[a]pyrene bioavailability increases along DOM mineralization. In prep for *Ecotoxicology and Environmental Safety*

Résumé

Les écosystèmes aquatiques sont un récepteur privilégié des micro-polluants. Ils contiennent aussi des matières organiques (MO), d'origine naturelle ou anthropique. Les interactions entre les contaminants et les MO déterminent en grande partie la biodisponibilité des polluants dans le milieu aquatique. Ce travail s'intéresse à l'influence des MO des milieux anthropisés sur la biodisponibilité des polluants organiques hydrophobes. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), présents principalement dans les milieux urbains, ont été choisis comme modèles de contaminants.

Dans les milieux anthropisés, certaines MO sont sujettes à la dégradation bactérienne. Alors que de nombreux travaux par le passé ont été consacrés à l'étude des interactions entre les contaminants et les MO humiques, essentiellement non dégradables, en caractérisant les MO d'un point de vue physico-chimique, la biodégradabilité a été choisie comme point d'entrée pour ce travail. Nous faisons en effet l'hypothèse que l'affinité des contaminants pour la MO évolue au cours de sa dégradation, et qu'ils sont susceptibles d'être relargués sous forme biodisponible dans le milieu durant la biodégradation, puis d'être à nouveau fixés le cas échéant sur les sous-produits de la biodégradation.

Au laboratoire, la biodisponibilité des HAP a été évaluée par mesures de bioaccumulation dans *Daphnia magna*. L'influence de la matière organique sur la biodisponibilité des HAP, l'évolution de cette influence au cours de la minéralisation bactérienne et le fort potentiel de fixation des sous-produits de dégradation ont été mis en évidence. Une modélisation de ces phénomènes a été proposée. Ces résultats concernant l'effet des MO urbaines et naturelles ont ensuite été confrontés aux mesures de la biodisponibilité des HAP in situ, dans le bassin de la Seine., obtenues par l'usage de membranes Semi-perméables (SPMD).

Mots-clés

Biodisponibilité - HAP - Matière Organique - Biodégradation – rejets urbains – algues – modèle de qualité de l'eau - SPMD

Abstract

Aquatic ecosystems receive micro-pollutants. They also contain organic matter (OM) of natural and anthropogenic origins. The contaminant bioavailability in aquatic media is determined by the interactions between contaminants and OM.

This work deals with the influence of organic matter from anthropogenic media on the bioavailability of hydrophobic organic pollutants. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) have been used as model contaminants, since they are widely spread in urban media.

In anthropogenic media, some OM may be biodegraded. Up to now, most researches focused on the interactions between contaminants and humic OM that are mostly non-degradable, using physico-chemical characterizations of OM. On the contrary, in this work, the biodegradability of OM was deliberately taken into account. Indeed, we assume that the contaminant affinity for OM evolves during OM biodegradation, so that pollutants may be released in a bioavailable form and then may be bound again by biodegradation sub-products.

In laboratory evaluation, PAH bioavailability was assessed through the measurements of the bioaccumulation in *Daphnia magna*. The influence of organic matter on the bioavailability of PAHs and the evolution of this influence along OM bacterial mineralization were proved, as well as the strong binding efficiency of degradation by-products. A model of observed phenomena was elaborated.

These observations about urban and natural OM effect were compared to in situ PAH bioavailability measurements in the river Seine basin. In this case, the bioavailability was estimated using Semi-Permeable Membrane Device (SPMD) sampling technique.

Key-words

Bioavailability – PAHs – Organic matter – Biodegradation – urban effluents – algae – Water quality model – SPMD