



HAL
open science

Des cycles biogéochimiques à l'évaluation du risque écotoxicologique

Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin

► **To cite this version:**

Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin. Des cycles biogéochimiques à l'évaluation du risque écotoxicologique. Géologie appliquée. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2005. tel-00085877

HAL Id: tel-00085877

<https://theses.hal.science/tel-00085877>

Submitted on 17 Jul 2006

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.

Mémoire présenté par Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin pour l'obtention de
l'habilitation à diriger les recherches

sous la direction de monsieur le professeur Ghislain de Marsily
Université Paris VI.
Septembre 2005.

AVANT-PROPOS.

Avant de décrire mon activité de recherche, je rappelle brièvement les différents contextes dans lesquels elle s'est déroulée.

Une première expérience marine.

J'ai eu la chance de pouvoir effectuer une formation complémentaire par la recherche, de 1991 à 1996, après avoir obtenu mon diplôme d'ingénieur du Génie Rural, des Eaux et Forêts. Attirée par l'océanographie, je proposai en effet à la commission des spécialistes du corps, de réaliser une thèse sur le devenir biogéochimique des sels nutritifs apportés par le Rhône au Golfe du Lion. Ce couplage entre les activités agricoles continentales, à l'origine d'une partie de la pollution azotée et les conséquences en milieu littoral rentrait à l'époque dans les objectifs du corps et j'ai pu entreprendre mon DEA puis ma thèse à l'Institut de Biogéochimie Marine, sous la direction de Jean-Marie Martin.

Le titre final de la thèse apparaîtrait, comme souvent, un peu restrictif par rapport à l'objectif initial : « Modélisation des variations saisonnières des cycles biogéochimiques dans le Golfe du Lion »... On y trouvera une analyse temporelle des flux de nitrate et d'ammoniaque déversés par le Rhône dans le Golfe du Lion sur la période 1970-1990, le développement d'un modèle biogéochimique uni-dimensionnel, puis la mise en œuvre de ce modèle en trois dimensions, le Golfe du Lion étant décrit par un domaine limité au nord-ouest par la côte, ouvert à l'est et au sud sur la Méditerranée. Les processus décrits comprennent la production primaire (limitée par l'azote et la silice pour les diatomées) et la reminéralisation par la dégradation bactérienne hétérotrophe. Inséré dans le modèle de circulation générale du Laboratoire d'Océanographie DYnamique et du Climat, OPA, ce modèle a permis de simuler, en trois dimensions et à l'échelle annuelle, la répartition de la production primaire dans le Golfe du Lion et d'évaluer l'importance relative des sources d'azote continental, océanique et diagénétique. Une partie de ce travail de thèse était intégrée dans le projet européen CEcoSEcoM (Coupled Ecological and Socio-Ecological Modeling), coordonné par Jean-Marie Mouchel.

Cette thématique se trouvant au cœur d'un nouvel appel d'offres de la commission européenne, dans le cadre de l'initiative ELOISE (European Land Ocean Interaction StudiEs), j'ai tenté moi-même l'expérience en 1995 en proposant le projet GLAMoR (Gulf of Lions Advanced MOdeling Research). Ce petit projet (trois équipes de modélisateurs : le Laboratoire d'Océanographie Dynamique et du Climat, le Netherlands Institute of Ecology et l'Institut de Biogéochimie Marine) se fixait pour objectif de développer un modèle biogéochimique du Golfe du Lion, en trois dimensions, couplé à un modèle diagénétique spatialisé. De plus, différentes techniques numériques de couplage et de maillage devaient être évaluées. Très bien évalué scientifiquement, ce projet s'est néanmoins trouvé pris dans un mouvement complexe de refonte avec un autre projet beaucoup plus important et diversifié, comportant également des aspects de modélisation. En 1996, le projet résultant, METRO-Med, coordonné par C. Anagnostou, du NRC de Thessalonique peut enfin démarrer. La dissolution de l'Institut de Biogéochimie Marine intervenant peu après, le corps du GREF a rapidement souhaité ma réintégration dans un poste plus classique (chef du service des affaires rurales de la Direction Départementale de l'Agriculture de Saint-Lô, Manche) et a finalement accepté que j'intègre en 1997 le Cemagref, dans l'unité de recherche Qualité et Fonctionnement Hydrologique des Systèmes Aquatiques, alors dirigée par G. Sachon. Bien que je ne puisse plus y travailler directement, le projet METRO-Med s'est néanmoins déroulé, réalisé en ce qui concernait mes activités par deux post-doctorantes (C. O'Riordan et M.-P. Bonnet), avec qui j'ai eu mes premières expériences d'encadrement de la recherche.

Les eaux usées et douces au Cemagref.

Le Cemagref, « jeune » EPST, possède une longue expérience dans le domaine du traitement des eaux usées, ainsi que sur l'observation de la faune et de la flore du milieu aquatique pour établir des indices de qualité. Paradoxalement, peu d'activités portaient à l'époque de mon recrutement sur la chimie des rejets des stations d'épuration et l'impact qu'ils pouvaient avoir sur le milieu naturel. C'est la mission qui m'a été confiée, avec assez peu de moyens puisque je ne rejoignais pas une équipe constituée, mais que j'avais à la développer.

Ne disposant plus de mes outils ni de mes collaborations habituelles, j'ai eu la chance de pouvoir m'intégrer dans le programme PIREN Seine, ayant déjà collaboré avec quelques-uns des chercheurs. J'ai proposé d'y étudier les apports de matière organique biodégradable des stations d'épuration sur l'ensemble du bassin de la Seine. Les techniques à mettre en œuvre étaient en effet assez simples pour être prises en main par une chimiste néophyte, et ces apports constituaient l'une des conditions aux limites des modèles biogéochimiques de qualité de la Seine, qui ressemblaient beaucoup à ceux avec lesquels j'avais travaillé. Ce faisant, j'ai pu encadrer des étudiants (DEA, DES), travailler en lien avec l'équipe « épuration » de mon unité de recherche et acquérir une partie de leurs compétences.

Cherchant à valoriser mon expérience en modélisation avec mes nouveaux collègues, nous avons proposé, avec Alain Héduit (directeur de recherches en épuration) et Paul Lessard (professeur à l'université Laval, Québec), un sujet de thèse portant sur la modélisation du procédé boues activées à très faible charge par temps de pluie. Les processus d'épuration des eaux usées sont en effet décrits par des modèles numériques formalisés dans les années quatre-vingt, fort semblables à ceux qui décrivent la biogéochimie du carbone et de l'azote dans le milieu naturel. Les objectifs de la thèse (co-financée par le Cemagref et le conseil régional d'Ile de France), réalisée de 1999 à 2003 par Fabienne Lagarde, et que j'ai co-encadrée, étaient d'évaluer la pertinence de ces modèles, dont les paramètres sont calés sur des données obtenues par temps sec, pour les simulations des surcharges par temps de pluie, et d'utiliser ces simulations pour optimiser la gestion des systèmes d'assainissement. Les surverses d'eaux usées non traitées par temps de pluie occasionnent en effet des consommations brutales d'oxygène dans le milieu naturel, dont la concentration descend parfois sous le seuil de survie de certaines espèces de poisson. Cette thèse a été l'occasion de transférer une méthodologie classique de la biogéochimie (l'établissement de bilans de masse, de flux de matière à différentes échelles) au domaine de l'épuration, pour parvenir à une analyse fine des contraintes posées par la gestion du temps de pluie. C'était également l'occasion d'aller plus loin dans la caractérisation de la matière organique biodégradable en utilisant les techniques respirométriques, qui permettent d'évaluer les cinétiques de dégradation des substrats.

Je travaillais jusqu'alors essentiellement sur la demande biologique en oxygène associée à ces rejets de matière organique biodégradable d'origine urbaine. M'intéressant aux recherches menées par certains de mes collègues du Cemagref, en écotoxicologie, j'en vins à considérer que la matière organique était également vecteur de micro-polluants, dont elle atténuait généralement la biodisponibilité en milieu naturel. Ces propriétés sont au cœur du projet MODIC (Modification de la Disponibilité des Contaminants), lancé en 1998 par Bernard Montuelle au Cemagref, dont j'ai poursuivi l'animation à partir de 2002. Le DEA puis la thèse de Catherine Gourlay, Ingénieur du GREF en formation complémentaire par la recherche, dirigée par Jean-Marie Mouchel (directeur du CEREVE), co-dirigée par Jeanne Garric (directrice du laboratoire d'écotoxicologie du Cemagref, Lyon) et moi-même, ont permis d'aborder la problématique avec, comme micro-polluants organiques modèles, les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques. Du côté des métaux-trace, c'est avec le DEA d'Estelle Bakkaus, au Cemagref, puis la thèse de Rémy Buzier (co-dirigée par Jean-Marie

Mouchel et moi-même) que les travaux se sont mis en place un an plus tard. Mes travaux de recherche portent donc désormais sur la biodisponibilité des contaminants en présence de matière organique d'origines et de qualité variées et incluent des aspects analytiques (comment mesurer les micro-polluants biodisponibles ? Quelle est la représentativité biologique des mesures chimiques?) autant que mécanistiques (comment la biodisponibilité des micro-polluants évolue-t-elle au fur et à mesure de la biodégradation de leur matrice organique ? Quelles propriétés chimiques de la matière organique sont à l'origine de son efficacité à piéger les micro-polluants ?). Le projet « Influence de la dégradation hétérotrophe sur la biodisponibilité de toxiques modèles en eaux fortement anthropisées », que j'ai présenté en juillet 2003, avec mes collègues du Cemagref de Lyon, du CERREVE, de l'université de Metz et de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Paris et qui est financé par l'Institut National des Sciences de l'Univers et de l'Environnement, reprend les aspects principaux.

Dans ce document, trois chapitres reprennent ces axes de recherche : les cycles biogéochimiques en milieu marin, les rejets de matière organique et de nutriments en eau douce, la biodisponibilité des micro-polluants en milieu aquatique. La matière organique constitue le fil rouge qui permet de tout relier. On la considère pour son origine, la photosynthèse, dans le chapitre 1, pour sa dégradation, dans le chapitre 2, et enfin pour ses interactions avec les micro-polluants, dans le chapitre 3.

Certes, la matière organique est un vaste ensemble, un peu fourre-tout... mais c'est par cet ensemble que se réalisent les interactions du vivant avec les cycles de la matière, c'est à dire la spécificité de notre environnement !

Comme le vivant n'est pas statique, la matière organique s'étudie par ses processus caractéristiques : synthèse, dégradation, association, dissociation... Tous sont dynamiques, tous les états d'observation sont transitoires, et l'observation, comme l'interprétation, doivent être adaptées à ces contraintes. C'est ainsi que le deuxième fil rouge de mon travail est la modélisation, qui permet de repasser au ralenti le film d'idéales expérimentations afin de pouvoir les analyser. Dans chacun des trois chapitres qui vont suivre, on trouvera donc, en proportions inégales, de l'observation, de l'expérimentation et de la modélisation.

Enfin, en perspective, j'esquisserai les grands axes de ce qui pourrait constituer mon activité de recherche des années à venir, pour contribuer à la compréhension de l'impact des micro-polluants sur la biosphère aquatique.

Table des matières.

<u>CHAPITRE 1 : CYCLES BIOGEOCHIMIQUES EN MILIEU COTIER.</u>	7
CONTEXTE.	8
1 LES POMPES OCEANIQUES A DIOXYDE DE CARBONE.	8
2 L'IMPORTANCE POTENTIELLE DES CYCLES BIOGEOCHIMIQUES EN MILIEU COTIER.	9
LE PROJET GLAMoR.	11
1 LE GOLFE DU LION, EN MEDITERRANEE NORD-OCCIDENTALE.	11
2 LES OBJECTIFS DU PROJET.	12
3 RESULTATS.	13
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.	23
<u>CHAPITRE 2 : REJETS DE MATIERE ORGANIQUE ET DE NUTRIMENTS EN EAU DOUCE.</u>	26
CONTEXTE.	27
1 CHANGEMENT D'ECHELLE.	27
2 MATIERE ORGANIQUE ET NUTRIMENTS.	28
METHODOLOGIES POUR LA CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DE LA MATIERE ORGANIQUE DISSOUTE DANS L'EAU.	29
1 UN RAPIDE APERÇU DES STRATEGIES POSSIBLES.	29
2 LES BILANS DE MATIERE ORGANIQUE BIODEGRADABLE.	30
3 CARACTERISATION PAR LES CINETIQUES DE BIODEGRADATION.	33
REJETS DE MATIERE ORGANIQUE URBAINE PAR TEMPS SEC A L'ECHELLE DU BASSIN DE LA SEINE ”.	38
1 ECHANTILLONNAGE DU PARC DES INSTALLATIONS DE TRAITEMENT DU BASSIN DE LA SEINE	39
2 NIVEAUX DE REJET EN CARBONE ORGANIQUE BIODEGRADABLE.	40
ANALYSE ET OPTIMISATION DU TRAITEMENT BIOLOGIQUE DE LA MATIERE ORGANIQUE ET DE L'AZOTE.	43
1 PRESENTATION RAPIDE DES MODELES DE SIMULATION DU TRAITEMENT DES EAUX USEES.	44
2 ANALYSE DU TRAITEMENT SUR LE CAS DE LA STATION D'EPURATION DE LA VILLE DE MEAUX.	47
3 DEMARCHE POUR L'OPTIMISATION DU TRAITEMENT.	48
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.	50
ANNEXES DU CHAPITRE 2.	51
<u>CHAPITRE 3. BIODISPONIBILITE DES MICRO-POLLUANTS EN MILIEU AQUATIQUE.</u>	55
CONTEXTE.	56
1 SPECIATION ET BIODISPONIBILITE.	58
2 LES METAUX LABILES SONT-ILS BIODISPONIBLES ?	63
3 FACTEURS DE CONTROLE DE LA BIODISPONIBILITE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES.	71
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.	76

CONCLUSION GENERALE.	78
<hr/>	
PERSPECTIVES.	79
<hr/>	
METHODOLOGIE POUR L'EVALUATION DE LA REPONSE BIOLOGIQUE.	79
1 DES METHODES PLUS SENSIBLES.	79
2 LIEN ENTRE CONCENTRATION INTERNE ET EFFETS.	80
3 PRISE EN COMPTE DES REGULATIONS BIOLOGIQUES.	80
EVALUATION DE L'ENVIRONNEMENT.	80
1 ECHANTILLONNEURS PASSIFS ET BIODISPONIBILITE.	80
2 ORGANISMES MODELES POUR LE SUIVI DU MILIEU.	81
REPONSE ECOLOGIQUE INTEGREE DU MILIEU.	81
REFERENCES.	82
<hr/>	
ANNEXES GENERALES.	93
<hr/>	
CURRI CULUM VI TAE.	94
1 EXPERIENCE PROFESSIONNELLE.	94
2 FORMATION INITIALE.	94
3 THEMES DE RECHERCHE ABORDES :	95
4 ANIMATION SCIENTIFIQUE.	95
5 ENCADREMENT :	96
6 ENSEIGNEMENT :	97
7 PUBLICATIONS DANS REVUES INTERNATIONALES :	97
8 AUTRES REVUES :	98
9 RAPPORTS :	99
SELECTION D'ARTICLES.	100

Chapitre 1 : Cycles biogéochimiques en milieu côtier.

Contexte.

L'océan concentre environ 95% de l'eau sur Terre, dans un volume de 1400 millions de km³. Bien avant le développement de la race humaine, l'océan contribuait, du fait des propriétés calorifiques de l'eau, à stabiliser le climat sur la planète en restituant la chaleur accumulée par endroits et en limitant les variations de température (Kim et Schneider (2003)). Historiquement, l'homme cherchera tout d'abord à tirer profit des ressources alimentaires de ce gigantesque réservoir, puis à le maîtriser comme moyen de communication. De nos jours cependant, la compréhension des mécanismes de régulation du climat constitue un objectif important de la communauté scientifique, dans la mesure où les émissions de gaz à effet de serre ont atteint un niveau de nature à le modifier profondément.

Les océanographes s'intéressent donc tout spécialement à la redistribution des flux de chaleur par l'océan, ainsi qu'à l'évolution des transferts de dioxyde de carbone entre l'atmosphère et les couches profondes de l'océan. Ces transferts sont intimement liés à la photosynthèse des organismes phytoplanctoniques, ce qui explique qu'une partie de la recherche océanographique se concentre sur la compréhension des facteurs de contrôle de la production primaire en milieu marin, actuels ou pour des paléo-environnements.

1 Les pompes océaniques à dioxyde de carbone.

La quantité de CO₂ contenue dans les océans est environ cinquante fois plus importante que celle contenue dans l'atmosphère, selon Raven et Falkowski (1999). Les interactions entre ces deux compartiments déterminent la concentration en dioxyde de carbone atmosphérique, dont les évolutions peuvent être observées grâce aux carottes glaciaires. La solubilisation de dioxyde de carbone dans les couches superficielles de l'océan augmente avec la concentration atmosphérique et l'on considère que 30% du CO₂ anthropique produit depuis la révolution industrielle pourrait avoir été ainsi absorbé par l'océan (Raven et Falkowski (1999)), par simple équilibrage entre l'atmosphère et l'océan. Le cycle de vie des organismes marins affecte de différentes façons les concentrations en dioxyde de carbone (Figure 1). D'une part, la photosynthèse, en consommant du dioxyde de carbone en surface des océans, conduit dans un premier temps à une absorption accrue de CO₂ atmosphérique. Le carbone organique ainsi formé et transporté vers le fond des océans en fin de vie des organismes produits est en partie reminéralisé sous l'action des micro-organismes hétérotrophes, conduisant à un enrichissement en profondeur en CO₂. Au contraire, le processus de calcification, nécessaire à l'élaboration des squelettes et coquilles de nombreux organismes marins, entraîne un déplacement des équilibres des carbonates qui produit du CO₂, de moindre importance toutefois que l'effet inverse de la photosynthèse. Les déchets calcaires issus de ces tests et parvenant en profondeur par la sédimentation peuvent être dissous en présence d'acide carbonique, ce qui tend à en faire diminuer la concentration. Comme souvent en océanographie, les processus affectant les concentrations des espèces de carbone inorganique dissous se structurent autour d'un gradient vertical très marqué. La circulation générale des masses d'eau étant différente en surface et en profondeur, ces deux domaines spatiaux sont progressivement découplés et l'interprétation des phénomènes observés nécessite des outils de simulation des échanges tri-dimensionnels.

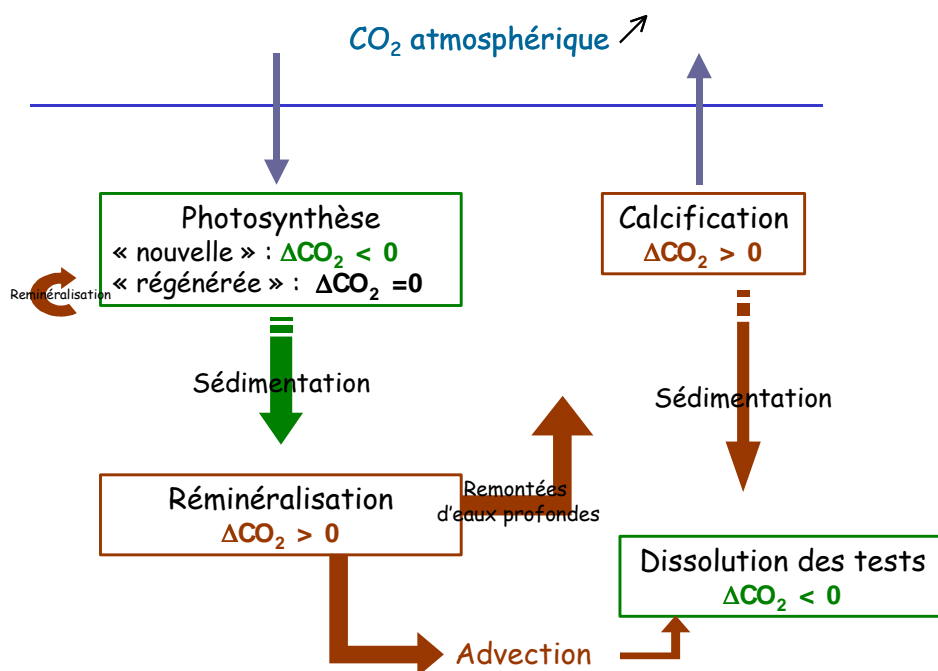


Figure 1. Principaux processus affectant la concentration en dioxyde de carbone dissous de l’océan en surface et en profondeur.

Du fait de cette dynamique complexe, la simple observation des concentrations ponctuelles de dioxyde de carbone, ou de l’intensité de la production primaire, ne suffit pas à la prévision de l’évolution des bilans de carbone atmosphérique. La compréhension des facteurs de contrôle de la production primaire en milieu océanique ainsi que des cinétiques de transport et de reminéralisation de la matière organique, à l’échelle régionale, voire globale, sont en revanche indispensables.

2 L’importance potentielle des cycles biogéochimiques en milieu côtier.

Une rapide observation de la distribution des zones de production primaire dans l’océan indique assez clairement la prépondérance des zones côtières (Figure 2). La frange littorale est en effet caractérisée par une faible profondeur, garantissant une lumière suffisante au phytoplancton, même en cas de mélange sur la verticale de la colonne d’eau et une fertilisation par les apports continentaux, qu’ils soient fluviaux, diffus ou éoliens. Dans certains cas, la circulation générale et les vents se combinent de plus pour donner lieu à des remontées d’eau profonde plus ou moins permanentes, qui enrichissent la zone côtière en éléments nutritifs (Abrantes et Moita (1999); Huthnance (2002)) et stimulent la production primaire. C’est ce que l’on observe le long du Portugal et de la Guinée (Figure 2) ou, de façon ponctuelle, dans le Golfe du Lion par temps de Mistral (Denis-Karafistan *et al.* (1998))¹. Pour les mers peu profondes et en partie confinées, comme la mer du Nord, la question de la production primaire est une préoccupation environnementale plus que climatique ou trophique. L’accumulation des sels nutritifs y provoque en effet des floraisons planctoniques telles qu’il s’agit d’une véritable pollution, proche de l’eutrophisation que l’on observe depuis une trentaine d’années en eaux continentales (Riegman (1995)).

¹ Les remontées d’eau profonde consécutives aux coups de Mistral sont bien connues des estivants de la baie de Cassis, car la température de l’eau de mer peut chuter d’une dizaine de degrés en quelques heures...

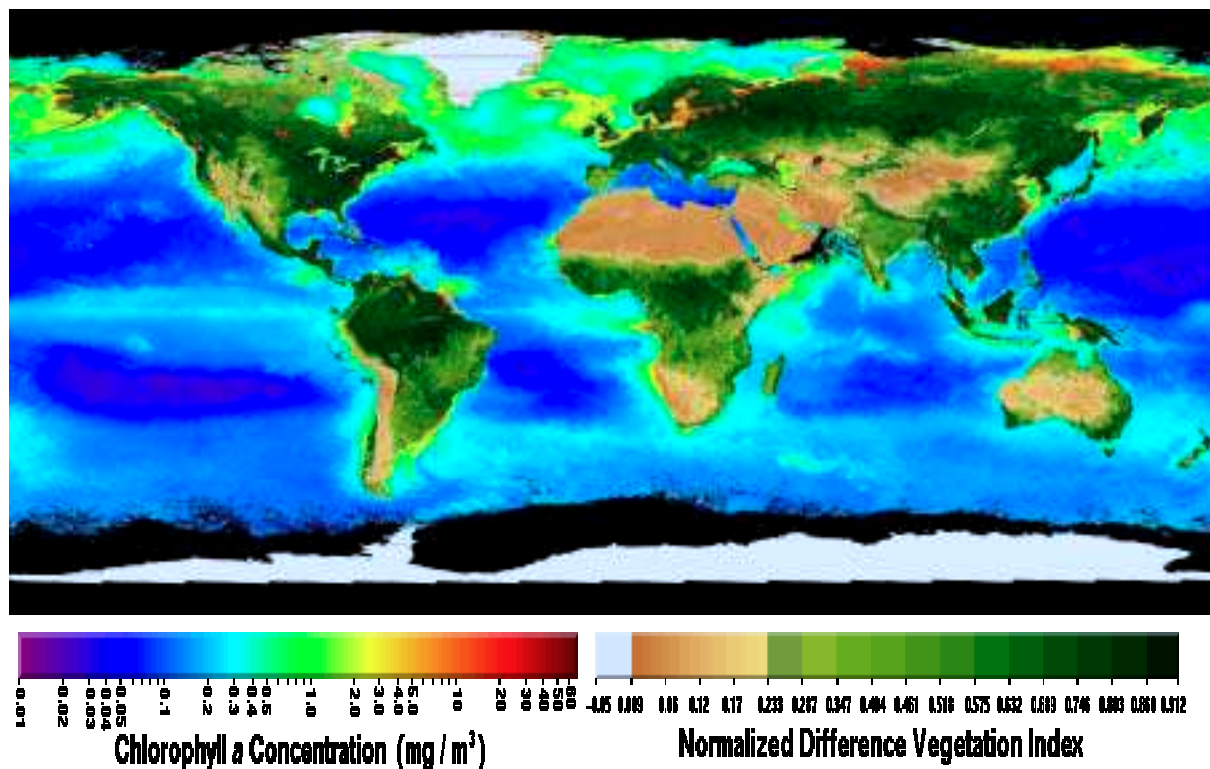


Figure 2. Concentrations en pigments phytoplanctoniques (mg/m^3) obtenues par le satellite SEAWIFS de la NASA (<http://seawifs.gsfc.nasa.gov/SEAWIFS.html>). Moyenne sur l'été 2003.

On voit donc que la production primaire en zone côtière est intéressante à plus d'un titre : non seulement elle représente 18 à 33% de la production primaire océanique mondiale (Mantoura *et al.* (1991)) concentrée sur 15% de la surface et 0,05% du volume de l'océan, et elle contribue de ce fait à la régulation du CO_2 atmosphérique (Walsh (1991), Liu *et al.* (2000)). De plus, elle constitue non seulement le premier maillon de la chaîne alimentaire sur laquelle reposent les ressources halieutiques, mais elle reflète également en partie les apports continentaux issus des activités humaines, excessifs parfois jusqu'à mettre en péril l'écosystème marin. Des programmes de recherche internationaux se consacrent depuis plusieurs années à la question du rôle biogéochimique de la zone côtière (parmi lesquels Land-Ocean Interactions in the Coastal Zone²), en cherchant à évaluer si cette zone est exportatrice de sels nutritifs et/ ou de matière organique vis à vis de l'océan ouvert et dans quelle mesure elle contribuerait au piégeage de dioxyde de carbone.

Dans ce qui suit, on va traiter des cycles biogéochimiques en milieu côtier. Ma contribution à ce thème porte sur la modélisation couplée de ces cycles dans un domaine spatial ouvert en vue de la quantification du flux d'azote à l'échelle saisonnière. Ces travaux ont été menés dans le cadre d'un projet européen (GLAMoR) et publiés dans :

- **M.-H. Tusseau-Vuillemin**, L. Mortier et C. Herbaut. (1998) Modeling nitrate fluxes in a open coastal environment (Gulf of Lions): transport versus biogeochemical processes. *Journal of Geophysical Research* **103**, 7693-7708.
- C. O'Riordan, K. Soetaert, **M.-H. Tusseau-Vuillemin**, L. Mortier, K. Buis et J. J. Middelburg. 1998. *Vertical and cross-shelf flux and recycling of carbon and nitrogen in Mediterranean coastal waters: a pelagic/benthic coupled modeling approach*. Presented at 2nd ELOISE annual conference, Huelva, Espagne.

² <http://www.wold.nioz.nl/loicz/>

- M.-P. Bonnet, C. O'Riordan, K. Soetaert, K. Buis, **M.-H. Tusseau-Vuillemin**, L. Mortier et J. J. Middelburg. 2000. *Pelagic/Benthic Coupled 3D Modeling of Carbon and Nitrogen Cycling in the Gulf of Lions (NW Mediterranean Sea): the Role of Sediments*. Presented at Ocean Sciences Meeting, San Antonio, Texas.

Cathy O'Riordan (actuellement à l'AGU) et Marie-Paule Bonnet (actuellement à l'IRD) ont effectué leur post-doctorat sous ma responsabilité, dans le cadre du projet GLAMoR.

Le projet GLAMoR³.

Lorsque le projet GLAMoR (Gulf of Lions Advanced MOdelling Research) est proposé, en réponse à l'appel d'offres MAST-III du 4^{ème} PCRD de la Commission Européenne, en 1996, il s'agit de construire un outil numérique innovant de compréhension des flux biogéochimiques à l'échelle d'une marge océanique semi-ouverte : le Golfe du Lion, en Méditerranée. Trois compétences en matière de modélisation sont réunies : dynamique côtière (LODyC⁴, modèle OPA, Madec *et al.* (1991)), diagénèse sédimentaire (NIOO⁵, modèle décrit dans Soetaert *et al.* (1996)) et biogéochimie de la colonne d'eau (IBM⁶, modèle biogéochimique décrit dans Tusseau *et al.* (1997)).

1 Le Golfe du Lion, en Méditerranée nord-occidentale.

La mer Méditerranée est un modèle d'étude cher aux océanographes (Lehucher *et al.* (1995)), car l'on peut y observer un certain nombre de processus importants à l'échelle mondiale, comme la formation d'eau profonde en hiver, les remontées d'eau profondes par temps de Mistral, des zones à l'oligotrophie très marquée (Turley *et al.* (2000)), ou au contraire enrichies par les apports fluviaux (nord de l'Adriatique, par exemple). Plus particulièrement, le Golfe du Lion, marge principale de la Méditerranée, est aussi le réceptacle de son principal fleuve, le Rhône (Struglia *et al.* (2004)), et des rejets ponctuels du littoral, tout en se trouvant soumis à de forts échanges avec la mer ouverte du fait des incursions sur la marge du courant Liguro-Provençal (Albérola *et al.* (1995); Echevin *et al.* (2003b)). La production primaire y est, en moyenne, supérieure à celle de l'ensemble de la Méditerranée nord-occidentale (Morel et André (1991), Figure 3).

³ financé par la CE sous la forme d'un des axes de METRO-Med (<http://www.nilu.no/projects/eloise/>).

⁴ Laboratoire d'Océanographie Dynamique et du climat : <http://www.lodyc.jussieu.fr/>

⁵ Netherlands Institute of Ecology : <http://www.nioo.nl/>

⁶ Feu l'Institut de Biogéochimie Marine

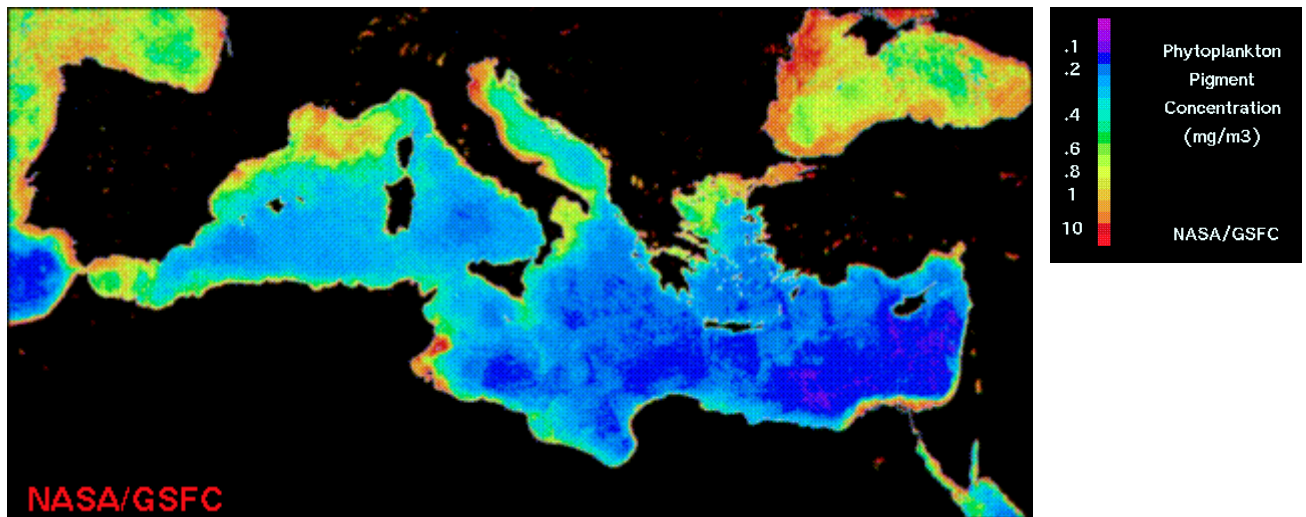


Figure 3. Concentrations en pigment chlorophylliens en Méditerranée nord-occidentale, mai 1980, image Seawifs-NASA.

Le Golfe du Lion est donc une zone particulièrement intéressante à étudier pour mettre en rapport les apports continentaux avec les transformations biogéochimiques propres à la marge ainsi qu'avec les apports du large (Raimbault et Durrieu de Madron (2003)). Plusieurs projets de recherche nationaux et européens lui ont d'ailleurs été consacrés dans les années 1980-2000 (le Programme National d'Environnement Côtier, ECOSystèmes de MARGE continentale, European River Ocean System 2000, Coupled ECological Socio-ECONomical Modeling, GLAMoR- METRO-Med...). Ce golfe a fait l'objet de très nombreuses campagnes de mesure (représentant pas moins de 450 jours de mer, selon Raimbault et Durrieu de Madron (2003) pour le seul PNEC, de 1997 à 2001). L'étude des échanges entre la côte et le large fera encore l'objet d'un thème de la phase 2003-2006 de ce programme (thème « ECOLO », chantier MEDOC, (Raimbault (2003))).

2 Les objectifs du projet.

Comme on l'a mentionné plus haut, la modélisation couplée des mouvements des masses d'eau, des échanges diffusifs et convectifs, de la biogéochimie de la colonne d'eau de surface et du fond est nécessaire à la compréhension et à la quantification des processus limitant la production primaire nouvelle et régénérée. Or, bien que des modèles tridimensionnels couplés des cycles biogéochimiques et de la circulation générale aient été mis en œuvre à grande échelle (Fasham *et al.* (1993)) dès que les moyens de calcul informatique l'on permis, leur application à la zone côtière pose des problèmes bien spécifiques, *a fortiori* pour le Golfe du Lion.

Les processus physiques donnant lieu aux champs de courant et de turbulence particuliers à la zone côtière résultent en effet de l'interaction entre la circulation générale, la topographie et les vents, dont les échelles intrinsèques diffèrent (Echevin *et al.* (2003b) ; Huthnance (2002)). Dans le cas d'un golfe, ces interactions peuvent prendre la forme d'incursions transitoires du courant océanique sur la plate-forme continentale. La prise en compte simultanée des différentes échelles spatio-temporelles est particulièrement délicate et nécessite des outils numériques spécifiques (Laugier *et al.* (1994)).

Du fait de ces contraintes sur les échelles de représentation, les simulations sont généralement restreintes aux zones d'intérêt. Le domaine d'étude présente donc généralement au moins une frontière ouverte avec le large et d'autres avec le littoral. Les conditions aux limites à ces frontières doivent être spécifiées, non seulement en termes de forçage dynamique, mais aussi en termes de flux biogéochimiques, éventuellement variables au cours du temps. Les apports

continentaux doivent également être représentés. Les panaches de fleuves présentent une dynamique variable, fonction du mélange progressif de l'eau douce avec l'eau salée et du vent local qui demande encore une échelle spécifique de représentation (Estournel *et al.* (2001)). Enfin, bien que physiquement fermée, la frontière benthique est extrêmement active du point de vue biogéochimique. Le dépôt de matière organique s'accompagne de sa minéralisation progressive et éventuellement de flux de sels nutritifs dissous vers la colonne d'eau.

Le projet GLAMoR (1997-2000) a proposé d'évaluer des réponses techniques à chacune de ces contraintes et d'utiliser le modèle couplé obtenu pour analyser la dynamique des flux d'azote (NO_3 et NH_4) entre le fleuve, les sédiments, la zone côtière et le large.

3 Résultats.

3.1 Modélisation d'un domaine côtier ouvert⁷

La question des conditions aux limites aux frontières ouvertes du domaine se pose pour les variables du modèle de circulation générale comme pour celles du modèle biogéochimique. Pour la dynamique, les simulations à l'échelle du bassin nord-occidental (Herbaut *et al.* (1996)), de résolution 11 km x 11 km, ont été utilisées, soit en les tronquant, soit en conditions forçantes d'un modèle emboîté à maille plus fine (Laugier *et al.* (1994)), de résolution 3 km x 3 km. Les capacités de calcul ne permettaient cependant pas de simuler aisément, à l'échelle du bassin nord-occidental, l'ensemble des variables biogéochimiques du modèle utilisé (treize variables, Tusseau *et al.* (1997)).

Les flux aux frontières ouvertes sont largement dominés par l'advection du courant Ligure (Est-Sud Ouest, Figure 4, débit atteignant 1,6 Sv en hiver (Albérola *et al.* (1995))). Les champs advectifs étant simulés aux deux frontières, la simulation des flux biogéochimiques correspondants requière *a priori* la connaissance des différentes variables, à l'est et au sud du domaine.

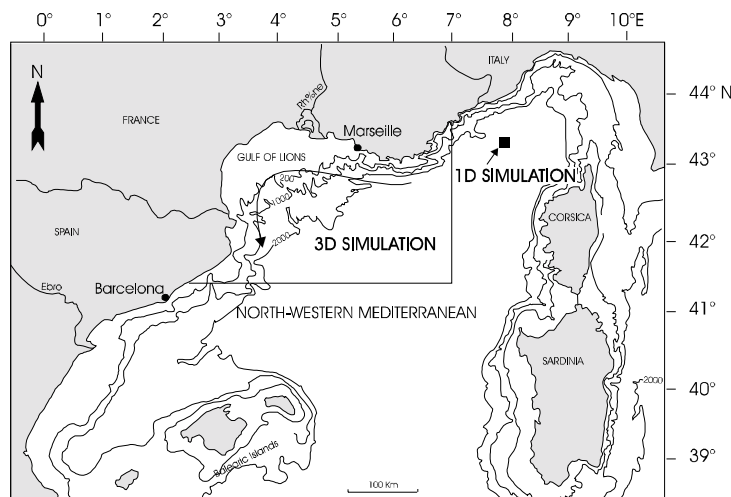


Figure 4. Carte topographique du Golfe du Lion, figurant la direction du courant Ligure. Le domaine de l'étude est encadré. La simulation uni-dimensionnelle au point DYFAMED est indiquée par un carré. D'après Tusseau, 1996.

Les treize variables utilisées dans le modèle biogéochimique ne sont malheureusement pas toutes documentées, comme par exemple les différentes classes de matière organique dissoute, rapidement ou lentement biodégradable, la biomasse hétérotrophe ou les composants

⁷ M.-H. Tusseau-Vuillemin, L. Mortier et C. Herbaut. (1998) Modeling nitrate fluxes in a open coastal environment (Gulf of Lions): transport versus biogeochemical processes. *Journal of Geophysical Research* **103**, 7693-7708.

phytoplanctoniques (Tusseau *et al.* (1997)). Pour les concentrations de nitrate, ammonium, silice, chlorophylle on dispose en revanche de séries de données, la plus exhaustive en Méditerranée étant celle de la station DYFAMED. Pour réaliser la série temporelle de toutes les variables du modèle biogéochimique représentant les conditions aux limites, il a été nécessaire d'utiliser une simulation préliminaire, représentative des flux entrants dominants. La simulation uni-dimensionnelle annuelle réalisée au point DYFAMED après calibration des paramètres grâce à la série chronologique de 1986 a été utilisée (Tusseau *et al.* (1997)) aux frontières est et sud du domaine. Si la station DYFAMED est clairement représentative des masses d'eau importées par le courant Ligure dans le Golfe du Lion, elle l'est probablement beaucoup moins de la frontière sud. Cependant, les échanges se faisant à cette frontière majoritairement dans le sens de l'exportation, la description de la frontière extérieure a peu d'influence sur la simulation dans le domaine d'étude.

Avec l'augmentation rapide des capacités de calcul informatique, on pourrait techniquement aujourd'hui envisager de réaliser des simulations biogéochimiques sur l'ensemble d'un bassin semi-fermé comme celui de la Méditerranée nord-occidentale et utiliser les mêmes techniques de forçage d'un domaine côtier que pour la dynamique. On anticiperait cependant plusieurs difficultés propres à la biogéochimie : dans quelles conditions et au bout de quelle durée de simulation obtiendrait-on un état stationnaire à l'échelle du bassin ? Quelle serait l'importance des apports atmosphériques et benthiques ? Surtout, il paraît difficile de simuler un domaine aussi vaste avec un seul jeu de paramètres biogéochimiques.

3.2 Couplage avec les sédiments.

L'un des objectifs du projet GLAMoR est d'évaluer l'importance du compartiment benthique et de proposer des solutions réalistes de modélisation à l'échelle régionale.

Les échanges entre la colonne d'eau et le benthos tiennent à la sédimentation des particules organiques de la colonne d'eau vers le sédiment et au flux diffusif de nutriments inorganiques (silice, azote, résultant de la minéralisation des particules sédimentées) depuis le sédiment vers la colonne d'eau. Ce couplage dynamique peut être représenté de différentes façons, selon le domaine étudié et l'importance relative du flux benthique (Figure 5, inspirée de Soetaert *et al.* (2000)).

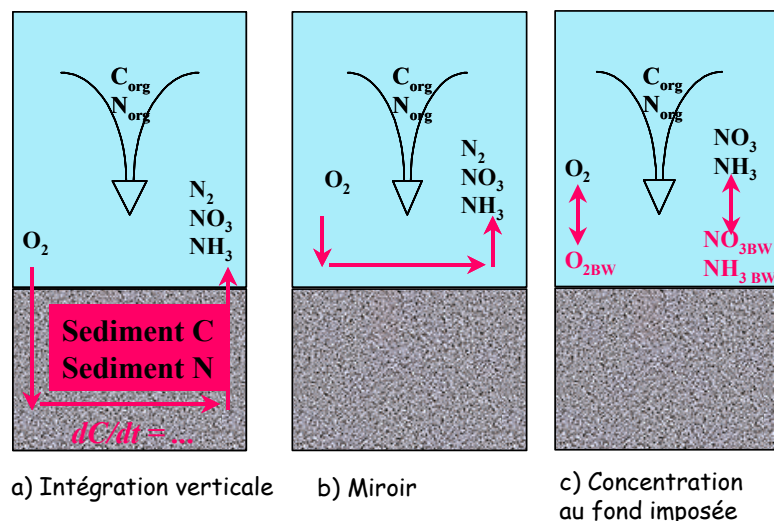


Figure 5. Représentation schématique des différentes façons de réaliser le couplage biogéochimique de la colonne d'eau et des sédiments, par complexité croissante de a à c. Adapté de Soetaert *et al.* (2000)

Dans le cadre du projet GLAMoR, ces trois solutions techniques ont été successivement utilisées. La solution c) peut être mise en œuvre lorsque l'on dispose d'une documentation

suffisante sur les concentrations des variables couplées (Si, NO₃, NH₄, O₂ essentiellement) au voisinage des sédiments. Cette information est injectée dans les simulations au moyen d'une fonction de rappel (Tusseau-Vuillemin *et al.* (1998)). Le flux (positif ou négatif) résultant est quantifié et permet de vérifier la stabilité de la simulation à l'échelle pluri-annuelle. La simulation du flux de sédimentation n'est pas indispensable, puisque son devenir benthique n'est pas explicité. Cette solution est purement empirique mais permet, à peu de frais, d'obtenir une estimation des flux entre la colonne d'eau et les sédiments. La solution b) a été utilisée en version uni-dimensionnelle (O'Riordan *et al.* (1998)). Dans ce cas, on simule une reminéralisation immédiate des particules organiques qui atteignent le sédiment. Cette hypothèse est assez peu réaliste et revient en fait à simuler uniquement la colonne d'eau, mais avec une conservation de la masse instantanée, ce qui est plus confortable pour certains développements. De plus, dans le cas d'une colonne d'eau très profonde, l'échelle de temps des processus permettant le couplage entre le fond et la surface de la colonne d'eau est du même ordre de grandeur que celle de la diagenèse. La reminéralisation immédiate n'a donc finalement pas trop d'impact sur la colonne d'eau en surface.

Enfin, la solution a) consiste à réaliser une simulation de la diagenèse dans un compartiment benthique homogène sur la verticale. Dans ce compartiment, les variables silice, oxygène et azote sont simulées de façon dynamique. C'est la version la plus complète que nous ayons utilisée. Elle suppose la simulation de la sédimentation des particules organiques et de leur composition ainsi que des processus de reminéralisation benthique. Le module de production de particules a été développé dans un premier temps en version uni-dimensionnelle.

3.2.1 Modélisation de la production de particules biogéniques⁸

Les fleuves constituent un apport important de matières en suspension, qui sédimentent généralement assez vite, dans des régions proches de l'embouchure. En-dehors de ces zones, les particules sont essentiellement d'origine biogénique, issues de la sédimentation de certaines espèces phytoplanctoniques vivantes (essentiellement les diatomées), de débris organiques et des pelotes fécales des organismes zooplanctoniques. Ces particules qui quittent la surface sont soumises de façon permanente à la reminéralisation par des bactéries hétérotrophes (Bianchi *et al.* (1992)), de telle sorte que celles dont la vitesse de chute est la plus faible, ou dont la cinétique de dégradation est très rapide, ne parviennent éventuellement pas à atteindre le sédiment, étant redissoutes avant. Au contraire, l'excrétion zooplanctonique, sous forme de pelotes fécales, est un moyen très efficace d'exporter la matière organique vers les fonds marins Wassman (1998). Le rapport de la vitesse de sédimentation à la cinétique de dégradation est important, car la dynamique et la biogéochimie de la colonne d'eau sont évidemment très différentes de celles du sédiment : aux mouvements du fluide et à l'oxygénation quasi-permanente s'opposent l'accumulation de matière, l'hétérogénéité et des conditions redox très variables. Généralement, le sédiment constitue une zone de conservation de la matière et de ralentissement de la reminéralisation (Hedges *et al.* (2001)). Le compartiment sédimentaire soustrait ainsi la matière de la colonne d'eau pendant un temps plus ou moins long.

A partir du modèle biogéochimique de Tusseau *et al.* (1997), la production de particules a été décrite de manière à fournir un couplage cohérent avec le modèle de reminéralisation diagénétique du Netherland Institute of Ecology (NIOO) (Soetaert *et al.* (1996)), c'est à dire que la matière organique particulaire est représentée par deux compartiments respectivement rapidement et lentement biodégradables, auxquels sont associés des rapports N :C différents. Trois puits affectent les compartiments phytoplanctoniques du modèle (diatomées et

⁸ O'Riordan, C., K. Soetaert, M.-H. Tusseau-Vuillemin, L. Mortier, K. Buis et J. Middelburg (1998). Vertical and cross-shelf flux and recycling of carbon and nitrogen in Mediterranean coastal waters: a pelagic/benthic coupled modeling approach. 2nd ELOISE annual conference, Huelva, Espagne.

flagellés) : la lyse des cellules, l'exsudation et le broutage par le zooplancton. Seul ce dernier terme donne lieu à la production de particules (POMfast et POMslow dans la Figure 6), sous forme de pelotes fécales, les deux autres alimentant les compartiments de la matière organique dissoute. A la différence des flagellés, les diatomées sédimentent également directement (terme DetSi). Le modèle biogéochimique simule des compartiments phytoplanctoniques à rapports N:C et C:Si variables selon la disponibilité des nutriments et l'éclairement. Les particules produites respectent cette stoechiométrie variable mais sont réparties en deux compartiments homogènes de rapport N:C constants, auxquels sont associées des constantes cinétiques de reminéralisation différentes. Une reminéralisation rapide est associée aux particules dont le rapport N:C est le plus élevé, ce qui permet de rendre compte des observations de Miquel *et al.* (1993) et Soetaert *et al.* (1997) selon lesquels la dégradation conduit à une diminution du rapport N:C. Au sein de ces deux compartiments, on distingue encore les particules à vitesse de chute élevée ou faible. Le couplage avec le sédiment est très simple dans cette version du modèle : la matière particulaire qui atteint le fond de la colonne d'eau est immédiatement réintégrée dans le compartiment dissous minéral correspondant (Figure 5), ce qui constitue une vision accélérée et peu réaliste de la diagenèse effective mais permet des simulations pluriannuelles sans perte de masse.

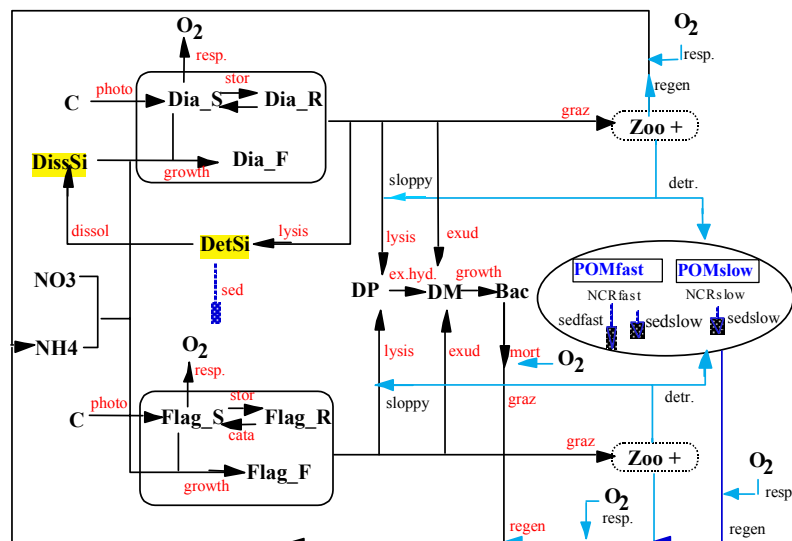


Figure 6. Représentation schématique des flux de matière entre les différents compartiments du modèle biogéochimique incluant les particules biogéniques (O’Riordan *et al.* (1998)).

Les particules sont donc représentées par quatre compartiments, caractérisés par deux rapports N:C, deux vitesses de sédimentation et deux taux de reminéralisation différents. La combinaison de ces six paramètres permet de simuler des flux de particules de rapport N:C variables avec la profondeur. La comparaison de ces flux aux données de trappes à sédiments à 100, 200, 1000 et 2000 mètres de profondeur (Miquel *et al.* (1993)) permet d’ajuster au mieux les valeurs des paramètres, la production de particules étant elle-même contrôlée par l’amplitude de la floraison phytoplanctonique de surface.

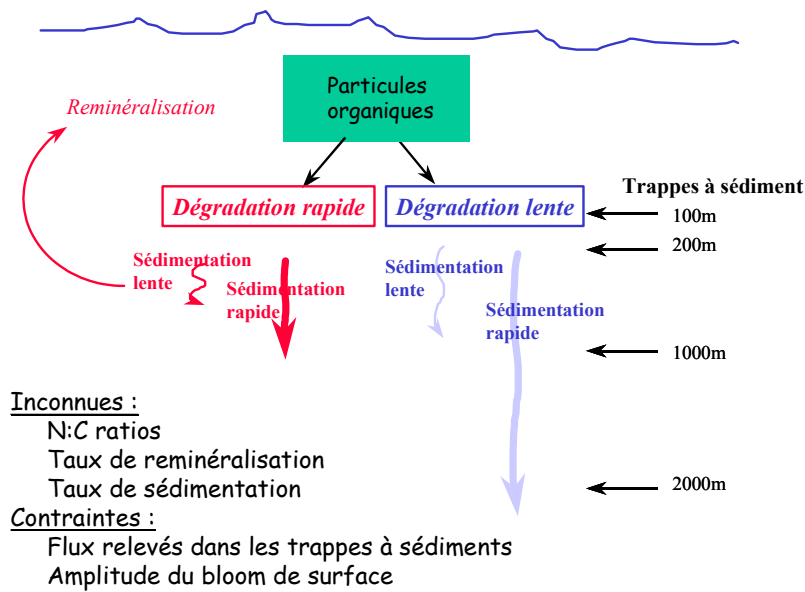


Figure 7. Représentation schématique du devenir des particules organiques. Adapté de O'Riordan *et al.* (1998)

Deux années de simulation sont nécessaires pour obtenir un état stationnaire à l'échelle annuelle. La qualité de la calibration des paramètres contrôlant la dynamique des particules est illustrée en Figure 8.

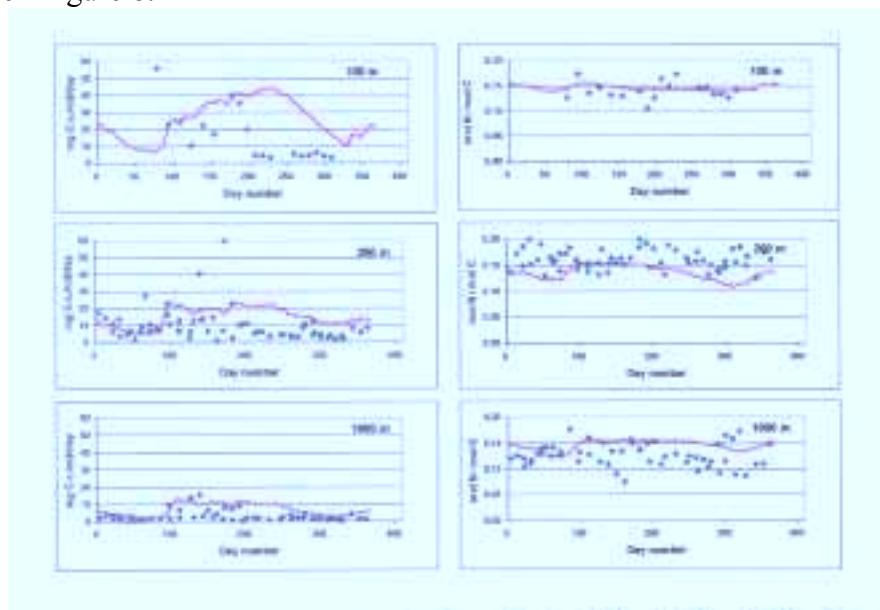


Figure 8. Gauche : Flux de carbone organique particulaire simulés à 100, 200 et 1000 m de profondeur. Droite : Rapports molaires N :C simulé correspondant (O'Riordan *et al.* (1998)). Données (points) acquises au site DYFAMED pendant la période 1987-1990 d'après Miquel *et al.* (1993).

Cet exercice de calibration a permis de montrer que trois classes de particules étaient nécessaires pour décrire la production de matière particulaire à la station DYFAMED (Tableau 1). La quatrième classe initialement considérée (sédimentation rapide et lente reminéralisation) était finalement peu significative par rapport aux autres et a été négligée. Avec cette description, on simule un flux de matière organique à 100 mètres de profondeur dont l'amplitude est calquée, avec un décalage d'environ deux jours, sur celle de la floraison phytoplanctonique de surface. Au fur et à mesure de la sédimentation de la matière et de sa

dégradation, ce signal s'estompe. A 1000 mètres de profondeur, on n'observe pratiquement plus de fréquence saisonnière et le flux est de l'ordre de 10% de celui observé (et simulé) à 100 mètres de profondeur. L'adéquation des simulations avec les données de flux des trappes à sédiments implique en effet que 95% de la matière organique particulaire soit caractérisée par une dégradation rapide (3% par jour), 8% de cet ensemble ayant une forte vitesse de sédimentation (90 m/jour). De fait, une très faible proportion (flux moyen de 0,1mmolC/m².an) des particules produites en surface atteint le sédiment (profondeur de plus de 2000 mètres) d'après nos simulations. Ceci est confirmé par les observations générales (Hedges *et al.* (2001)) et sur le site DYFAMED en particulier (5-7% d'après Miquel *et al.* (1993)), bien que Gehlen *et al.* (1997) aient observé sur des événements ponctuels, à ce même site, des flux plus importants (~1 mmolC/m².an).

	Dégradation rapide		Dégradation lente
Rapport N :C (mol:mol)	0,16		0,08
Taux de reminéralisation (/jour)	3%		0,06%
	Rapide	lente	Lente
Taux de sédimentation (m/jour)	90	2,5	1,5

Tableau 1. Caractéristiques de la matière organique particulaire obtenues par l'exercice de calibration sur les données DYFAMED (O'Riordan *et al.* (1998)).

Avec cette simulation, il est intéressant d'analyser le devenir de la matière organique produite en surface par la photosynthèse. A l'échelle de la colonne d'eau et sur une période d'une année, on estime avec le modèle que 55% des cellules phytoplanctoniques sont directement transformées en CO₂ et ammonium, par leur propre respiration ou celle de leurs prédateurs. 33% de ces cellules sont transformées en particules, essentiellement par l'intermédiaire des pelotes fécales du zooplancton, les 12% restants rejoignant le compartiment de la matière organique dissoute. Ces chiffres correspondent à ceux avancés par Wassman (1998) pour décrire un écosystème dominé par du zooplancton herbivore : 33% seulement du phytoplancton quitterait dans ce cas la surface sous forme particulaire (10% d'agrégats et 23% de pelotes fécales), les 67% restants étant respirés ou exportés vers les autres niveaux de la chaîne trophique. La station DYFAMED, située dans le courant Ligure, en amont du Golfe du Lion, est en effet généralement considérée comme représentative d'un écosystème oligotrophe de ce type.

3.2.2 Mise en œuvre tri-dimensionnelle : le méta-modèle de diagenèse.

A l'échelle du Golfe du Lion, il est dommage de s'en tenir, en ce qui concerne la diagenèse benthique, à un modèle de type miroir. En effet, si cette représentation est acceptable en mer ouverte, où les fonds sont importants, elle donnerait lieu à une reminéralisation beaucoup trop rapide sur le plateau, là où les fonds sont inférieurs à 200 mètres et où les flux de matière organique parvenant au sédiment sont significatifs. Le modèle biogéochimique tri-dimensionnel (Tusseau (1996)), complété par le module de production de particules (O'Riordan *et al.* (1998)) a donc été couplé avec un modèle diagenétique distribué et dynamique. Cependant, afin de limiter les coûts de calcul, une méthode originale de couplage a été développée par l'équipe du NIOO et mise en œuvre par Marie-Paule Bonnet (IBM-LODyC) sur le Golfe du Lion. Le sédiment est représenté par un unique compartiment, sans prendre en compte l'hétérogénéité verticale (Figure 5a), ce qui revient à éliminer un certain nombre de processus. Le principe de ce « méta-modèle » consiste à paramétriser ces processus non décrits à partir des résultats d'un modèle diagenétique résolvant complètement la dimension verticale (Soetaert *et al.* (2000)). Trois régressions, obtenues à partir d'une simulation de type Monte-Carlo du modèle complet, permettent d'estimer les taux de

nitrification, de minéralisation anoxique et de dénitrification en fonction de facteurs indépendants (Figure 9). Ces taux sont donc différents pour chacune des mailles de la simulation tri-dimensionnelle, rendant compte de la variabilité des environnements, sans engendrer de temps de calcul trop importants. Les facteurs indépendants sont la quantité de matière qui rejoint le compartiment benthique (C, N, Si), le taux de minéralisation et la réactivité de la matière organique (obtenus par une moyenne pondérée des caractéristiques des particules ayant sédimenté), la profondeur et les concentrations en oxygène, les formes de l'azote et de la silice au fond de la colonne d'eau. Des paramètres représentant la bioturbation et l'irrigation du sédiment sont d'autre part dérivés de la profondeur selon des relations empiriques établies par Middelburg *et al.* (1997). Une simulation préliminaire de trois années consécutives a permis d'obtenir un quasi-état stationnaire, non seulement pour les variables pélagiques, mais aussi pour les compartiments benthiques.

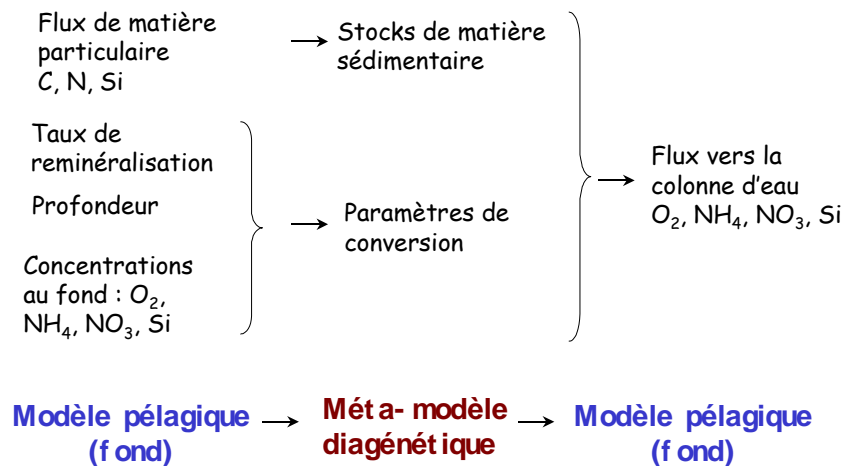


Figure 9. Principe du couplage du modèle pélagique tri-dimensionnel avec le méta-modèle diagénétique.

3.3 Flux de matière au travers d'une marge océanique.

Les différents outils de modélisation détaillés ci-dessus permettent d'analyser l'origine des flux de matière (notamment azote et carbone) dans différentes zones du Golfe du Lion. Nous avons privilégié, comme domaine d'étude, la zone de la marge, où la profondeur est inférieure à 150 mètres, et qui se trouve soumise à la fois aux apports continentaux, hauturiers et benthiques.

3.3.1 Flux d'azote : contribution relative du transport et des processus biogéochimiques⁹.

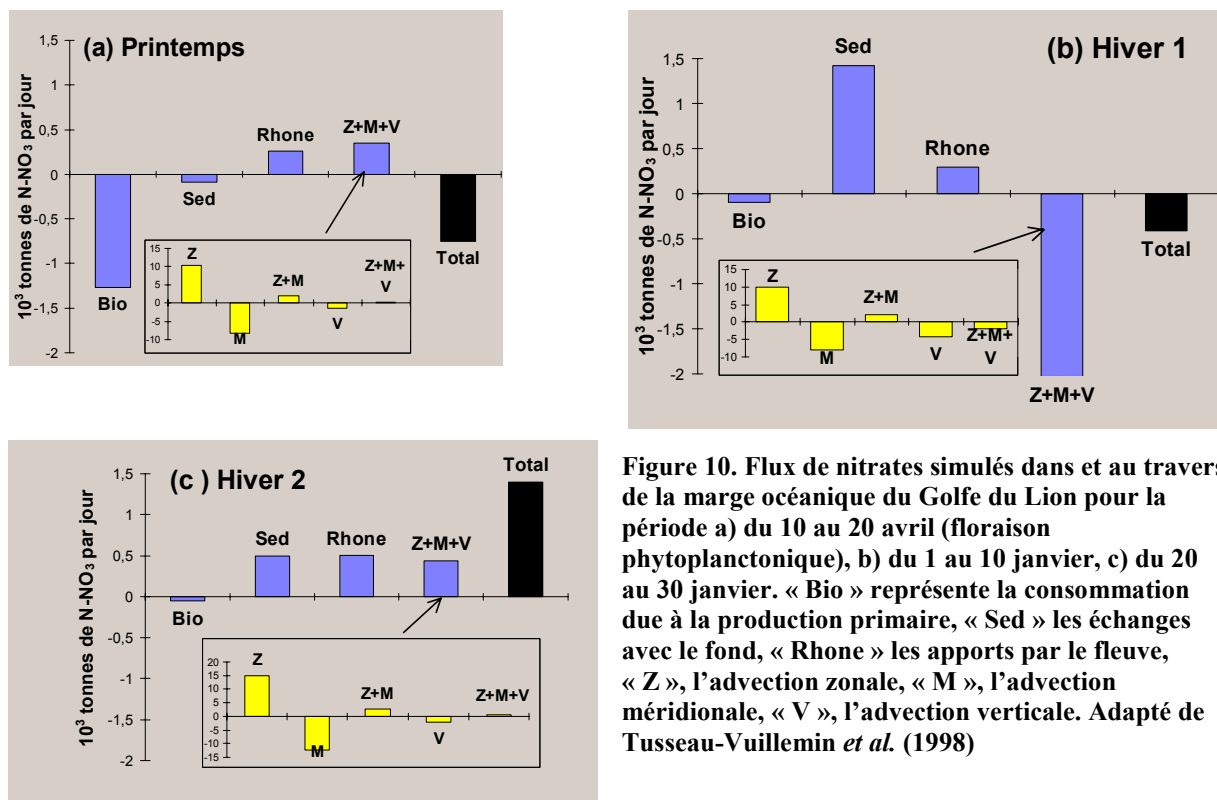
La version du modèle pélagique tri-dimensionnel la plus simple (Tusseau (1996)), dans laquelle les échanges avec le sédiment sont paramétrés au moyen d'une fonction de rappel (Figure 5c), avec une maille de 11kmx11km a permis d'analyser l'importance relative des flux d'azote dans le Golfe du Lion. Rappelons que ce modèle décrit la dynamique de deux populations phytoplanctoniques (diatomées et flagellés), de la biomasse hétérotrophe et de la dégradation de la matière organique dissoute, représentée par trois classes de biodégradabilité, l'unité principale du modèle étant l'azote.

Des bilans de masse d'azote ont été effectués à l'échelle journalière, entre la partie du domaine de profondeur inférieure à 150 mètres (dénommée « marge » par la suite) et la mer ouverte. Il y aurait plusieurs façons d'analyser ces résultats et plus de détails (notamment la

⁹ Tusseau-Vuillemin, M.-H., L. Mortier, et al. (1998). "Modeling nitrate fluxes in a open coastal environment (Gulf of Lions): transport versus biogeochemical processes." *Journal of Geophysical Research* 103: 7693-7708.

validation des simulations) se trouvent dans (Tusseau-Vuillemin *et al.* (1998)). Pour illustrer la complexité des processus permettant de réaliser ces échanges de matière, nous présenterons trois périodes particulières de la simulation annuelle : une période d'activité biologique intense (printemps), une période hivernale correspondant à un écoulement d'eaux froides et denses par le fond et vers le large et une autre période hivernale, après un fort mélange vertical au large. La Figure 10 permet de visualiser l'importance respective des flux de consommation biologique, des échanges avec le sédiment (paramétrisation décrite plus haut), des apports par le Rhône et des échanges advectifs. Les flux advectifs se décomposent selon leur direction : Z correspond aux masses d'eau transportées selon l'axe Est-Ouest (zonal), M selon l'axe Nord-Sud (méridien) et V selon la verticale. Ces flux sont très importants, mais leur bilan net (Z+M+V) est beaucoup plus faible.

L'activité biologique est caractéristique de la situation a) (printemps). On simule alors une production primaire communautaire brute de 436 mgC.m⁻² par jour dans la zone de marge (comparée à 233 mgC.m⁻² par jour en mer ouverte), un équivalent de 88 mgC.m⁻² par jour pouvant être attribué aux apports de nitrates par le Rhône pendant cette période. En ce début de printemps, la production primaire côtière est favorisée par la faible profondeur et est maintenue grâce aux apports du Rhône et de la mer ouverte par le courant Ligure. La floraison étant plus tardive en mer ouverte, les nitrates y sont en effet plus abondants dans les eaux advectées que sur le plateau continental (Z+M+V > 0). La marge constitue dans ce cas un puits par rapport à la mer ouverte.



Au contraire, en situation hivernale (b et c), l'activité phytoplanctonique est très faible. Dans le premier cas (b), les sédiments représentent une source importante de nitrates (1420 tonnes N-NO₃ par jour), qui ne sont pas consommés par la production primaire, mais emportés vers la mer ouverte par l'écoulement d'eaux denses le long du plateau continental ($|V| > Z+M$). Cette circulation très particulière, qui se produit de façon momentanée en hiver (Fieux (1972),

Tusseau-Vuillemin *et al.* (1998)), lessive le plateau et la marge est alors une source de nitrates pour la mer ouverte.

Enfin, la situation (c) correspond à un mélange hivernal important au large, qui enrichit les eaux de surface en nitrates. Le bilan advectif est alors positif pour la marge, l'écoulement d'eaux denses le long du plateau et le flux des sédiments se trouvant également réduits. La marge constitue de nouveau un puits pour la mer ouverte.

Ces exemples montrent comment la différenciation entre mer ouverte et marge, ici essentiellement fondée sur la profondeur et les apports côtiers, induit une forte interaction entre les deux domaines, réunis par les flux advectifs. Les limitations successives de la production primaire (par la lumière ou les nutriments) sont en effet dé-corrélées. Parmi les éléments de ségrégation entre la marge et la mer ouverte, la proximité des sédiments et l'importance potentielle des flux de nutriments issus de la diagenèse est soulignée par cette première approche. La deuxième version du modèle tri-dimensionnel permet d'approfondir cet aspect.

3.3.2 *Interactions entre la colonne d'eau et les sédiments*¹⁰.

Dans une deuxième étape, la simulation annuelle obtenue avec le modèle tri-dimensionnel complété avec le module de production de particules et couplé au méta-modèle diagénétique permet d'analyser comment les matières en suspension issues de la production primaire induisent, avec un décalage temporel, un flux de nutriments reminéralisés. La maille des simulations présentées est de 11kmx11km.

La distribution des apports en particules au sédiment est nettement déterminée par la profondeur (Figure 12a, particules lentement biodégradables), avec de forts taux de déposition sur la marge et des taux plus faibles dans le bassin profond. Ces taux varient, pour le total des deux fractions rapidement et lentement biodégradable, de 0,01 mmolC/m².jour à 100 mmolC/m².jour dans la zone peu profonde du Golfe située au nord-ouest. Ce type de distribution spatiale est classiquement observé (Middelburg *et al.* (1997)), en particulier dans le Golfe du Lion (Denis et Grenz (2003)) et reflète simplement le couplage entre la vitesse de sédimentation des particules, leur rapidité de biodégradation et la profondeur. L'advection latérale vient éventuellement découpler les zones de dépôt de celles de production des particules lorsque leur temps de séjour dans la colonne d'eau est suffisamment long.

¹⁰ Bonnet, M.-P., C. O'Riordan, K. Soetaert, M.-H. Tusseau-Vuillemin, K. Buis, L. Mortier et J. Middelburg (2000). Pelagic/Benthic Coupled 3D Modeling of Carbon and Nitrogen Cycling in the Gulf of Lions (NW Mediterranean Sea): the Role of Sediments. Ocean Sciences Meeting, San Antonio, Texas, American Geophysical Union.

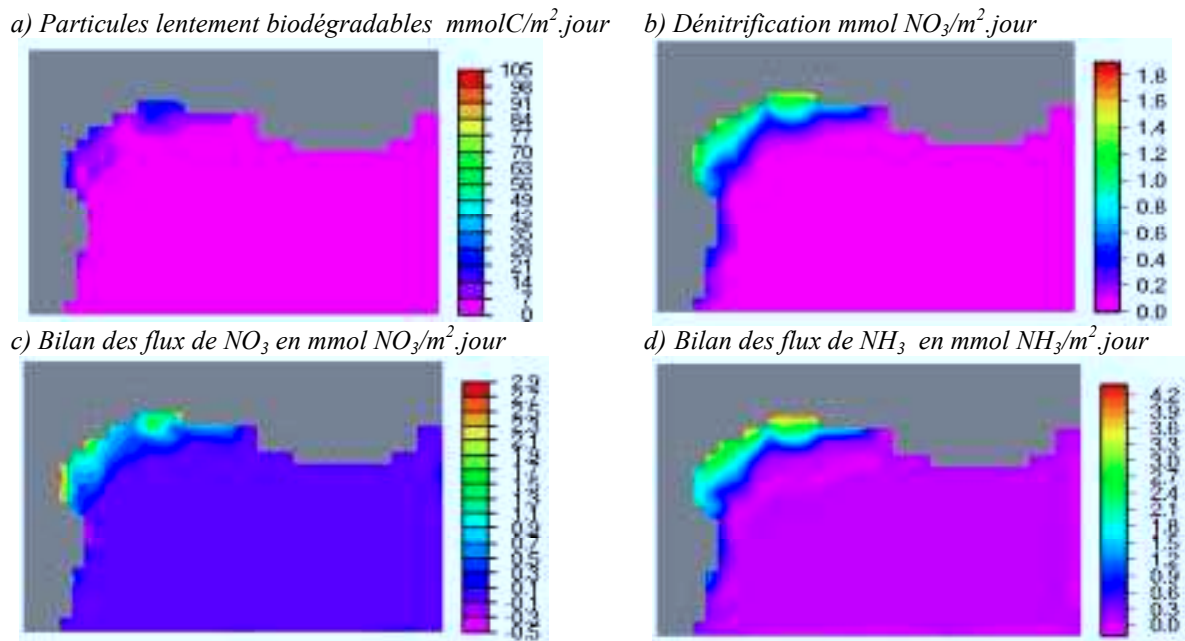


Figure 11. Répartition spatiale des moyennes annuelles : (a) taux de dépôt de carbone lentement biodégradable en $\text{mmolC}/\text{m}^2.\text{jour}$. (b) : taux de dénitrification en $\text{mmol NO}_3/\text{m}^2.\text{jour}$. (c) Bilan des flux de NO_3 (+ : vers la colonne d'eau) en $\text{mmol NO}_3/\text{m}^2.\text{jour}$. (d) Bilan des flux de NH_3 (+ : vers la colonne d'eau) en $\text{mmol NH}_3/\text{m}^2.\text{jour}$ (Bonnet *et al.* (2000)).

L'activité benthique simulée est naturellement également localisée sur le plateau, là où les dépôts de particules organiques sont les plus importants (Figure 12b, c et d). Globalement, le sédiment est une source d'ammonium pour la colonne d'eau, les flux variant de valeurs très faibles jusqu'à $4 \text{ mmol}/\text{m}^2.\text{jour}$ à l'embouchure du Rhône. Le modèle simule en revanche, dans quelques zones assez localisées, un bilan annuel négatif des nitrates qui sont pompés de la colonne d'eau vers les sédiments, afin de compenser la dénitrification. Les retours de nitrates à la colonne d'eau sont au maximum de l'ordre de $3 \text{ mmol}/\text{m}^2.\text{jour}$ sur le plateau. La dénitrification est nulle au large et peut atteindre 1 à $2 \text{ mmol}/\text{m}^2.\text{jour}$ dans les zones de forts dépôts organiques.

Sur l'ensemble du domaine de simulation, le modèle estime un dépôt organique annuel moyen de $100 \text{ mgC}/\text{m}^2.\text{jour}$. Le chiffre avancé par Denis et Grenz (2003) est nettement plus faible ($13\text{-}38 \text{ mgC}/\text{m}^2.\text{jour}$ en période de production), sur le seul plateau. Leur analyse repose cependant sur les mesures de Peinert *et al.* (1991), réalisées au large de Toulon, soit à l'entrée du Golfe du Lion, en mer Ligure. Le modèle de production de particules a été calibré sur les données de la station DYFAMED, située également dans cette zone, où le flux de particules à 100 mètres de profondeur varie effectivement de 10 à $20 \text{ mgC}/\text{m}^2.\text{jour}$ et est bien simulé (Figure 8). La production primaire sur le plateau suit un cycle différent de celui de la mer Ligure, les limitations n'étant pas les mêmes. Le bloom y est plus précoce (Tusseau-Vuillemin *et al.*, 1998), puis soutenu par les apports du Rhône et la reminéralisation benthique, donnant lieu à une production de particules beaucoup plus élevée qu'en mer. Le rapport C :N molaire moyen des particules déposées est égal à $8,6$ et correspond aux valeurs mesurées par Blackburn (1993). Les flux benthiques simulés de régénération d'azote sont élevés, en comparaison avec les observations. Lors des campagnes de mesure « MOOGLI », centrées sur le plateau, des flux de nitrate et d'ammonium de l'ordre de $0,3$ et $0,2 \text{ mmol N}/\text{m}^2.\text{jour}$ ont été mesurés au moyen d'incubation de sédiments, les flux les plus importants ($0,475 \text{ mmol NO}_3/\text{m}^2.\text{jour}$) étant relevés dans la zone d'influence du panache du Rhône (Denis et Grenz (2003)). Les flux de dénitrification mesurés sont également faibles ($\sim 0,05$

mmol NO₃/m².jour), mais surtout très variables selon la méthode d'estimation (Denis et Grenz (2003), Blackburn (1993)). Les calculs de flux à partir des profils d'eau interstitielle minorent en effet généralement la dénitrification concomitante à la nitrification. Ces faibles valeurs sont généralement attribuées au caractère oligotrophe de la Méditerranée nord-occidentale, ce qui n'est cependant pas totalement justifié pour le plateau du Golfe du Lion. Les flux de dénitrification simulés par le modèle sont plus proches de ceux habituellement mesurés dans les environnements côtiers productifs, comme par exemple la mer du nord (0,24 à 0,32 mmolN /m².jour (Lohse *et al.*, 1996)) ou la baie de Washington (0,78 à 5,3 mmolN /m².jour en baie de Washington (Devol, 1991)). A l'échelle du plateau du Golfe du Lion (zone de profondeur inférieure à 200 mètres, représentant une surface de 22880 m²), on calcule avec cette simulation que les sédiments relarguent 80 000 et 108 000 tonnes par an de N-NO₃ et N-NH₃ respectivement, à comparer aux 70 000 tonnes de N-NO₃ apportées par le Rhône (Tusseu et Mouchel, 1995). Le fait que cette activité benthique soit plus importante que ce qui est reporté dans la littérature tient essentiellement à la simulation du dépôt organique, qui constitue le forçage principal du modèle de diagenèse. Ce dernier est en effet conçu de telle sorte qu'il reconstitue précisément les flux décrits dans la littérature, y compris ceux relevés dans le Golfe du Lion lors des campagnes EROS 2000.

Le dépôt de carbone organique est finalement assez peu variable dans le temps, mis à part les creux de février, mars et octobre, qui correspondent à une faible production primaire. Le pic de matière rapidement biodégradable (et de sédimentation rapide, cf. Tableau 1) simulé en avril, consécutif au premier bloom de printemps, est décalé, pour la matière lentement biodégradable (et de sédimentation lente) au mois de novembre, ce qui contribue à lisser l'ensemble. Le taux de dénitrification est fortement corrélé à la déposition de matière organique (Figure 12b), mais pas à la réactivité de celle-ci (définie, selon Middelburg *et al.* (1997) en termes de pourcentage de dégradation par jour). Il est donc maximum en avril, mai et novembre, ce qui correspond à une origine commune des particules (premier bloom printanier).

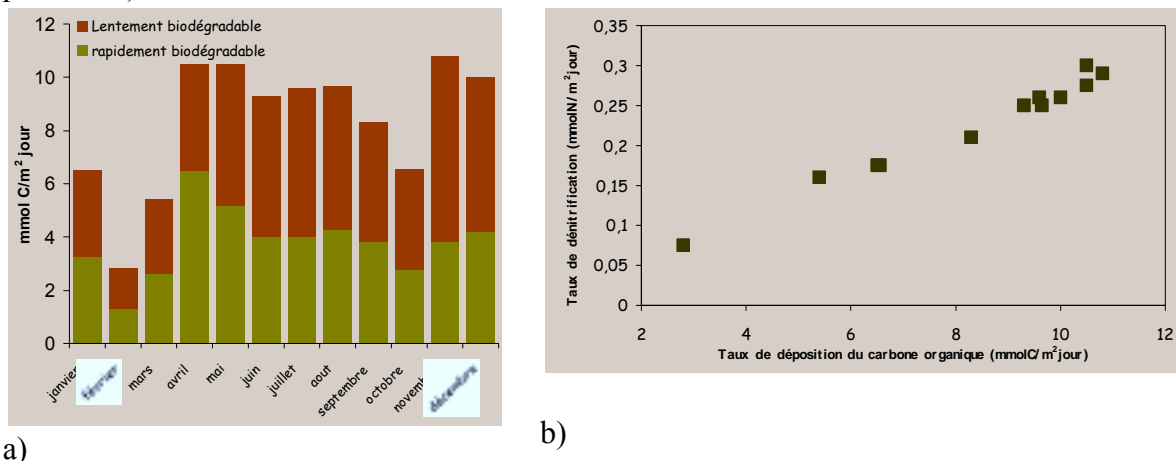


Figure 12. (a) Taux moyens mensuels de déposition de carbone organique dans le golfe du Lion en mmolC/m².jour. (b) Relation entre le taux de dénitrification (mmolN/m².jour) et le taux de déposition du carbone organique particulaire (mmolC/m².jour). Remanié d'après Bonnet *et al.* (2000).

Conclusions et perspectives.

D'un point de vue technique, le projet GLAMoR a permis une avancée significative dans le domaine du couplage des modèles, ainsi que dans le développement de chacun des trois types de modèles (dynamique, biogéochimique et diagénétique). Les modèles dynamiques à haute résolution sont de plus en plus utilisés pour analyser la dynamique côtière et le devenir des

traceurs biogéochimiques (Echevin *et al.* (2003a), Gonzales (2003)). La technique de couplage du modèle diagénétique à la colonne d'eau à l'échelle régionale a été utilisée avec succès dans d'autres environnements marins (e.g. Wijsman *et al.* (2002)). Ces outils constituent un palliatif au manque de données, qui sont onéreuses et difficiles à obtenir. Ils permettent surtout d'établir des bilans de matière intégrés qui prennent en compte la variabilité spatio-temporelle des processus et la non-linéarité de leurs cinétiques.

Dans le cas du Golfe du Lion et de sa conformation « ouverte » sur le large, le modèle régional côtier est forcé par des conditions amont dynamiques et les traceurs biogéochimiques sont renouvelés par la circulation générale au bout de trente jours au plus tard (temps de séjour d'un traceur passif, Tusseau (1996)). Le modèle côtier ne fait finalement rien d'autre que de propager l'information reçue en amont et de la moduler en fonction d'un environnement particulier. Il est donc indispensable de s'assurer de la bonne qualité du forçage amont, ainsi que de la description des facteurs de différenciation de l'environnement côtier par opposition au large, parmi lesquels en premier lieu la réponse benthique et les mélanges verticaux.

A la question initialement posée de l'importance relative des différentes sources de nitrates à la zone côtière, il est possible d'apporter des éléments de réponse, car les deux modèles tri-dimensionnels donnent des résultats cohérents. A l'échelle du plateau continental du Golfe du Lion, les simulations montrent que le flux d'azote (nitrate et ammonium) consommé par la production primaire est de l'ordre de deux fois supérieur à celui du Rhône (~71 000 tonnes N-NO₃ par an). Les apports du large sont beaucoup plus importants, le bilan de l'advection méridionale et zonale étant de l'ordre de + 350 000 tonnes N-NO₃ par an pour la zone du plateau. Cela signifie que les nitrates constamment renouvelés par la circulation générale sont utilisés pour la production primaire dans la zone côtière, privilégiée par sa faible profondeur. Le bilan d'azote du plateau continental est donc fortement lié aux caractéristiques locales (topographie, météorologie) et très sensible à la circulation générale, plus particulièrement à ses variations à méso-échelle, comme les incursions plus ou moins marquées en zone côtière ou les écoulements locaux d'eau dense par le fond.

Plus que son amplitude, c'est le devenir de la production primaire induite par ces apports qui joue sur le bilan de dioxyde de carbone atmosphérique. La production primaire en zone côtière est généralement fortement supérieure à celle du large, mais la plupart des mesures et des simulations effectuées pour analyser son devenir montrent que la matière organique ainsi produite est reminéralisée localement, à courte échéance. Heip *et al.* (2001), par exemple, calculent, sur trois années de mesures sur la marge Atlantique, un temps de séjour moyen du carbone organique biodégradable de 120 jours. Les courants benthiques sont donc là encore probablement la clef du bilan, en ce qu'ils peuvent participer à l'exportation du carbone inorganique en excès au fond.

Le facteur f (rapport entre production primaire nouvelle, utilisant les nitrates et régénérée, utilisant l'ammonium) est classiquement utilisé en océanographie pour estimer la part de la production primaire exportée hors de la couche euphotique et participant donc à la pompe océanique de dioxyde de carbone. Ce concept, de plus en plus critiqué, trouve ses limites dans le cas de la zone côtière, où la matière organique est renouvelée plusieurs fois par saison, et l'ammonium rapidement oxydé en nitrates. Dans les zones du large, de multiples co-limitations ont récemment été mises en évidence (Marty *et al.* (2002), Ridame et Guieu (2002), Mills *et al.* (2004)), ainsi que l'importance des organismes diazotrophes, qui modifient encore notre vision du cycle de l'azote. Pour toutes ces questions, la modélisation biogéochimique constitue un outil incontournable, permettant à terme de revisiter quantitativement la notion de production nouvelle/exportée qui est au cœur de la compréhension des mécanismes de régulation par l'océan de la pression partielle atmosphérique en dioxyde de carbone.

Cependant, nous relevons que les simulations diffèrent dans certains cas des observations, notamment pour l'amplitude des dépôts de particules et de l'activité benthique. Les flux de matière, qui sont l'intérêt essentiel des simulations, sont en effet excessivement difficiles à mesurer avec précision, à la différence des concentrations. On calibre donc toujours les paramètres des modèles biogéochimiques sur des concentrations de nutriments, de chlorophylle, plus rarement des flux relevés dans des trappes à sédiments. Or, les paramètres cinétiques qui contrôlent l'amplitude des flux ne sont pas forcément identifiables sur la base de ces seules informations, comme l'ont récemment montré Faugeras *et al.* (2003) dans le cas de l'estimation de flux de particules et d'une calibration sur des concentrations de nitrates. L'assimilation de données issues de l'imagerie satellitaire (Prunet *et al.* (1996)), sur le modèle des simulations météorologiques, permettra sans doute d'améliorer l'identifiabilité des flux, notamment l'exportation du carbone organique et d'utiliser les modèles à des fins prédictives avec un degré de confiance raisonnable.

Les modèles biogéochimiques ne constituent donc pas encore les logiciels infaillibles de prédiction régulièrement promis dans les réponses aux appels d'offres mais deviennent des outils de travail et de compréhension de plus en plus pertinents.

Chapitre 2 : rejets de matière organique et de nutriments en eau douce.

Contexte.

1 Changement d'échelle.

En quoi le panache du Rhône, se déversant dans le Golfe du Lion, et les rejets ponctuels, par exemple de station d'épuration, dans les rivières se comparent-ils ?... La première différence évidente concerne les dimensions physiques des environnements : le rapport entre les débits du Rhône et du courant Ligure est de l'ordre de un pour mille, alors qu'il arrive malheureusement que les rejets de station d'épuration soient du même ordre de grandeur que celui de la rivière réceptrice. Le rejet de la station Seine Aval, sur le cas de laquelle nous aurons l'occasion de revenir, représente environ 10% du débit médian de la Seine (Chesterikoff *et al.* (1998)). En région Méditerranéenne, on trouve des cours d'eau qui sont régulièrement à sec en été tout en recevant un rejet de station d'épuration.

Dans une rivière, la dimension verticale, qui conditionne tant de processus en milieu marin, s'efface au profit de la dimension longitudinale, caractéristique du continuum fluvial (Vannote *et al.* (1980)). Les variations des conditions physiques sont telles, de la tête de bassin jusqu'à l'embouchure, qu'elles conditionnent largement, non seulement l'écosystème, mais également la biogéochimie du milieu. Les cours d'eau de très petits ordres subissent fortement l'influence de l'interface avec la rive, qui se traduit par une ombre portée significative et des apports importants de matière organique grossière, arrachée aux sols. Plus en aval, la production primaire se développe plus intensément, et l'écosystème se nourrit des flux provenant de l'amont et des apports latéraux. En outre, les agglomérations importantes sont généralement situées dans les plaines alluviales, à proximité de fleuves proches de leurs embouchures, qui sont alors fortement soumis à l'influence urbaine. Il est intéressant de noter que les facteurs structurants de l'écosystème et de la géochimie sont, comme dans l'océan, l'éclairement (limitée par la végétation allochtone) et l'énergie cinétique du cours d'eau (qui conditionne les apports de matière d'origine terrestre) mais que ces facteurs sont distribués selon des échelles différentes.

Enfin, au relatif désert océanique s'oppose évidemment l'activité humaine continentale, historiquement concentrée autour des fleuves, qui apportent l'eau nécessaire à l'alimentation, l'hygiène, l'artisanat, l'industrie, l'énergie et le transport (Barles *et al.* (2001)). L'apport de substances allochtones à une rivière par un rejet urbain ou industriel est donc généralement largement plus important que celui d'un fleuve à la mer. Un exemple frappant (bien que non généralisable) est encore celui de la principale station d'épuration de la région parisienne, Seine Aval (Chesterikoff *et al.* (1998)). Les activités humaines imposent différents niveaux de variabilité temporelle qui se surimposent à la variabilité saisonnière des cycles biogéochimiques. Les rejets domestiques et industriels sont en effet très cycliques, de période journalière ou hebdomadaire, voire annuelle. De plus, l'imperméabilisation des surfaces qui accompagne classiquement l'urbanisation conduit non seulement à un raccourcissement du cycle hydrologique naturel, mais aussi à l'amplification brutale des charges d'eaux usées à traiter, et par suite à des dysfonctionnements ponctuels et majeurs de ces traitements.

Dans ce qui va suivre, on s'intéressera à l'évaluation et au possible impact des rejets urbains et industriels au travers de la matière organique et des nutriments. Bien que partiel, cet aperçu permet d'illustrer différents niveaux de pollution et de toxicité. Ma contribution porte ici sur la mise au point et la mise en œuvre de méthodes permettant l'évaluation de la matière organique biodégradable dans différents contextes, ainsi que sur la modélisation des processus de traitement des eaux usées. De façon globale, cela permet de mettre en perspective l'apport en carbone organique biodégradable de l'ensemble des stations d'épuration du bassin de la Seine par rapport au flux exporté par le fleuve à Poses. A l'échelle plus fine de la station

d'épuration, il est également important d'évaluer la variabilité des rejets en fonction des conditions de fonctionnement. Ces travaux sont publiés dans :

- **M.-H. Tusseau-Vuillemin** et G. Le Réveillé. (2001) Le carbone organique biodégradable dans les eaux traitées du bassin de la Seine. *Ingénieries, Eau, Agriculture et Territoires* **25**, pp. 3-12.
- **M.-H. Tusseau-Vuillemin**, P. Servais et J.-M. Mouchel. (2001) Diversité des rejets de station d'épuration. Leçons d'un petit bassin rural, PIREN-Seine, Paris.
- **M.-H. Tusseau-Vuillemin**, J. Garnier et P. Servais. (2001) Charges spécifiques domestiques et caractérisation des rejets de station d'épuration, rapport de synthèse du PIREN-Seine 1998-2001, Paris.
- **M.-H. Tusseau-Vuillemin**, F. Lagarde, C. Chauvière et A. Héduit. (2001) Hydrogen peroxyde (H₂O₂) as a source of dissolved oxygen in COD-degradation respirometric experiments. *Water Research* **36**, 793-798.
- **M.-H. Tusseau-Vuillemin**, J. Dispan, J.-M. Mouchel et P. Servais. (2003) Biodegradable fraction of organic carbon estimated under oxic and anoxic conditions. *Water Research* **37**, 2242-2247.
- N. Flipo, S. Even, M. Poulin, **M.-H. Tusseau-Vuillemin**, T. Améziane et A. Dauta. (2004). Biogeochemical modelling at the river scale : dynamics of phytoplankton and periphyton. *Journal of Ecological Modelling* **176**, pp. 333-347.
- F. Lagarde, **M.-H. Tusseau-Vuillemin**, P. Lessard, J.-M. Mouchel, F. Dutrop et A. Héduit. (sous presse) Variability estimation of urban wastewater biodegradable fractions by respirometry. *Water Research*.
- F. Lagarde, **M.-H. Tusseau-Vuillemin**, P. Lessard et A. Héduit. (soumis) Assessing chemical oxygen demand and nitrogen mass transfers in a multi-stage activated sludge plant. *Environmental Modelling and Software*.

Fabienne Lagarde a réalisé sa thèse de doctorat au Cemagref, sous ma responsabilité partagée avec Alain Héduit (Cemagref) et Paul Lessard (Université Laval, Québec) et est maintenant maître de conférences à l'IUT de la Roche sur Yon. Guillaume Le Réveillé et Claire Chauvière ont réalisé leur stage de D.E.A. et D.E.S. au Cemagref sous ma responsabilité.

2 Matière organique et nutriments.

Même si, selon Beach *et al.* (1995), les premiers essais de détermination de la demande en oxygène des effluents urbains remontent à la fin du dix-neuvième siècle, c'est en 1967 qu'a été publié le protocole de la Demande Biochimique en Oxygène à cinq jours (DBO₅), par Montgomery (1967). C'est donc dès le début du vingtième siècle que la consommation d'oxygène induite par la matière organique biodégradable des effluents a retenu l'attention des hygiénistes. Jusqu'au années 1970, les critères pris en compte restent les Demandes Chimique et Biochimique en Oxygène (DCO et DBO), les matières en suspension, putrescibilité et autres « substances toxiques ou indésirables » (Alain Héduit, com. pers.). La circulaire du 7 juillet 1970 mentionnait néanmoins, dans le cas de "traitement renforcé dans les zones dites de proximité", une "concentration en azote total" de 10 mgN/L au maximum. L'arrêté du 13 mai 1975 définit quatre niveaux de rejet avec des concentrations limites en azote réduit pour les niveaux IV, V et VI. Il faudra attendre la circulaire du 4 novembre 1980 pour que les premiers niveaux de rejet sur le phosphore soient définis. La création du concept de zone sensible à l'eutrophisation, la loi sur l'eau de 1992 et maintenant la directive cadre européenne de 2000 ont progressivement amené l'azote et le phosphore au rang des polluants devant être prioritairement éliminés par le traitement des eaux usées.

Méthodologies pour la caractérisation biochimique de la matière organique dissoute dans l'eau.

La matière organique constitue un grand fourre-tout de chimiste, dont la définition est essentiellement opérationnelle et complémentaire à celle des substances inorganiques, généralement mieux connues. On considère classiquement que l'on sépare les éléments dissous du particulaire par filtration sur une membrane de taille de pores de l'ordre du micron. Entre le nanomètre et le micron, on trouve la phase colloïdale, qui constitue l'essentiel de la matière organique dissoute naturelle. D'un point de vue physico-chimique, cette phase instable est extrêmement intéressante à étudier et pilote probablement en grande partie les processus de transport des éléments en rivière (Buffle et Leppard (1995), Wilkinson *et al.* (1999)), mais cela ne constitue pas notre propos. Tout au plus, nous mentionnerons la taille moyenne ou le poids moléculaire moyen des molécules organiques, estimés par des techniques comme l'ultrafiltration et la chromatographie d'exclusion stérique (e.g. Schärfer *et al.* (2002)).

1 Un rapide aperçu des stratégies possibles.

On peut distinguer grossièrement deux écoles assez distinctes : la caractérisation globale des échantillons aqueux (paramètres quantitatifs associés à des processus, comme la biodégradabilité) et la caractérisation physico-chimique plus ou moins poussée, voire l'identification de composés ou de groupements moléculaires à partir d'extraits concentrés et lyophilisés. Le socle de cette seconde approche est le fractionnement entre les substances humiques, fulviques et transphiliques par extraction séquentielle sur résines, qui fait l'objet de protocoles bien définis dans le cadre de l'IHSS¹¹. La première approche est plutôt due aux micro-biologistes, du milieu naturel comme des industries du traitement de l'eau, qui s'intéressent plus aux processus microbiens qu'aux structures chimiques (Henze (1992), Servais *et al.* (1995), Lehtola *et al.* (2001)). C'est avec ce type de caractérisation que l'on parvient actuellement à modéliser le devenir de la matière organique (Even *et al.* (1998), Henze (1992)). La seconde approche, préférée des chimistes, permet de préciser les propriétés chimiques des molécules, voire d'en identifier certaines (1-10% selon Leenheer et Croué (2003)), au prix d'un protocole assez sévère commençant par l'acidification à pH 2 de l'échantillon. D'après Hedges *et al.* (2000), la proportion de matière organique naturelle non identifiée augmenterait avec le degré de métabolisation de la matière organique, c'est à dire son « âge ». Le couplage de techniques de plus en plus sensibles comme la chromatographie en phase gazeuse associée à plusieurs spectromètres de masse permet cependant d'envisager des progrès rapides dans la caractérisation de la structure chimique de ces mélanges complexes. Certaines mesures chimiques globales, nécessitant peu de traitements préalables de l'échantillon, apportent une caractérisation plus grossière mais très utile. Par exemple, l'analyse spectrophotométrique de la matière organique dissoute des eaux naturelles, couplée à d'autres méthodes de caractérisation plus ou moins complexe (fluorescence, RMN ¹³C), a permis de montrer que l'absorbance spécifique à 254 nm était un bon indicateur de l'origine pédogénique ou aquagénique (Zumstein et Buffle (1989)) et de l'aromaticité (Leenheer et Croué (2003)). L'analyse élémentaire (C, H, N, O) apporte des indications sur la polarité et la saturation des chaînes de carbone (Ma *et al.* (2001)). L'objectif de ces travaux semble plus de parvenir à une identification des différentes provenances que reflète l'échantillon d'eau naturelle qu'à la compréhension de la transformation par métabolisation. Dans l'objectif d'une identification de la provenance des composés organiques, Imai *et al.* (2001) proposent, à partir d'un nombre important d'échantillons allant de la rivière forestière aux eaux usées en passant par les lacs eutrophes, un arbre de caractérisation permettant de qualifier les origines

¹¹ International Humic Substances Society

d'un échantillon naturel. C'est également la démarche de Marhaba *et al.* (2000), avec la technique de la signature spectrale en fluorescence.

On sait encore assez peu de choses sur l'évolution de la structure chimique de la matière organique au fur et à mesure de sa métabolisation microbienne, autrement dit, sur les liens entre le caractère biodégradable et la formule chimique des molécules organiques. Namour et Müller (1998) ont montré qu'au cours du traitement biologique, la fraction protéinique des eaux usées augmentait, suggérant un enrichissement par les produits microbiens solubles. Barker *et al.* (1999) se sont intéressés au poids moléculaire moyen des molécules constituant la matière organique réfractaire après traitement anaérobie. Récemment, Dignac *et al.* (2000a) ont montré que les traitements conventionnels, qui permettent de dégrader efficacement les composés aliphatiques, conduisent à l'enrichissement des eaux traitées en composés fortement oxydés et ramifiés, comprenant des groupements C=O et des fonctions amides. Quenea *et al.* (2005) ont appliqué des techniques chimiques récentes et complexes à la caractérisation de la matière organique réfractaire de sols, et y ont trouvé une faible contribution de produits d'origine bactérienne (dérivés protéiniques et lipidiques).

Les techniques classiques d'identification, reposant sur l'hydrolyse des molécules, ne parviennent pas bien à caractériser les eaux traitées, dont les composés sont justement réfractaires à l'hydrolyse (Dignac *et al.* (2000b)).

2 Les bilans de matière organique biodégradable.

2.1 Oxygène ou carbone ?

La fraction biodégradable de la matière organique contrôle l'activité bactérienne et la consommation d'oxygène qui lui est liée, dans les systèmes naturels comme dans les bassins biologiques des stations d'épuration. A ce titre, elle est étudiée de longue date, au moyen de bioessais pendant lesquels on mesure l'oxygène consommé : par exemple, la Demande Biochimique en Oxygène à cinq jours (DBO₅). Comme on l'a mentionné plus haut, cette mesure, mise au point afin d'estimer grossièrement la consommation d'oxygène induite par le rejet, est moins précise qu'une mesure de carbone organique et ne permet pas de réaliser les mêmes bilans de masse (Tusseau-Vuillemin et Le Réveillé (2001)). L'essentiel des données concernant la matière organique dans les rejets étant cependant traditionnellement exprimées en équivalent oxygène (Demande Chimique en oxygène et DBO₅), un groupe de chercheurs a développé, ces dernières années, dans le cadre de l'IWA¹², un modèle des processus biogéochimiques en rivière, dont la variable principale est l'oxygène (Reichert (2001)). Ce modèle permet théoriquement de simuler le devenir des rejets dans le milieu naturel. Dans la pratique cependant, la limite de détection de la DBO₅ et de la DCO rend ces mesures difficilement applicables au milieu naturel.

Le protocole optimisé par Servais *et al.* (1995) est dérivé de celui proposé en 1987 (Servais *et al.* (1987)) et repose sur un bilan du carbone organique dans les phases particulaire et dissoute après 45 jours d'incubation en conditions oxiques. Le formalisme utilisé généralement pour décrire la métabolisation de la matière organique (e.g. Servais *et al.* (1987), Henze *et al.* (1987)) suppose en effet qu'il est possible de définir de façon univoque les fractions biodégradable ou réfractaire de la matière organique. Nous discuterons plus en détail les distinctions de cinétique de biodégradation. En ce qui concerne l'établissement des fractions réfractaire et biodégradable de la matière organique, Percherancier *et al.* (1996) ont montré que le résultat des incubations à long terme était indépendant de la nature de l'innoculum bactérien éventuellement ajouté, qui n'influe que sur la cinétique du processus. C'est la raison pour laquelle le protocole de Servais *et al.* (1995) est aussi long, comparé à ceux proposés par

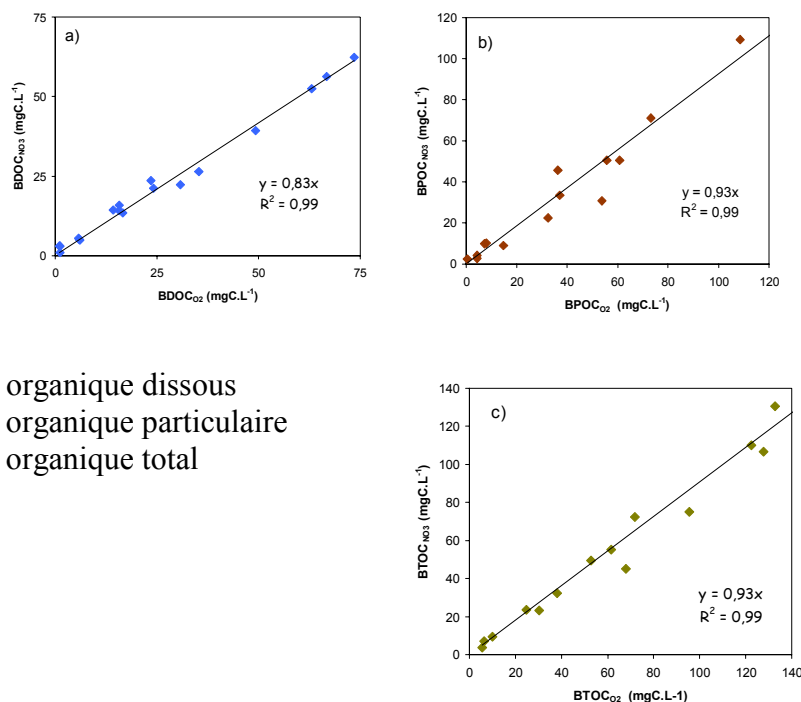
¹² International Water Association

Lucena *et al.* (1990), Kaplan et Newbold (1995), Dubreuil *et al.* (1997), ou Namour et Müller (1998) dans lesquels le processus de biodégradation est optimisé. Il est cependant intéressant, pour mesurer précisément les faibles niveaux de carbone organique biodégradable caractéristiques des milieux naturels (2-3 mgC/L) d'éviter un ajout de biomasse, comme le propose Servais *et al.* (1995).

2.2 Carbone organique biodégradable en conditions anoxiques¹³.

Bien que ce protocole soit extrêmement simple, ainsi que les mesures à réaliser, il reste lourd à mettre en œuvre, du fait des précautions à prendre pour maintenir le milieu en conditions oxiques pendant quarante-cinq jours (généralement assurées par bullage) sans contamination organique. C'est la raison pour laquelle, dans le cadre de la thèse de Jérôme Dispan et du programme PIREN Seine, un protocole similaire, en conditions anoxiques, a été mis au point (Tusseau-Vuillemin *et al.* (2003a)). Ce protocole repose sur le fait que les bactéries hétérotrophes sont généralement capables, en conditions anoxiques, d'utiliser les nitrates plutôt que l'oxygène comme accepteur d'électrons pour la métabolisation de la matière organique biodégradable. Au lieu de maintenir des conditions oxiques dans les incubateurs, on se place donc délibérément en conditions anoxiques (en faisant buller du diazote pendant quelques minutes et en scellant les flacons d'incubation) pendant quarante-cinq jours. Un niveau suffisant de nitrates (évalué à partir d'une mesure préliminaire de la DCO de l'échantillon, convertie en « demande chimique de nitrates ») est assuré dès le début d'incubation sous forme de nitrate de sodium concentré (100 gN/L). Afin de valider cette méthode, les deux types d'incubation, oxique (Servais *et al.* (1995)) et anoxique (ci-dessus) ont été appliqués à dix-huit échantillons d'eau de rivière, d'eau usée brute et traitée, dans laquelle la matière organique diffère à la fois par sa nature et par sa concentration. La comparaison des résultats obtenus en termes de carbone organique biodégradable dissous, particulaire et total est présentée en Figure 13. Des corrélations très significatives ont été obtenues, qui expriment une légère (néanmoins significative : pentes < 1, $\alpha < 0,5$) sous-estimation de la matière organique biodégradable lorsqu'elle est déterminée en conditions anoxiques (17%, 7% et 7% pour les différentes fractions).

¹³ Tusseau-Vuillemin M-H, Dispan J, Mouchel J-M, Servais P. Biodegradable fraction of organic carbon estimated under oxic and anoxic conditions. *Wat Res* 2003; 37: 2242-2247.



- a) : carbone organique dissous
- b) : carbone organique particulaire
- c) : carbone organique total

Figure 13. Comparaison des concentrations en carbone organique biodégradable obtenues en conditions oxiques (indice O₂) et anoxiques (indice NO₃). Figure d'après Tusseau-Vuillemin *et al.* (2003a).

Au-delà de la conclusion opérationnelle selon laquelle il est possible de réaliser une mesure de carbone organique biodégradable en conditions anoxiques et de la comparer à d'autres valeurs obtenues en conditions oxiques, cette expérience pose la question de la signification de tels bilans. Observe-t-on réellement, en fin d'incubation, une partie des molécules présentes initialement et réfractaires à la métabolisation, ce qui pourrait être une propriété intrinsèque, ou bien un cocktail de molécules fabriquées par les bactéries au cours de la métabolisation, dépendant de fait des conditions dans lesquelles le processus s'est déroulé ? Le formalisme habituel de fractionnement de la matière organique en classes de biodégradabilité nous incite à raisonner selon la première hypothèse, mais pour comprendre cet exemple, on doit probablement prendre en compte également l'ensemble des processus de métabolisation. On considère depuis longtemps que la biodisponibilité de la matière organique pour les micro-organismes est similaire en conditions oxiques ou anoxiques (Van Haandel *et al.* (1981)) et cette hypothèse constitue le socle des modèles actuels de traitement des eaux usées (Henze *et al.* (1987)), même si les techniques de microbiologie habituellement utilisées pour la vérifier n'autorisent pas une précision à 10%. En revanche, il est possible que l'incubation en conditions anoxiques provoque des apports supplémentaires de matière organique réfractaire à la métabolisation, par exemple du fait de la mortalité d'une partie de la biomasse hétérotrophe qui ne parvient pas à s'adapter et de la quasi-totalité des protozoaires. La disparition de ces prédateurs bactériens est en outre de nature à diminuer l'efficacité de la métabolisation ultime de la biomasse bactérienne qui pourrait alors s'accumuler sous forme de débris organiques non dégradés. Ainsi, dans la partie hypoxique d'un réservoir d'eau douce, Bellanger *et al.* (2004) observent une composition isotopique de la matière organique en suspension compatible avec une origine bactérienne. Ces hypothèses sont évaluées et grossièrement quantifiées par Tusseau-Vuillemin *et al.* (2003a), qui montrent qu'elles pourraient rendre compte de la différence de 7 à 17% des fractions de carbone organique biodégradable total et dissous et relativisent la notion de matière organique réfractaire.

3 Caractérisation par les cinétiques de biodégradation.

Les bilans réalisés après plusieurs jours d'incubation ne permettent pas de distinguer les cinétiques de dégradation des composés organiques. Or, selon la nature de ces composés et la biomasse présente, leur métabolisation peut demander quelques heures ou quelques dizaines de jours (Figure 14).

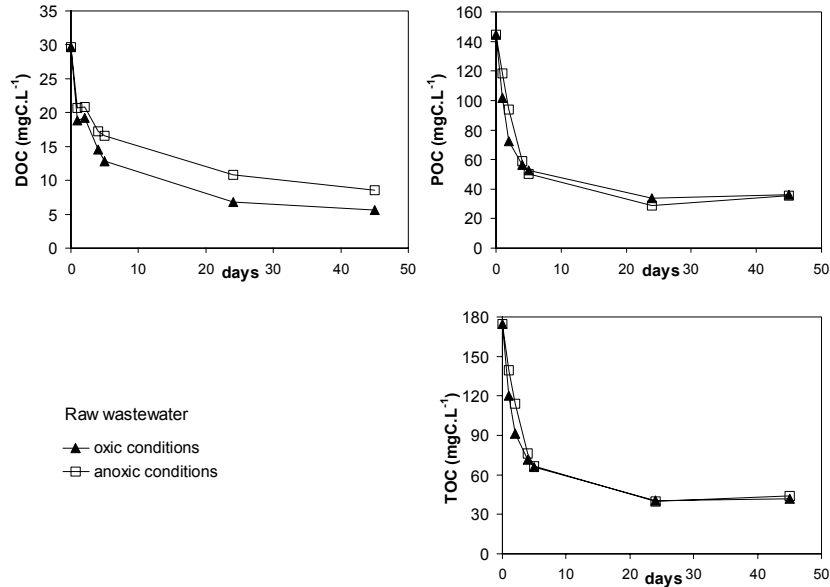


Figure 14. Cinétiques de dégradation du carbone organique dans des eaux résiduaires obtenues en conditions oxygènes et anoxiques (données obtenues par J. Dispan, Figure d'après Tusseau-Vuillemin *et al.* (2003a)).

Cette information est particulièrement importante pour simuler correctement le traitement de la DCO en station d'épuration biologique et c'est dans ce but qu'Ekama et Marais (1979) ont proposé de distinguer deux compartiments de matière organique à cinétique de dégradation rapide ou lente. Rapidement, cette distinction s'est avérée précieuse pour évaluer précisément les processus de dénitrification (Van Haandel *et al.* (1982)) et de déphosphatation (Siebritz *et al.* (1983) ; Nicholls *et al.* (1985) ; Pitman (1991)). Dans leurs versions les plus récentes, les modèles de simulation du traitement biologique du phosphore utilisent une description encore plus complexe de la matière organique, dans laquelle la fraction facilement biodégradable est scindée en deux parties : directement assimilable et fermentescible (Gujer *et al.*(1995)). Dans le contexte d'un rejet de matière organique biodégradable en rivière, la connaissance des cinétiques de dégradation de la matière organique est également indispensable à la prédiction de la localisation, de la durée et de l'amplitude de l'impact sur les concentrations en oxygène dissous (Even *et al.* (1998), Flipo *et al.* (2004)).

3.1 Méthodes respirométriques.

3.1.1 Principe.

Comme leur nom l'indique, les méthodes respirométriques reposent sur la mesure de la respiration bactérienne au cours de l'incubation de l'échantillon que l'on cherche à caractériser. La forme du signal obtenu (exemple en Figure 15) permet de distinguer différentes cinétiques de dégradation de la matière organique initialement présente. L'interprétation complète et quantitative repose sur l'optimisation des conditions initiales et des paramètres cinétiques d'un modèle sur les données expérimentales. Ce modèle décrit la dynamique couplée de la biomasse bactérienne et des fractions de matière organique,

généralement sur le même principe que les modèles de simulation du traitement biologique de la DCO (Henze (1992), Spanjers *et al.* (1998)).

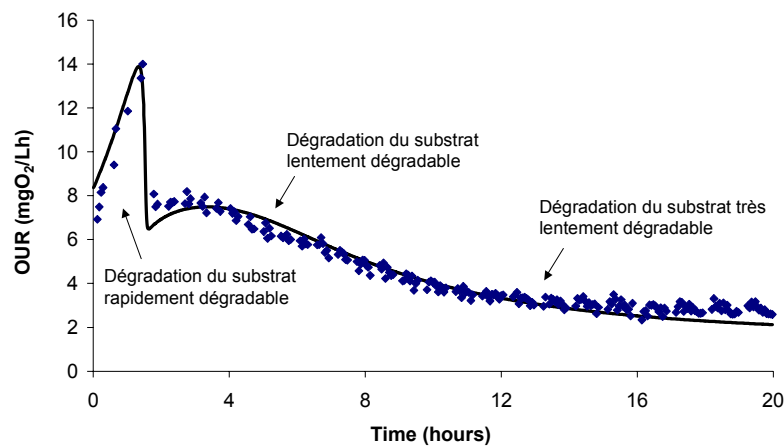


Figure 15. Respirations (« Oxygen Uptake Rate ») mesurées lors de l'incubation d'un échantillon d'eau résiduaire (points) et simulées (trait). D'après Lagarde *et al.* (in press).

3.1.2 Les techniques¹⁴.

Les variantes expérimentales des techniques respirométriques tiennent d'une part au mode d'incubation : avec ou sans biomasse ajoutée, et au moyen utilisé pour maintenir une concentration en oxygène dissous compatible avec l'activité bactérienne.

Spanjers *et al.* (1999) puis Sperandio et Paul (2000) ont montré que la combinaison de deux incubations, avec et sans biomasse ajoutée, permettait un traitement numérique plus efficace des résultats. Cependant, Chudoba *et al.* (1992), Spanjers et Vanrolleghem (1995) critiquent la représentativité des expériences réalisées sans ajout de biomasse bactérienne, dans la mesure où la population initialement présente se multiplie en début d'incubation (cf. début de courbe, Figure 15), ce qui occasionne une consommation d'énergie importante et une modification éventuelle de la structure trophique.

Le maintien d'une concentration optimale d'oxygène dissous est également délicat, l'apport continu d'oxygène étant incompatible avec la mesure de la respiration. Une option consiste à aérer continuellement le réacteur principal tout en pompant à intervalles réguliers une fraction du liquide dans une chambre respirométrique où la mesure de respiration est effectuée sur une période assez courte pour rester en conditions oxiques (Spanjers *et al.* (1998)). L'inconvénient majeur est l'éventuel manque de représentativité de la fraction prélevée pour la mesure, notamment dans le cas d'échantillons riche de matières en suspension. Une autre option consiste à réaliser une mesure séquencée dans le réacteur principal, en alternant les phases d'oxygénation et de mesure. L'oxygénation (généralement réalisée par simple bullage d'air) doit pour cela être asservie à une mesure en continu de l'oxygène dissous. Tusseau-Vuillemin *et al.* (2001b) ont relevé différentes limites de cette technique et ont proposé en alternative à l'aération par bullage l'ajout de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Le peroxyde d'hydrogène se dissocie en oxygène au contact d'enzymes (catalases) qui constituent une partie de la réponse bactérienne à un stress oxydant. L'innocuité de H₂O₂ pour les bactéries hétérotrophes

¹⁴ Tusseau-Vuillemin M-H, Lagarde F, Chauvière C, Héduit A. Hydrogen peroxyde (H₂O₂) as a source of dissolved oxygen in COD-degradation respirometric experiments. *Wat Res* 2001; 36: 793-798.

Claire Chauvière, 1999, « mise au point d'une technique respirométrique en vue de la caractérisation des eaux usées », Sciences de l'Environnement orientation Gestion Intégrée des Ressources Hydriques, Fondation Universitaire Luxembourgeoise, 45 p.

impliquées dans la dégradation des substrats organiques a été démontrée par comparaison des réponses respirométriques (Figure 16).

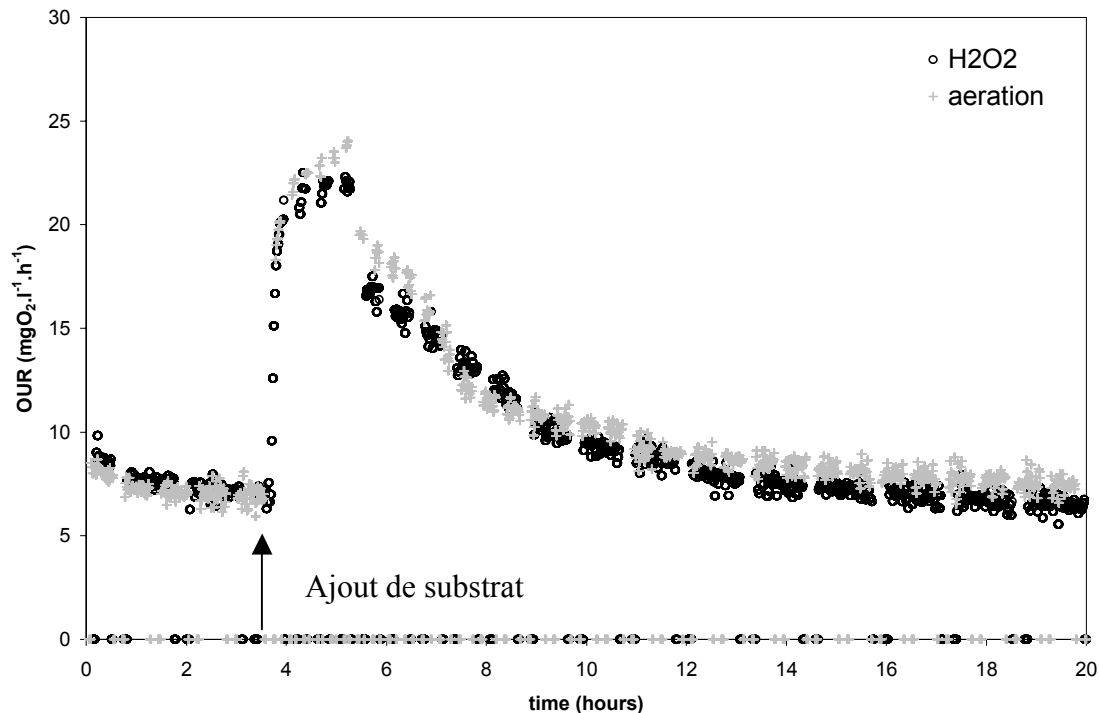


Figure 16. Comparaison des respirations (mgO₂/Lh) obtenues avec la technique d'aération (croix) et H₂O₂ (cercles) pendant une expérience de dégradation de substrat. Le substrat synthétique est ajouté au taux de 24 ml.h⁻¹ à la boue activée, pendant soixante-quinze minutes. D'après Tusseau-Vuillemin *et al.* (2001b).

Soulignons que ce type de comparaison directe entre deux réponses bactériennes, dans des réacteurs différents, est extrêmement délicat à obtenir, du fait de la variabilité des populations bactériennes (la répartition d'un échantillon de boue activée entre deux réacteurs donne déjà lieu à une forte variabilité des respirations). C'est l'une des raisons pour lesquelles les respirations bactériennes sont rarement assorties d'un écart-type de mesure.

3.2 Comment évaluer la variabilité des fractions de biodégradabilité d'un réseau d'assainissement¹⁵ ?

Comme on l'a mentionné plus haut, la discrimination entre fractions de matière organique biodégradables avec différentes cinétiques repose sur l'optimisation des paramètres et des variables initiales d'un modèle aux cinétiques respirométriques obtenues expérimentalement (Figure 15). La détermination de ces fractions repose donc à la fois sur le modèle choisi et sur les modalités de la procédure d'optimisation. Du fait que les processus de croissance bactérienne, d'hydrolyse et de métabolisation se représentent généralement par des cinétiques couplées et non-linéaires, l'optimisation n'est pas simple et la question de l'identifiabilité des paramètres et des fractions a fait l'objet de multiples développements mathématiques (e.g. Dochain *et al.* (1995), Vanrolleghem *et al.* (1999), Spanjers *et al.* (1999), Sperandio et Paul (2000)). Plus concrètement, on peut poser la question de la comparaison de différents échantillons caractérisés par ces méthodes complexes. Prenons l'exemple de la fraction

¹⁵ Lagarde F, Tusseau-Vuillemin M-H, Lessard P, Mouchel J-M, Dutrop F, Héduit A. Variability estimation of urban wastewater biodegradable fractions by respirometry, soumis à Water Research (juin 2004).

directement assimilable, nommée S_S dans le formalisme de l'IWA. L'équation (1) est très généralement utilisée pour simuler les respirations (« Oxygen Uptake Rate » en anglais, soit OUR dans ce qui suit), en fonction de Y_H (rendement de croissance bactérien), μ_H (taux de croissance bactérien), K_S , constante de demi-saturation, S_S (fraction directement assimilable) et $X_{B,H}$ (biomasse bactérienne).

$$OUR = -\frac{dO_2}{dt} = \frac{1 - Y_H}{Y_H} \mu_H \frac{S_S}{S_S + K_S} X_{B,H} \quad (1)$$

On comprend sur cet exemple que, même si, par la structure même de l'équation, la définition conceptuelle de S_S est équivoque (si les paramètres K_S et μ_H sont différents d'une exploitation numérique à une autre), les valeurs numériques des différentes fractions assimilables obtenues ne seront pas strictement comparables. Peu de suivis ont été réalisés pour évaluer la variabilité temporelle de ce type de fractionnement pour des stations données. Parmi ceux-ci, Sperandio *et al.* (2001) ont analysé par respirométrie une vingtaine d'échantillons d'eaux résiduaires urbaines. Il est frappant d'observer la variabilité des paramètres cinétiques à laquelle ont conduit les différentes optimisations (Sperandio et Paul (2000)) et difficile de conclure si cette variabilité est caractéristique des substrats présents dans l'échantillon ou bien des populations bactériennes. Quoiqu'il en soit, cette apparente souplesse d'interprétation se fonde nécessairement dans un formalisme beaucoup plus strict lorsqu'il s'agit de simuler le devenir de la matière organique dans une installation de traitement ou dans le milieu naturel (Henze *et al.* (1987), Reichert (2001)).

Une alternative à l'optimisation des paramètres cinétiques échantillon par échantillon consiste à tenter d'appliquer un unique formalisme et un unique jeu de paramètres sur un ensemble d'échantillons supposés relativement homogènes, afin de n'optimiser que les différentes fractions. Cette stratégie nécessite un traitement numérique efficace, car d'importants jeux de données sont utilisés dans le cadre d'optimisations complexes de modèles non-linéaires. Le développement d'un logiciel adapté au CERREVE (Dispan *et al.* (soumis)) nous a fourni l'opportunité de tenter cet exercice sur un ensemble de treize échantillons collectés dans le cadre du D.E.A. de Catherine Safronieva, encadrée par Fabienne Lagarde (doctorante). Ce logiciel original permet de minimiser une fonction coût sous différents types de contraintes, de façon particulièrement efficace grâce à un logiciel annexe qui calcule les gradients de fonction par différentiation automatique (Odyssée, décrit par Faure et Papegay (1998)).

Très brièvement, les respirogrammes obtenus avec les eaux usées non décantées, prélevées aux exutoires du réseau séparatif et du réseau unitaire de la ville de Meaux, ont été simulés au moyen d'un modèle à trois substrats (inspiré de Sollfrank et Gujer (1991), Spanjers et Vanrolleghem (1995)), comprenant une phase préliminaire d'adsorption sur la biomasse avant hydrolyse

(cf. Figure 30 et Tableau 5 en

Annexe). A raison de quatre fractions par échantillon (S_S : substrat rapidement assimilable, $X_{R,NA}$: rapidement hydrolysable, $X_{S,NA}$: lentement hydrolysable, X_{BH} : biomasse) et de sept paramètres cinétiques (notés p^*), il s'agit d'optimiser cinquante-neuf variables simultanément. Si l'on suit la procédure classique, on optimise treize fois (et de façon indépendante) onze variables (quatre fractions et sept paramètres, notés p_i). La comparaison de ces deux approches montre bien que l'amélioration de l'optimisation (obtenue en réalisant treize optimisations différentes) induit une dispersion très forte des paramètres bactériens (Tableau 2) qu'il est difficile de justifier.

Tableau 2. Paramètres cinétiques obtenus avec les deux procédures d'optimisation (globale (p^*) ou échantillon par échantillon (p_i)), comparés aux valeurs de la littérature. Les moyennes des paramètres p_i sont assortis de leur écart-type entre parenthèses. D'après Lagarde *et al.* (in press).

Parameter	μ_H	b_H	K_h	k_h'	K_S	f_{ma}	K_a
Unit	j^{-1}	j^{-1}	j^{-1}	j^{-1}	mgCOD L ⁻¹	Dimensionless	L mgCOD ⁻¹ j ⁻¹
$F(p^*)/N = 1.6$ (mgO ₂ L ⁻¹ h ⁻¹) ²	10.9	0.36	4.8	0.041	0.31	11.2	0.057
$\frac{1}{N} \sum_{i=1}^{13} F_i(p_i) = 0.8$ (mgO ₂ L ⁻¹ h ⁻¹) ²	8.6 (4.8)	0.28 (0.09)	9.5 (8.8)	0.61 (0.92)	4.6 (3.6)	4.0 (4.3)	0.32 (0.20)
Literature values	6 [1] 3.5 [2] 1.5 [3]	0.26 [2] 0.24 [3]	25 [3] 17.5-52 [4]	2.5 [3]	20 [1] 0.22 [2] 5 [3] 0.3-1 [4] 2.5-4 [5]	1.06 [2]	1* [2]

[1] valeurs proposées par défaut dans ASM1, Henze *et al.* (1987)

[2] Sperandio et Paul (2000) * paramètre fixé par les auteurs.

[3] Sollfrank et Gujer (1991)

[4] Brouwer *et al.* (1998)

[5] Kappeler et Gujer (1992)

La simulation obtenue avec un unique ensemble de paramètres reste très convenable (Tableau 2, exemple graphique en Figure 17).

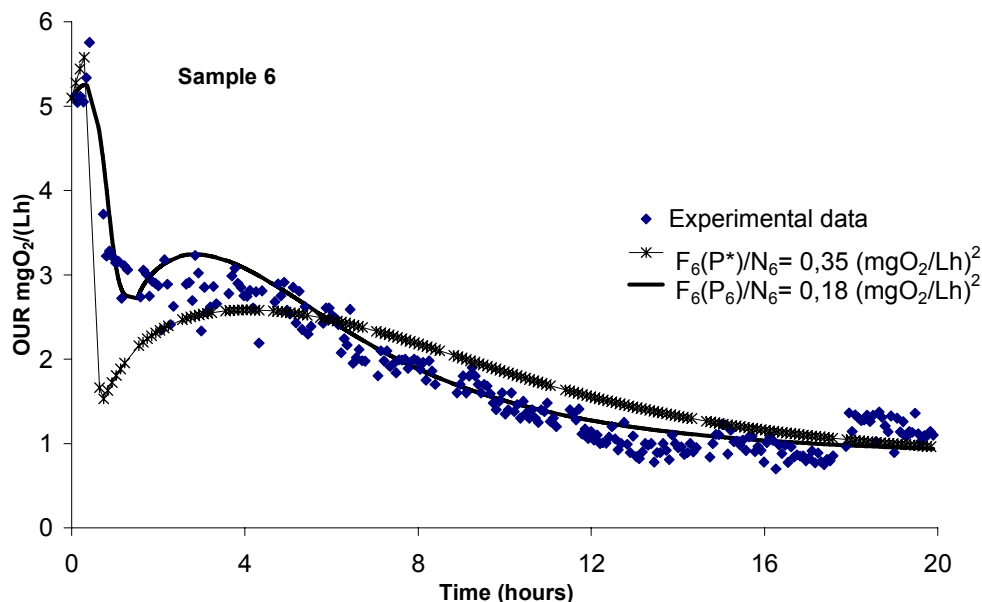


Figure 17. Respirogramme (points) simulé à l'aide des paramètres et des fractions optimisés de façon indépendante (p_6 , trait épais) ou globalement sur les treize échantillons (p^* , trait fin et croix). D'après Lagarde *et al.* (in press).

A partir de cette optimisation globale, il a été possible d'estimer un fractionnement de la matière organique en classes de biodégradabilité cohérentes entre elles et donc d'estimer leur variabilité sur une période de plusieurs mois couvrant des pluviométries variées (Lagarde *et al.* (in press)). Les fractions sont très variables (écart-type variant de 30 à 70%), tout particulièrement dans le réseau unitaire, la fraction très rapidement biodégradable S_S restant dans tous les cas inférieure à 5% de la DCO totale (Figure 18). Du fait que les échantillons ont été collectés par des pluviométries variées, on peut considérer que cette distribution est représentative de la variabilité d'un réseau unitaire à dominante domestique et l'utiliser pour des exercices de simulation.

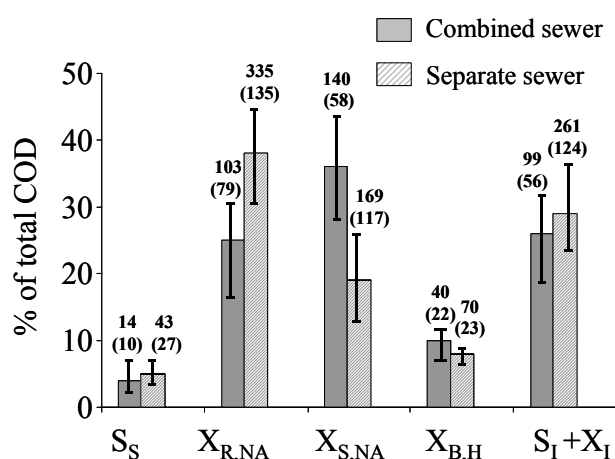


Figure 18. Valeurs moyennes des fractions exprimées en pourcentage de la DCO totale. Gris uni : réseau unitaire (six échantillons); hachures : réseau séparatif (sept échantillons). D'après Lagarde *et al.* (in press).

Rejets de matière organique urbaine par temps sec à l'échelle du bassin de la Seine^{16,17,18}

L'impact des rejets s'apprécie à des échelles de temps et d'espace variées, en lien avec la spéciation des substances rejetées et le facteur de dilution dans le milieu récepteur. Les particules rejetées ont en effet un devenir local, car elles sédimentent. Les solutés, au contraire, sont transportés vers l'aval avec le courant et leur devenir, voire leur impact, s'envisage à l'échelle d'un bassin versant plus ou moins important.

Le bassin de la Seine en fournit une bonne illustration : pris dans son ensemble, il est clairement dominé par le point d'accumulation de l'agglomération parisienne (76% de la population du bassin y vit, sur 15% de la surface !), dont les rejets domestiques sont concentrés sur l'usine de traitement Seine aval et créent un impact visible jusqu'à l'estuaire. Cependant, les affluents amont sont tous également soumis à des rejets locaux, de moindre importance, mais dont l'impact local et cumulé est mal connu.

Le carbone organique total ne fait pas partie des paramètres classiquement suivis sur les effluents de station d'épuration, ni, a fortiori, ses fractions dissoute, particulière, biodégradable ou réfractaire. Afin d'évaluer les rejets de ces différentes fractions à l'échelle du bassin de la Seine, nous avons procédé à l'échantillonnage des effluents de plusieurs

¹⁶M.-H. Tusseau-Vuillemin et G. Le Réveillé. (2001) Le carbone organique biodégradable dans les eaux traitées du bassin de la Seine. *Ingénieries, Eau, Agriculture et Territoires* **25**, pp. 3-12.

¹⁷ Guillaume Le Réveillé, 2000, biodégradabilité des rejets de station d'épuration du bassin de la Seine, mémoire de D.E.A. Sciences et Techniques de l'Environnement, Université Paris XII- val de Marne.

¹⁸ Marie Sainte-Laudy, 2001, rejets des stations d'épuration situées sur le Grand Morin, mémoire de D.E.S. de la Fondation Universitaire Luxembourgeoise, 25 pages.

stations d'épuration, choisies sur la base d'une analyse aussi complète que possible de l'ensemble du parc.

1 Echantillonnage du parc des installations de traitement du bassin de la Seine

Les installations d'épuration du bassin traitent une charge d'environ dix-sept millions d'équivalents-habitants (e.h.). Leurs capacités s'échelonnent de cinquante e.h. à sept millions d'e.h., mais plus de la moitié des stations ont une capacité inférieure à mille e.h..

La base de données de l'année 1996 de l'Agence de l'Eau Seine Normandie regroupe, pour chacune des installations, leurs caractéristiques techniques principales, ainsi que les rendements mesurés, par les Services d'Assistance Technique aux Exploitants de Stations d'Épuration (SATESE) avec des fréquences variables (en moyenne deux fois par an) sur les matières organiques oxydables, les nutriments et les matières en suspension. Ces différents rendements sont bien sûr fortement corrélés entre eux, le phosphore restant à part dans la mesure où son traitement nécessite une adaptation des filières classiques. En revanche, il est surprenant de constater que la capacité et la charge (rapport entre flux réels et flux de dimensionnement) des installations ne sont que peu ou pas corrélées linéairement avec les différents rendements du traitement (Tusseau-Vuillemin et Le Réveillé (2001)). La recherche de corrélations non-linéaires, réalisée au moyen de l'analyse des correspondances multiples (Escoffier et Pagès (1988)¹⁹) permet d'introduire le paramètre qualitatif « type de filière » et confirme que la charge des stations d'épuration n'est pas un paramètre structurant de l'ensemble des données. La distribution des modalités selon les deux premiers axes d'inertie est présentée sur la Figure 19a. Le premier axe associe les rendements croissants sur les matières oxydables et les capacités nominales des stations d'épuration. Les traitements efficaces sont donc associés aux grandes installations, la relation n'étant pas linéaire. Les filières de traitement se localisent de façon logique sur ce graphe : les boues activées de forte capacité (AEx3 et AEx4) se trouvent proches des traitements très efficaces (valeurs positives de l'axe des abscisses, modalités OM5 et SS5 par exemple), alors que les disques biologiques (BC) et les traitements primaires (Mis) se trouvent à l'autre extrémité de l'axe. Les lagunages aérés (AL) et naturels (NL) sont très proches les uns des autres.

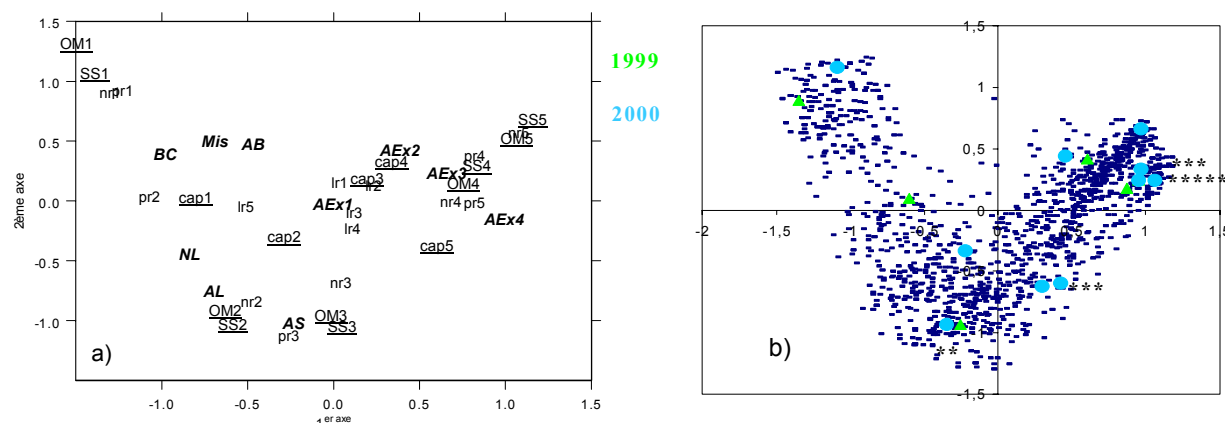


Figure 19. a) Distribution des modalités selon les deux premiers axes d'inertie (19%). b) Distribution des installations dans le même plan. Les points correspondent aux stations échantillonnées, les * mentionnant les répliqués. En vert : les stations échantillonnées en 1999. En bleu : les stations du bassin du Grand Morin échantillonnées en 2000. Figure d'après Tusseau-Vuillemin et Le Réveillé, 2001.

¹⁹ <http://www.pbil.univ-lyon1.fr/ADE-4>

Nous avons fondé notre stratégie d'échantillonnage sur cette description statistique de la base de données, afin de représenter au mieux la diversité des charges et des rendements avec un nombre réduit de prélèvements (Figure 19b). Plusieurs types de traitement ont été explorés (lagunages, naturels ou aérés, bassins combinés, bassins d'aération) ainsi que des capacités très différentes (de quelques dizaines à plusieurs dizaines de milliers d'e.h.). Les conditions de collecte des échantillons sont évidemment beaucoup plus complexes pour les toutes petites structures rurales (Figure 20), ce qui explique qu'elles soient peu documentées, bien que largement représentées sur le bassin.



Figure 20. Exemples de déploiement d'échantillonneurs automatisés et réfrigérés sur un lagunage naturel (Aulnoy) et une boue activée (Bouleurs) traitant respectivement 200 et 1000 e.h..

Sur chacune des stations retenues, au moins un bilan vingt-quatre heures a été réalisé, au moyen de préleveurs automatisés réfrigérés, avec analyse des fractions de carbone dissous, particulaire, biodégradable et réfractaire (selon les protocoles de Servais *et al.* (1995) et Tusseau-Vuillemin *et al.* (2003a)) et autres paramètres classiques comme la DBO_5 , nitrates, nitrites et phosphates.

2 Niveaux de rejet en carbone organique biodégradable²⁰.

La variabilité des concentrations en carbone organique dans l'effluent est présentée sur la Figure 21. De façon générale, l'essentiel de la variabilité provient de la fraction particulaire. Plus précisément, elle est essentiellement due à des dysfonctionnements (ponctuels ou permanents), aux lagunages, aérés ou naturels qui évoluent en fonction des saisons et à une station en forte charge. Les nombreux dysfonctionnements, plus ou moins importants et permanents, qui affectent les stations de traitement (surtout lorsqu'elles sont exploitées en régie et dépendent de petites communes) resteront toujours difficiles à anticiper pour réaliser des bilans. L'établissement de relations empiriques (Tusseau-Vuillemin *et al.* (2001a)) entre les fractions de matière organique biodégradable et les paramètres de l'auto-surveillance dont la consignation régulière est devenue réglementaire par la loi sur l'eau de 1992 permettra à terme d'intégrer la variabilité locale dans les estimations.

²⁰ Tusseau-Vuillemin M.-H., Garnier J. et Servais P., 2001, charges spécifiques domestiques et caractérisation des rejets de station d'épuration, rapport de synthèse PIREN-Seine 1998-2001, 18 pages.

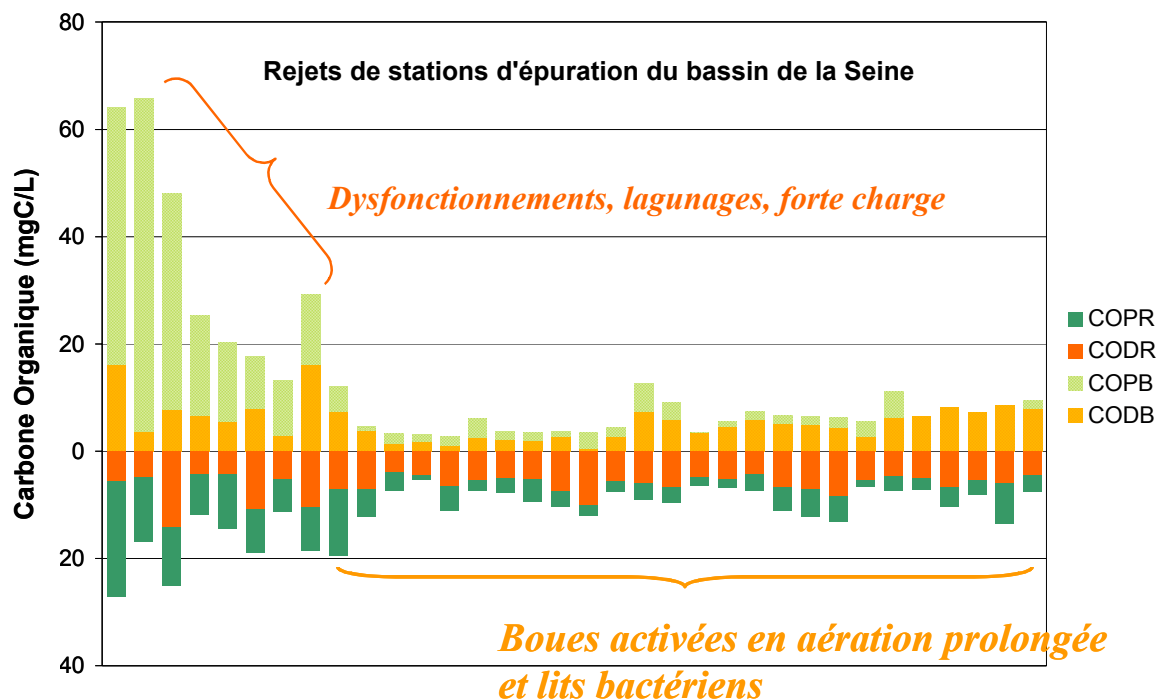


Figure 21. Concentrations en carbone organique réfractaire et biodégradable, particulaire et dissous. Complété d'après Le Réveillé et Tusseau-Vuillemin (2000).

Pour les douze stations d'épuration fonctionnant sur les principe des boues activées en aération prolongée, ou des lits bactériens (qui comptent pour 90% des installations de traitement du bassin de la Seine), les vingt-six prélèvements permettent de calculer des valeurs moyennes (Tableau 3), en dépit de dimensions très variables (200 à 1 000 000 e.h.).

CODB	COPB	CODR	COPR
4,5 mgC/L	1,8 mgC/L	5,0 mgC/L	3,5 mgC/L
$\sigma = 2,3$ mgC/L	$\sigma = 1,5$ mgC/L	$\sigma = 1,4$ mgC/L	$\sigma = 2,4$ mgC/L

Tableau 3. Moyennes et écart-types des concentrations en carbone organique, réfractaire et biodégradable, particulaire et dissous. Vingt-six échantillons prélevés sur douze stations (boues activées en aération prolongée et lits bactériens), de capacités variant de 200 à 1000000 d'e.h..

A partir de ces valeurs moyennes, ainsi que des mesures obtenues sur les autres types de traitement, on peut estimer les flux de matière organique rejetés sur l'ensemble du bassin de la Seine. On utilise pour cela un débit spécifique journalier par e.h., calculé comme le rapport du flux de DBO₅ entrant à la charge spécifique estimée à 54 gDBO₅ par e.h. et par jour. Ce calcul entraîne malheureusement de grosses incertitudes, mais est rendu nécessaire par le fait que seules, les charges en e.h. sont renseignées dans les bases de données classiquement utilisées en épuration. Finalement, on peut comparer les rejets en carbone organique de l'ensemble des stations du bassin de la Seine à ceux de Seine Aval, ré-évalués sur la base des résultats d'auto-surveillance de 2001 (et en diminution).

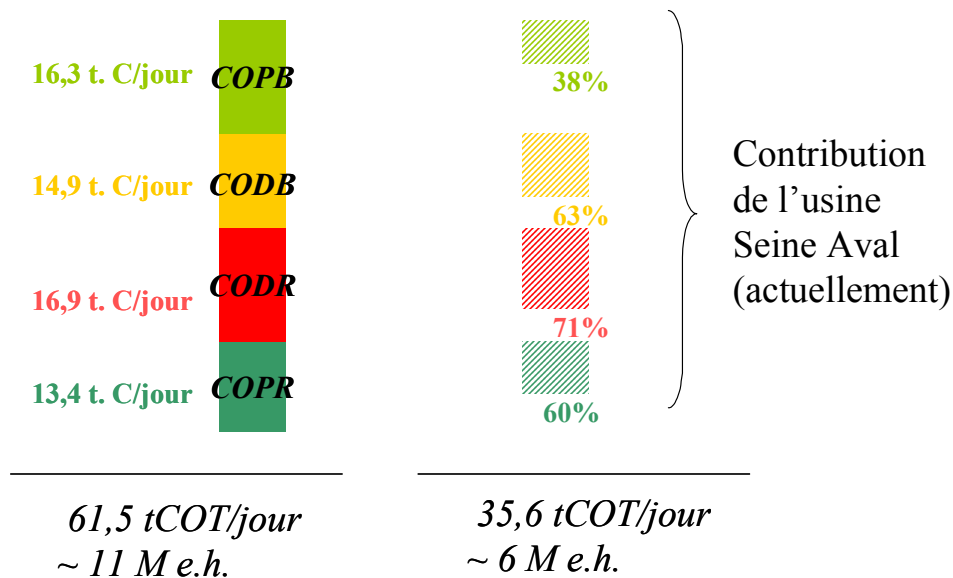


Figure 22. Comparaison de l'estimation des flux journaliers de matière organique issue des rejets domestiques sur l'ensemble du bassin (excepté Seine Aval) et de ceux de Seine Aval, par temps sec. Présenté en janvier 2001 au colloque PIREN Seine.

La contribution parisienne reste donc considérable à l'échelle du bassin, et relativement plus importante pour le carbone organique dissous, biodégradable ou non, ce qui est cohérent avec le traitement en très forte charge qui y est appliqué.

Finalement, on peut tenter un bilan entre les apports domestiques à la Seine à l'échelle de son bassin et les flux exportés par le fleuve à Poses, tels qu'ils sont simulés par le modèle PROSE (Stéphanie Even et Michel Poulin, communication personnelle, 2001²¹). A Poses, la matière organique se décompose en phytoplancton, en bactéries et en déchets organiques, particuliers ou dissous (Figure 23) et résulte à la fois des apports domestiques sur l'ensemble du bassin, des apports par ruissellement (implicitement pris en compte dans les conditions amont), et des productions autochtones, primaire (phytoplancton) et secondaire (bactéries). Les puits sont physiques (sédimentation à long terme) et biologiques (métabolisation bactérienne).

²¹ Tusseau-Vuillemin M.-H., Le Réveillé G., Mouchel J.-M., Dispan J., Delbec M., Poulin M., Even S., Flipo N., Garnier J., Servais P., 2001, « Les Matières Organiques : de l'amont à l'aval du bassin, du rural à l'urbain... », colloque de synthèse du PIREN Seine, janvier 2001.

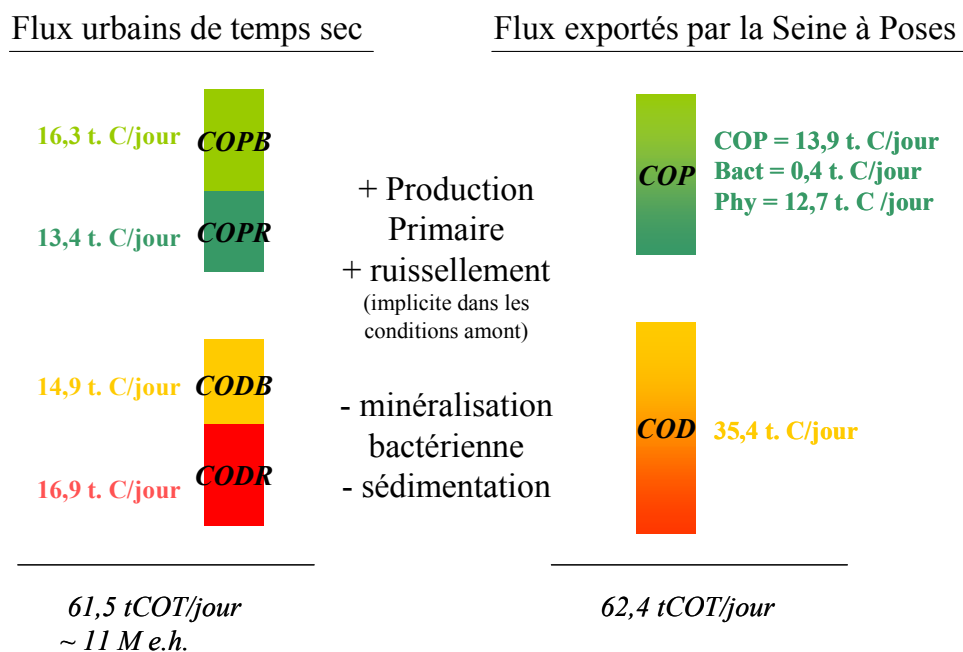


Figure 23. Comparaison des flux urbains traités de temps sec sur l'ensemble du bassin de la Seine (estimés selon ci-dessus) et des flux de matière organique exportés à Poses (simulés par PROSE). Présenté en janvier 2001 au colloque PIREN Seine.

Enfin, bien que, tout au long de son écoulement, la Seine permette une dégradation bactérienne importante des substances organiques biodégradables, et bien qu'une partie des particules sédimente et ne parvienne pas à l'exutoire, les flux à Poses sont à peu près équivalents aux apports domestiques urbains traités cumulés. L'une des explications est certainement la production primaire, qui représente près de 50% du carbone organique particulaire exporté et qui engendre probablement une partie du carbone organique dissous sous forme d'exudats et de déchets de métabolisation. Cette production primaire est stimulée par l'ensemble des rejets urbains de nutriments, dans une mesure qui reste à quantifier. En ce qui concerne les rejets domestiques des rivières amont de petit ordre, Flipo *et al.* (2004) ont montré que le périphyton jouait un rôle important dans la transformation de ces nutriments domestiques, les piégeant temporairement sous forme de biofilm, puis les exportant ponctuellement lors d'épisodes de crue. Tous ces aspects ne sont encore que qualitativement décrits, mais soulignent l'importance potentielle des rejets domestiques de l'amont, cumulés à l'échelle d'un grand bassin versant.

Analyse et optimisation du traitement biologique de la matière organique et de l'azote²².

La constance relative des concentrations en carbone organique observée dans les rejets des stations d'épuration du bassin de la Seine (Tableau 3) montre que le traitement du carbone organique est assez bien maîtrisé par temps sec, et que les flux rejetés sont assez simplement prévisibles, en-dehors d'un dysfonctionnement majeur (perte de boues, panne de l'aération par exemple). Les rejets d'azote sont beaucoup plus variables (Tusseu-Vuillemin *et al.* (2001c)). Le processus de nitrification est en effet sujet à de brusques variations, en particulier du fait des faibles taux de croissance des bactéries nitrifiantes, qui rendent le traitement sensible à la présence de produits toxiques, aux variations de température (par exemple, Head

²² F. Lagarde. 2003. Modélisation et optimisation du traitement de l'azote et du carbone par boues activées avec aération séquencé en temps de pluie à différentes températures. doctorat, Paris XII val de Marne.

et Oleszkiewicz (2004)) et de charge organique (Stricker *et al.* (2003)). L'ajustement en temps réel des paramètres du traitement (durée et puissance d'aération, extraction des boues) permet théoriquement de contrôler ces dérapages potentiels. De plus en plus, l'avis d'expert s'appuie pour cela sur des outils de simulation numérique du traitement biologique. Ces modèles décrivent, au moyen d'équations de bilan de masse, l'évolution couplée des différentes biomasses bactériennes impliquées dans le traitement, ainsi que de la matière organique, des formes de l'azote et du phosphore (cf. la récente synthèse de Gernaey *et al.* (2004)). Au cours de sa thèse de doctorat, Fabienne Lagarde a montré comment l'un de ces modèles (ASM1, Henze *et al.* (1987)) pouvait être validé sur de longues périodes et sous des forçages différents (Lagarde (2003)). La modélisation permet dans ce cas d'optimiser les paramètres du traitement pour faire face aux conditions défavorables mentionnées plus haut.

1 Présentation rapide des modèles de simulation du traitement des eaux usées.

Gernaey *et al.* (2004) ont récemment synthétisé l'état de l'art sur la modélisation des processus biologiques des boues activées. L'association internationale de l'Eau (IWA²³) a joué un rôle fédérateur et centralisateur dans le développement de ces modèles, ce qui a permis d'obtenir un consensus assez rapide de la communauté scientifique autour des modèles de boues activées ASM1, puis ASM2 et ASM3... La structure et l'objet de ces modèles déterministes sont très similaires à ceux des modèles biogéochimiques déjà mentionnés, qu'ils soient appliqués à l'océan ou aux rivières (Even *et al.* (2004)) et les modèles utilisés pour exploiter les expériences respirométriques n'en sont qu'une version simplifiée. Les principales variables sont, pour les micro-organismes : les bactéries autotrophes et hétérotrophes, pour la matière organique : différentes classes de matière plus ou moins biodégradable, pour les nutriments : azote organique, NH₄, NO₂, NO₃, formes du phosphore pour l'ASM2 et l'oxygène dissous.

Le traitement de l'azote s'effectue généralement au moyen de l'alternance de phases oxiques et anoxiques (Figure 24) dans le bassin d'aération, pendant lesquelles l'azote réduit est successivement oxydé en nitrate par les bactéries autotrophes, puis transformé en diazote gazeux par les bactéries hétérotrophes. Les bactéries hétérotrophes assurent la dégradation de la matière organique pendant ces deux phases, en utilisant soit l'oxygène dissous, soit les nitrates comme oxydant. En France, il est courant d'adjoindre un bassin spécifiquement anoxique en amont du bassin d'aération, afin d'assurer une meilleure dénitrification. Le traitement biologique du phosphore peut encore rendre nécessaire un bassin anaérobique, dans lequel ont lieu les processus de fermentation.

Différents logiciels commercialisés permettent de coupler sans effort les flux hydrauliques entre ces différents bassins aux flux de transformation biologique.

1.1 Identification des paramètres. Sensibilité des modèles.

On comprend, au vu de la matrice du modèle ASM1 (Tableau 6 en

²³ www.iwahq.org.uk

Annexe), que le système d'équations différentielles qui le décrit est fortement couplé, et de façon non-linéaire. Cette complexité mathématique se traduit par le fait que, pris dans leur ensemble, les paramètres de ces modèles ne sont pas théoriquement identifiables (Gernaey *et al.* (2004)). Les valeurs par défaut proposées initialement par le groupe de modélisation de l'IWA et régulièrement revisitées, revêtent donc une importance particulière.

1.2 L'extraction de boues...

Compte-tenu de cette complexité, il est surprenant, au premier abord, de constater l'efficacité du modèle ASM1 à simuler une station d'épuration en boues activées, sans calibrage particulier des paramètres, simplement avec un forçage (flux d'entrée et dimensionnement des ouvrages) relativement soigné (Lagarde (2003)). Une rapide analyse montre que le « processus » clef, qui contrôle l'essentiel des simulations, est l'extraction de boues activées. De fait, il s'agit là d'une mortalité déguisée (paramètre auquel les modèles écologiques sont bien souvent très sensibles), qui est d'ailleurs utilisée par le gestionnaire pour maintenir son système dans un état pseudo-stationnaire, sans débordement de boues ni carence, deux cas qui correspondraient à des divergences du modèle numérique ! Cette pseudo-mortalité est, du point de vue numérique, extrêmement avantageuse, car elle permet de strictement sortir de la matière du système, sans aucune rétro-action. Ce forçage exogène du modèle est plutôt mal renseigné dans la pratique. On considère donc généralement que le forçage par extraction de boues est satisfaisant lorsqu'il reste du même ordre de grandeur que les données dont on dispose et qu'il assure l'état stationnaire du traitement, tout au moins sur les flux à grande inertie comme les matières oxydables, car les systèmes modélisés sont effectivement stables de ce point de vue.

La quantité de boues soustraite étant établie, leur qualité (en termes de ratio DCO/N) est définie par deux paramètres stoechiométriques du modèle (i_{xb} pour la biomasse active, i_{xp} pour les produits de la biomasse), auxquels la simulation des formes de l'azote est bien sûr très sensible. De même que Stricker *et al.* (2003), Lagarde *et al.* (soumis) ont été amenés à diminuer ces paramètres, de 0.086 gN/gDCO et 0.06 gN/gDCO à 0.05 gN/gDCO puis à valider cette calibration (Lagarde (2003)). Un exemple de la sensibilité des simulations à ces paramètres est montré en Figure 24.

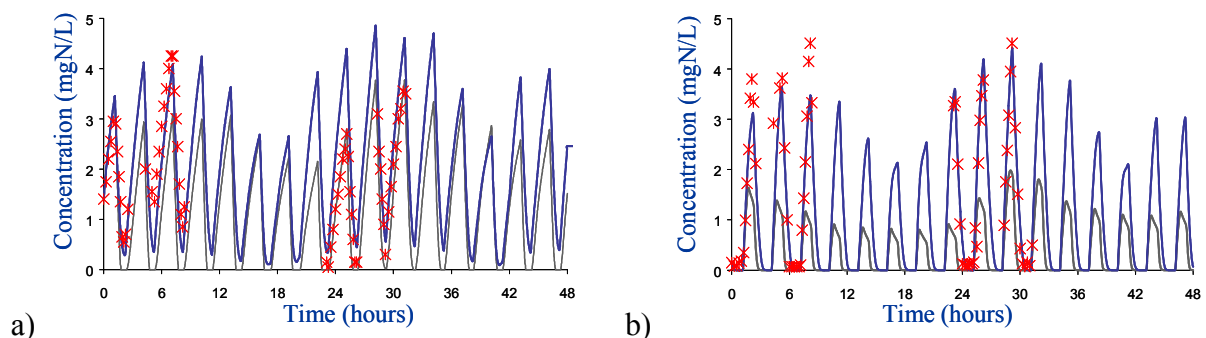


Figure 24. Cycles de concentrations en NH₄ (a) et en NO₃ (b), dans le bassin d'aération de la station d'épuration de la ville de Meaux. Observations (croix), simulations avec les paramètres par défaut de l'ASM1 (trait gris) et les paramètres calibrés (trait bleu). D'après Lagarde (2003).

Ces paramètres sont en fait très difficiles à mesurer expérimentalement, dans la mesure où il faudrait isoler les cellules bactériennes proprement dites du mélange complexe que constitue une boue activée. La valeur par défaut proposée par Henze *et al.* (1987) avait été établie sur la base de la composition théorique du matériel cellulaire. La validation à moyen terme obtenue par Lagarde *et al.* (soumis) crédibilise autant une valeur plus faible des paramètres i_{xb} et i_{xp}

qui pourrait dépendre fortement des conditions opératoires, comme par exemple l'âge de boues.

1.3 Couplage des processus.

L'une des spécificités de certains modèles de traitement des eaux usées par boues activées tient au couplage des processus d'élimination des nutriments et des matières oxydables, réalisés par deux communautés bactériennes différentes. Cet éventuel couplage intervient d'une part pour la dénitrification, qui s'accompagne de l'oxydation de DCO biodégradable, et d'autre part lorsque les produits de la mortalité bactérienne (autotrophe comme hétérotrophe) sont considérés comme biodégradables et réintègrent donc le cycle de la matière organique. Ce concept est appelé « mort-régénération » et correspond à l'observation de la respiration endogène, que l'on obtient lorsque l'on laisse une boue activée vieillir en conditions oxiques, sans substrat. La respiration à peu près constante que l'on observe alors s'explique par le fait que les bactéries se « cannibalisent » en oxydant les produits de lyse cellulaire de leur congénères. Ce concept est également utilisé dans les modèles biogéochimiques du milieu naturel, mais son importance est bien moindre, du fait des ordres de grandeur de la biomasse. La qualité des produits microbiens ainsi formés étant plutôt mal connue (cf. du point de vue théorique Lapidou et Rittman (2002), ou, du point de vue expérimental, Dignac *et al.* (2000a)), le concept mort-régénération constituait une sorte de talon d'Achille du modèle ASM1. Dans sa dernière version (ASM3, Gujer *et al.* (1999)), il a été remplacé par celui, plus simple mais certainement moins mécanistique, de respiration endogène. A la mortalité bactérienne est associée de façon stœchiométrique une consommation d'oxygène, sans que cela engendre au préalable un recyclage de matière organique biodégradable. Pour Gernaey *et al.* (2004), cela permet une meilleure identifiabilité des paramètres, en séparant mieux les processus (Figure 25).

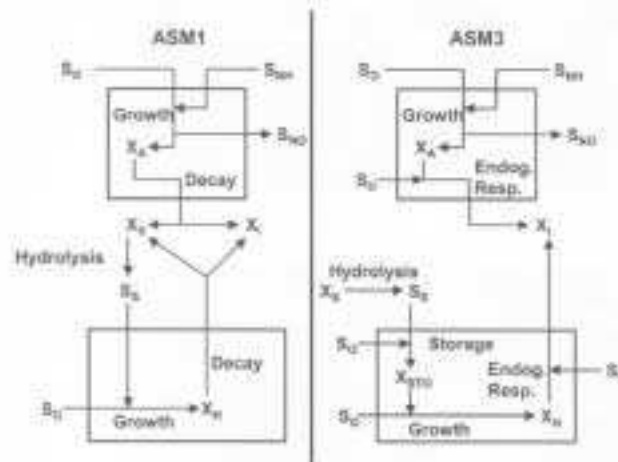
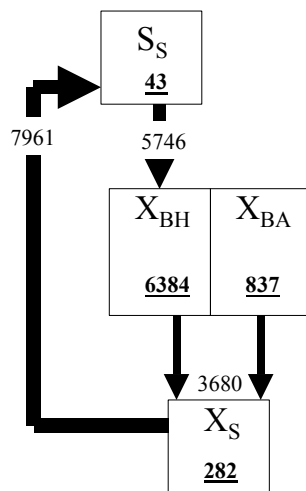


Figure 25. Flux de matière impliquant les biomasses autotrophe et hétérotrophe, selon les schémas « mort-régénération » de l'ASM1 et « respiration endogène » de l'ASM3. D'après Gernaey *et al.* (2004). Liste des symboles en

Annexe.



Fabienne Lagarde (2003) a quantifié ces flux de régénération, qui sont très importants (Figure 26) et s'élèvent dans ce cas de figure à plus de 60% de l'apport direct de matière organique hydrolysable (X_S) par les eaux usées. La contribution des bactéries autotrophes au flux de matière organique régénérée est de l'ordre de quelques %, mais augmente en proportion lorsque la température diminue, du fait du comportement différent des deux populations bactériennes.

Figure 26. Flux internes de DCO (en kg par jour) dans le bassin d'aération (station d'épuration de la ville de Meaux, simulation des conditions opératoires réelles). Oxydation du substrat (S_S) par les bactéries hétérotrophes (X_{BH}) et autotrophes (X_{BA}), mortalités bactériennes et recyclage des produits microbiens en matière organique hydrolysable (X_S). Les stocks (en kg) sont soulignés. D'après Lagarde *et al.* (soumis).

La simplification du modèle ASM3, réelle, ne correspond pas forcément à la réalité mais ne pénalise probablement pas l'utilisateur qui souhaite obtenir une image grossière du fonctionnement du traitement.

2 Analyse du traitement sur le cas de la station d'épuration de la ville de Meaux²⁴.

Le modèle ASM1 a été utilisé, dans les conditions mentionnées ci-dessus, pour analyser l'efficacité relative des différentes zones de traitement et les conditions opératoires habituelles d'une station en boues activées et faible charge, représentée par le site de la ville de Meaux (Figure 27).



On identifie facilement les deux files parallèles, avec les deux bassins biologiques qui regroupent, en anneaux concentriques, les zones anaérobie, anoxie et aérobie séquencée, ainsi que les deux décanteurs. La station traite l'équivalent de 130 000 habitants et rejette dans la Marne..

Figure 27. Vue aérienne de la station d'épuration en boues activées, faible charge, de la ville de Meaux.

La simulation montre que les eaux usées apportent une faible quantité d'oxygène dans la zone anaérobie, de même que la recirculation des liqueurs mixtes depuis le bassin aéré vers la zone anoxique. Ces bassins ne sont donc jamais strictement anaérobique ou anoxique. D'autre part, la simulation montre, dans une telle configuration (boues activées en très faible charge, âge de boues de trente jours), l'inutilité de la zone d'anoxie.

L'oxydation de la DCO est en effet réalisée à 3% dans le bassin anaérobie, à 7% dans le bassin anoxique et à 90% dans le bassin en aérobie séquencée, du fait de la présence constante

²⁴ F. Lagarde, M.-H. Tusseau-Vuillemin, P. Lessard et A. Héduit. (soumis) Assessing chemical oxygen demand and nitrogen mass transfers in a multi-stage activated sludge plant. Environmental Modelling and Software.

d'accepteurs d'électrons, oxygène ou nitrates (Tableau 4). Quant à l'azote, il est éliminé à 72% pendant les phases d'arrêt de l'oxygénation dans le bassin d'aération. L'analyse montre que, dans la zone anoxique, la dénitrification est non seulement inhibée par la présence d'oxygène « parasite », mais également limitée par la très faible concentration de nitrates, qui sont effectivement transformés en diazote dans le bassin d'aération. En réalisant la même simulation avec des séquences d'aération plus longues (78% du temps), on redonne son importance à la zone anoxique, sans pour autant augmenter le rendement d'élimination des nitrates, ni de la DCO (Lagarde *et al.* (soumis)).

	Bassin anaérobie	Bassin anoxique	Bassin en aérobie séquencée	Total
DCO éliminée en aérobie (kgCOD/j)	0	46	2546	2592
DCO éliminée en anoxie (kgCOD/j)	122	195	829	1146
Total de DCO éliminée (kgCOD/j)	122	241	3375	3738
Azote éliminé (denitrification) (kgN/j)	43	68	290	401

Tableau 4. Bilan de l'élimination de la DCO et de l'azote dans les différentes zones de la station d'épuration, en conditions normales de fonctionnement (aération séquencée 63% du temps).

3 Démarche pour l'optimisation du traitement²⁵.

L'utilisation du modèle pour optimiser les traitements nécessite une validation approfondie des paramètres de simulation, en particulier dans les conditions de temps froid et de surcharge pour lesquelles on observe généralement de moins bons rendements d'épuration. Lagarde *et al.* (en prép.) ont effectué ce travail sur la station d'épuration de la ville de Meaux. Outre le calage mentionné plus haut (Lagarde *et al.* (soumis)), une campagne réalisée en hiver (température de 12°C), avec un âge de boues de trente et un jours a permis d'aborder la dépendance des paramètres avec la température. A 12°C, un calage satisfaisant a été obtenu en appliquant à six paramètres du modèle des facteurs d'Arrhénius (équation 1) proches de leurs valeurs par défaut (Henze *et al.* (1987)) et à un paramètre (celui qui contrôle la dépendance en température du taux de croissance des bactéries autotrophes : $\phi(\mu_a)$) une valeur nettement plus élevée (1,23 plutôt que 1,10 par défaut). Les données montrent en effet qu'à 12°C, le taux de croissance des bactéries autotrophes est très faible (0,15 j⁻¹ pour 0,35 j⁻¹ obtenu en appliquant la formule par défaut de dépendance à la température). Ce point est important et éventuellement polémique, dans la mesure où c'est justement le traitement de l'azote qui peut être sensible aux basses températures.

²⁵ F. Lagarde, M.-H. Tusseau-Vuillemin, P. Lessard et A. Héduit. (en prép.) Full scale calibration and long term evaluation of ASM1. Environmental Modelling and Software.

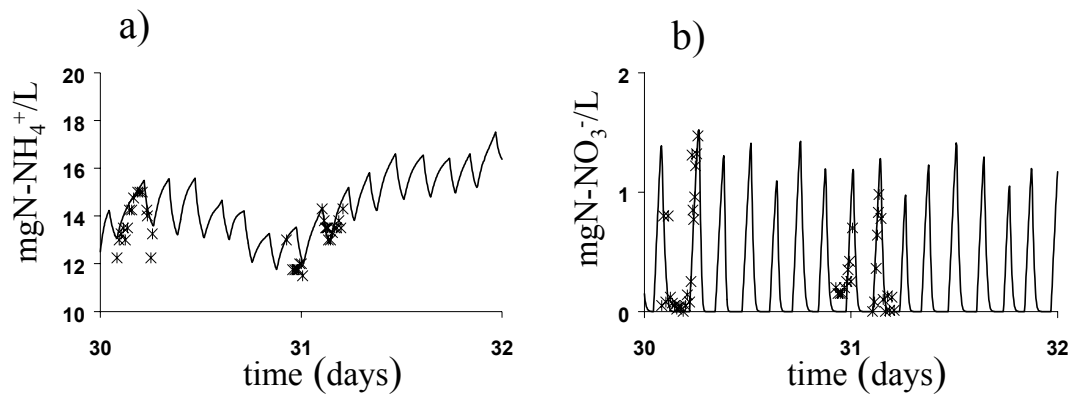


Figure 28. Variations de NH_4 et NO_3 (mgN/L) dans le bassin d'aération de la station de Meaux, par une température de 12°C . Croix : mesures ; lignes : simulation. D'après Lagarde *et al.* (en prép.).

Connaître les valeurs des paramètres à 20°C et 12°C permet d'interpoler entre ces deux températures, au moyen d'une fonction de type Arrhénius.

$$par_i(T_1) = par_i(T_2) \cdot \theta(par_i)^{(T_1 - T_2)}, \text{ Équation 1}$$

où par_i est un paramètre variant en fonction de la température (T_i) et de $\phi(par_i)$. Le jeu de paramètres ainsi calculés à 14°C a permis de simuler correctement le fonctionnement de l'installation au cours d'une campagne de validation ultérieure (température de 14°C et âge de boues de quarante-cinq jours) comportant successivement un épisode de temps de pluie puis une surcharge volontaire appliquée en dérivant la totalité des eaux usées sur la file étudiée.

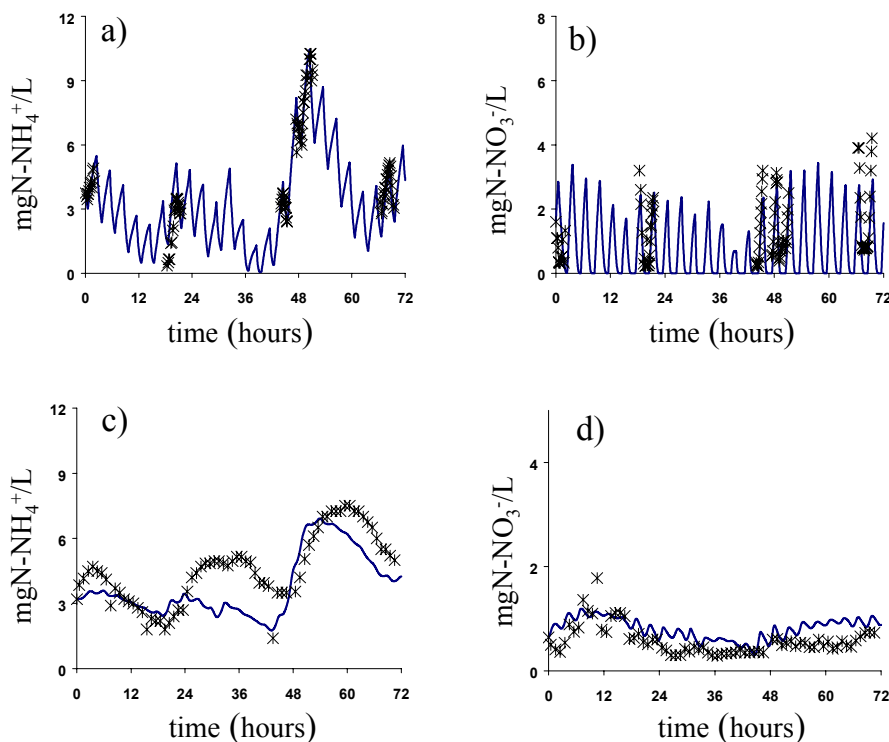


Figure 29. Validation des paramètres et de leur dépendance à la température. Variations de NH_4 et NO_3 dans le bassin d'aération de la station de Meaux (a et b), et dans l'effluent traité (c et d), par une température de 14°C , lors d'un épisode pluvieux (heures 24 à 36) et d'une surcharge volontaire (heures 36 à 60). D'après Lagarde (2003).

Le calage du modèle s'est donc avéré valide sur longue durée dans la gamme de températures et d'âges de boues considérée, ce qui autorise son utilisation à des fins prédictives

d'optimisation de traitement. Lagarde *et al.* (en prép.) montrent ainsi la difficulté de traiter l'azote par temps froid, même avec une installation comme celle de Meaux, fonctionnant en âge de boues élevé (trente jours). A 12°C, par temps sec et en aérant de façon continue, il serait en effet impossible de maintenir la concentration d'azote ammoniacal dans l'effluent à moins de 10 mg/L.

Conclusions et perspectives.

La dynamique couplée des micro-organismes et des fractions de matière organique est donc abordée de façon assez similaire, que l'on travaille sur le milieu naturel, sur les eaux usées ou sur le traitement biologique. Cependant, les modèles développés pour un milieu (et les paramètres associés) ne conviennent généralement pas aux autres, car les variations d'échelle et de concentrations sont telles que des processus quasi-négligeables (et donc mal identifiés) dans un cas deviennent prépondérant dans l'autre. Par exemple, le modèle de traitement biologique ASM1, qui se montre très robuste pour simuler des stations d'épuration, doit pratiquement toujours être adapté lorsqu'il s'agit d'exploiter des mesures respirométriques, surtout si elles sont réalisées sans ajout de biomasse.

Les processus microbiens ne sont donc probablement pas représentés de façon exhaustive ni totalement généralisable dans ce modèle, mais cela n'est apparemment pas nécessaire pour les applications classiques en traitement des eaux. Un travail en profondeur sur la validation à l'échelle de plusieurs mois et dans des conditions de forçages très variables montre en effet la cohérence des simulations.

L'un des points les plus mal connus reste la nature des produits de recyclage de la matière organique, tout spécialement aux niveaux naturels. La biodégradabilité (qualitative et quantitative) des eaux urbaines peut en effet être appréhendée au moyen de techniques respirométriques, mais cela est plus délicat pour les sous-produits de l'écosystème (débris végétaux, animaux, produits de la lyse bactérienne). Dans le bassin d'aération d'une station d'épuration, ce recyclage continu de biomasse est responsable de l'inertie du système. Dans le milieu naturel, il se traduit principalement par le décalage spatio-temporel des sources et puits d'oxygène dissous, ce qui peut être important, en particulier en cas d'eutrophisation. Le raffinement de la formulation de ce recyclage naturel n'est objectivement pas nécessaire à la simulation correcte des éventuels déficits en oxygène dissous des rivières, lorsque celles-ci sont affectées par des rejets urbains importants. Cependant, si l'on ne considère plus la MO uniquement comme un puits d'oxygène, mais aussi comme un vecteur de micro-polluants, une simulation précise de sa dynamique aux niveaux naturels pourrait devenir intéressante.

Annexes du chapitre 2.

Glossaire.

DCO	Demande Chimique en Oxygène ($\text{gO}_2.\text{m}^{-3}$)
MES	Matières en suspension ($\text{g}.\text{m}^{-3}$)
MVS	Matières volatiles en suspension ($\text{g}.\text{m}^{-3}$)
DBO ₅	Demande biologique en oxygène ($\text{mg O}_2\text{L}^{-1}$)
OUR	Oxygen Uptake Rate, respiration ($\text{mg O}_2 \text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$)
S _S	Substrat rapidement biodégradable ($\text{g DCO}.\text{m}^{-3}$)
X _{BH}	Biomasse hétérotrophe ($\text{g DCO}.\text{m}^{-3}$)
S _{NH}	Fraction d'azote NH ₄ ⁺ ($\text{g N}.\text{m}^{-3}$)
X _{BA}	Biomasse autotrophe ($\text{g DCO}.\text{m}^{-3}$)
X _P	Produits de la mortalité bactérienne ($\text{g DCO}.\text{m}^{-3}$)
X _S	Substrat lentement biodégradable ($\text{g DCO}.\text{m}^{-3}$)
X _R	Substrat lentement hydrolysable ($\text{g DCO}.\text{m}^{-3}$)
S _{NO}	Nitrates ($\text{g N}.\text{m}^{-3}$)
X _{ND}	Azote organique particulaire ($\text{g N}.\text{m}^{-3}$)
S _{ND}	Azote organique soluble ($\text{g N}.\text{m}^{-3}$)
S _I	DCO soluble inerte ($\text{g DCO}.\text{m}^{-3}$)
X _I	DCO particulaire inerte ($\text{g DCO}.\text{m}^{-3}$)
i _{XB}	Masse d'azote par masse de DCO dans la biomasse ($\text{g N} (\text{g DCO})^{-1}$)
i _{XP}	Masse d'azote par masse de DCO dans XP ($\text{g N} (\text{g DCO})^{-1}$)
Y _A	Rendement cellulaire des bactéries autotrophes ($\text{g DCO formé} (\text{g N oxydé})^{-1}$)
Y _H	Rendement cellulaire des bactéries hétérotrophes ($\text{g DCO formé} (\text{g DCO oxydé})^{-1}$)
μ _A	Taux de croissance des bactéries autotrophes (jour^{-1})
μ _H	Taux de croissance des bactéries hétérotrophes (jour^{-1})
b _A	Taux de mortalité des bactéries autotrophes (jour^{-1})
b _H	Taux de mortalité des bactéries hétérotrophes (jour^{-1})
kLa	Coefficient de transfert d'oxygène (jour^{-1})
C _m	Charge massique ($\text{kg DBO}(\text{kg VSS}.\text{jour})^{-1}$)
θ	Coefficient de changement de température dans l'équation d'Arrhénius (-)

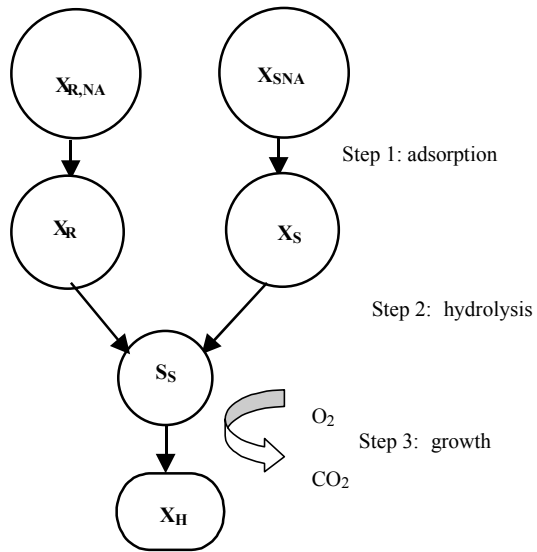


Figure 30. Représentation schématique des différentes fractions et étapes de la biodégradation des eaux usées (Lagarde *et al.* (in press)).

Les auteurs des différents modèles de l'IWA ont, dans un souci de formalisation, élaboré une technique de présentation particulière, sous forme de matrice (dont deux exemples sont donnés ici). Ces matrices permettent de reconstituer l'ensemble du modèle (hors la partie hydraulique), à partir d'un tableau extrêmement synthétique qui a l'avantage de mettre en évidence les relations de bilan de masse sur lesquelles sont fondées les équations.

Variable →	<i>I</i>	1 S _I	2 S _S	3 X _I	4 X _S	5 X _R	6 X _{B,H}	7 X _{S,NA}	8 X _{R,NA}	9 S _O	Reaction rate ρ_j [ML ⁻³ T ⁻¹]
<i>j</i>	Process ↓										
1	Aerobic growth of heterotrophic biomass		$-\frac{1}{Y_H}$				1			$-\frac{1-Y_H}{Y_H}$	$\mu_H \left(\frac{S_S}{K_S + S_S} \right) X_{B,H} - \mu_H \left(\frac{S_S}{K_S + S_S} \right)$
2	Adsorption of readily hydrolysable COD					1			-1		$K_a X_{R,NA} X_{B,H} \left(f_{ma} - \frac{X_R + X_S}{X_{B,H}} \right)$
3	Adsorption of slowly hydrolysable COD				1			-1			$K_a X_{S,NA} X_{B,H} \left(f_{ma} - \frac{X_R + X_S}{X_{B,H}} \right)$
4	Hydrolyse of readily hydrolysable COD		1			-1					$k_{H'} X_R$
5	Hydrolyse of slowly hydrolysable COD		1		-1						$k'_{H'} X_S$
6	Decay of heterotrophic biomass			f_{XI}			-1			$-(1-f_{XI})$	$b_H X_{B,H}$
Stoichiometric Parameters		<p>Heterotrophic biomass yield : Y_H Fraction of biomass leading to inert particulate products: f_{XI}</p>									Kinetic parameters
	Soluble inert organic matter [M(COD)L ⁻³]	Readily biodegradable COD [M(COD)L ⁻³]	Particulate inert organic matter [M(COD)L ⁻³]	Slowly hydrolysable COD [M(COD)L ⁻³]	Readily hydrolysable COD [M(COD)L ⁻³]	Active heterotrophic biomass [M(COD)L ⁻³]	Slowly hydrolysable COD Before adsorption [M(COD)L ⁻³]	Readily hydrolysable COD Before adsorption [M(COD)L ⁻³]	Oxygen (negative COD) [M(-COD)L ⁻³]	<p>Growth and decay of heterotrophic biomass : μ_H, K_S, b_H Hydrolysis : $k_{H'}$, $k'_{H'}$ Adsorption : k_a, f_{ma}</p>	

Tableau 5. Matrice synthétique du modèle de biodégradation à trois substrats utilisé par Lagarde *et al.* (in press).

aiable →	<i>i</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Vitesse de réaction ρ_j [ML ⁻³ T ⁻¹]	
<i>j</i>	Processus ↓	S _I	S _S	X _I	X _S	X _{B,H}	X _{B,A}	X _P	S _O	S _{NO}	S _{NH}	S _{ND}	X _{ND}	S _{ALK}		
1	Croissance aérobie des hétérotrophes		$-\frac{1}{Y_H}$			1			$-\frac{1-Y_H}{Y_H}$					$-\frac{i_{XB}}{14}$	$\mu_H \left(\frac{SS}{K_S + SS} \right) \left(\frac{SO}{K_{O,H} + SO} \right) X_{B,H}$	
2	Croissance anoxique des hétérotrophes		$-\frac{1}{Y_H}$			1			$-\frac{1-Y_H}{2,86Y_H}$					$\frac{1-Y_H}{14 * 2,86Y_H} - i_{XB}/14$	$\mu_H \left(\frac{SS}{K_S + SS} \right) \left(\frac{K_{O,H}}{K_{O,H} + SO} \right) \times \left(\frac{SNO}{K_{NO} + SNO} \right) \eta_g X_{B,H}$	
3	Croissance aérobie des autotrophes						1		$-\frac{4,57 - Y_A}{Y_A}$	$\frac{1}{Y_A}$				$-\frac{i_{XB}}{14} - \frac{1}{7Y_A}$	$\mu_A \left(\frac{SNH}{K_{NH} + SNH} \right) \left(\frac{SO}{K_{O,A} + SO} \right) X_{B,A}$	
4	Mortalité des hétérotrophes				1-f _P	-1		f _P							$i_{XB} - f_P i_{XP}$	$b_H X_{B,H}$
5	Mortalité des autotrophes				1-f _P		-1	f _P							$i_{XB} - f_P i_{XP}$	$b_A X_{B,A}$
6	Ammonification de l'azote organique soluble										1	-1		$\frac{1}{14}$	$k_a S_{ND} X_{B,H}$	
7	Hydrolyse de la DCO particulaire		1		-1										$k_h \frac{X_S / X_{B,H}}{K_X + (X_S / X_{B,H})} \left[\left(\frac{SO}{K_{O,H} + SO} \right) + \eta_b \left(\frac{K_{NO}}{K_{O,H} + SO} \right) \left(\frac{SNO}{K_{NO} + SNO} \right) \right] X_{B,H}$	
8	Hydrolyse de l'azote organique particulaire											1	-1		$\rho_7 (X_{ND} / X_S)$	
Rendements de conversion observés [ML ⁻³ T ⁻¹]		$r_i = \sum_j v_{ij} \rho_j$														
Paramètres stoechiométriques : Taux de croissance hétérotrophes : Y _H Taux de croissance autotrophes : Y _A Fraction de la biomasse créant des produits particuliers : f _P Masse de N / masse de DCO dans la biomasse : i _{XB} Masse de N / masse de DCO dans les produits de la biomasse : i _{XP}		Matière organique soluble inerte [M(DCO)L ⁻³]	DCO rapidement biodégradable [M(DCO)L ⁻³]	Matière organique particulaire inerte [M(DCO)L ⁻³]	DCO lentement biodégradable [M(DCO)L ⁻³]	Biomasse active hétérotrophe [M(DCO)L ⁻³]	Biomasse active autotrophe [M(DCO)L ⁻³]	Produits particuliers issus de la mortalité des bactéries [M(DCO)L ⁻³]	Oxygène (DCO négative) [M(-DCO)L ⁻³]	Nitrates et nitrites [M(N)L ⁻³]	NH ₄ ⁺ + NH ₃ [M(N)L ⁻³]	Azote organique soluble biodégradable [M(N)L ⁻³]	Azote organique particulaire biodégradable [M(N)L ⁻³]	Alcalinité – unités molaires	Paramètres cinétiques : Croissance et mortalité des hétérotrophes : μ _H , K _S , K _{O,H} , K _{NO} , b _H Croissance et mortalité des autotrophes : μ _A , K _{O,A} , K _{NH} , b _A Facteur de correction pour la croissance anoxique des hétérotrophes : η _g Ammonification : k _a Hydrolyse : k _h , K _X Facteur de correction pour l'hydrolyse en anoxie : η _b	

Tableau 6. Matrice synthétique permettant de reconstituer les équations du modèle ASM1(Henze et al., 1987).

Chapitre 3. Biodisponibilité des micro-polluants en milieu aquatique.

Contexte.

Comme on l'a vu plus haut, l'élimination de la matière organique et de l'azote a constitué l'enjeu principal de l'assainissement jusqu'aux années 80. Les impacts majeurs de ces pollutions sont progressivement éliminés (Tusseau-Vuillemin (1998) ; Boët *et al.* (1999) ; (Meybeck (2002)) alors que la chimie moderne a provoqué depuis les années 50 plusieurs catastrophes écologiques et sanitaires majeures (le mercure à Minamata, les dioxines à Seveso, dérivés du cyanure à Bhopal...). La progression des moyens analytiques permettant désormais de détecter la plupart des contaminants à l'état de trace dans l'environnement, l'impact des molécules xénobiotiques sur la santé humaine et sur les écosystèmes est devenu un enjeu scientifique majeur (Lagadic et Ahlf (2005)), relayé par les responsables politiques (Plan National Environnement-SantéPlan National Santé Environnement (2004)).

L'ensemble des micro-polluants, molécules présentes à l'état de trace dans le milieu aquatique (concentrations de l'ordre du $\mu\text{g/L}$ ou du ng/L) est très hétérogène et regroupe les métaux trace, et certaines molécules organiques. Les métaux, dont l'origine est géologique, sont pour certains essentiels aux organismes (par exemple, le cuivre, le zinc, le cadmium), à des concentrations faibles. Du plomb, du mercure et d'autres métaux, on ne connaît en revanche que des effets toxiques. C'est probablement également le cas de la très grande majorité des molécules organiques synthétiques apparues plus récemment. Cette famille de composés est immense, comprenant à la fois les phytosanitaires, les polymères, les isolants, les médicaments... En moyenne sur les trente dernières années, on estime qu'une nouvelle molécule est apparue toutes les trente secondes ! Ces deux types de pollution (métaux et molécules organiques) n'ont clairement pas la même histoire et ne sont donc pas documentés de façon équivalente. Même sans remonter à l'âge du fer, l'archéologie nous montre que certains métaux sont utilisés de toute antiquité, pour leurs propriétés mécaniques (outils, ustensiles) comme pour leur éclat (bijoux, ornements). Guillaume (2003) montre l'essor pris par l'artisanat et l'industrie de nombreux métaux (cuivre, argent, fer, mercure, plomb) au dix-huitième siècle en Europe. Si les métaux ont progressivement été remplacés pour certains usages, notamment décoratifs (pigments, céruse...), leur emploi industriel reste incontournable et le tonnage de plomb utilisé en France a crû de façon continue au dix-neuvième puis au vingtième siècle (Lestel (2004)). Au contraire, la création et la diffusion des molécules organiques doit beaucoup à la chimie moderne et prend son véritable essor avec le développement de la chimie du pétrole, soit au milieu du vingtième siècle.

L'impact environnemental des micro-polluants s'est vite avéré plus délicat à comprendre que pour la matière organique biodégradable : les eaux résiduaires urbaines ne sont pas toujours toxiques à hauteur des concentrations de métaux que l'on peut y mesurer (Garric *et al.* (1996) ; Marsalek et Rochford (1999)); au contraire, dans la baie de Minamata, les concentrations de mercure n'étaient pas très élevées... Néanmoins, l'impact sur la santé humaine est dramatique.

C'est ainsi que progressivement, le lien entre la présence de ces xénobiotiques et la réponse biologique est devenu le fondement de la réglementation actuelle de la police de l'eau. Avec la directive cadre européenne de 2000, c'est en effet à l'aune de « l'état écologique » des cours d'eau qu'est évalué le niveau de contaminants admissible. Cette évolution amène *de facto* à prendre en compte la biodisponibilité²⁶ des micro-polluants, bien que cette notion ne soit pas encore bien comprise, comme cela est souligné dans la récente monographie du USA

²⁶ 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 » (G. M. Rand, P. G. Wells et L. S. Mc Carthy. 1995. Introduction to Aquatic Toxicology. Effects, environmental fate and risk assesment., London, pp. 3-67: Taylor and Francis.).

National Research Council (*Bioavailability of contaminants in soil and sediments. Processes, tools and application.* (2003)). On y recommande par exemple d'utiliser le terme, plus général, de processus de biodisponibilité pour discuter des voies d'internalisation des métaux...

Dans ce qui suit, on va traiter de la façon dont la matière organique (dissoute pour l'essentiel) module la biodisponibilité des métaux et des HAP. Différentes méthodes d'évaluation biologique et chimique de ces phénomènes seront présentées. Un premier volet est constitué par les métaux trace. Ma contribution porte sur la technique du gradient de diffusion en couche mince, décrite au moyen d'un modèle numérique, puis comparée à des mesures biologiques. Un autre volet est constitué par l'évaluation de la biodisponibilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en présence de matière organique biodégradable. Ces travaux se déroulent dans le cadre de projets financés par le Cemagref²⁷, l'INSUE²⁸, le MEDD²⁹ et le PIREN Seine et sont publiés dans :

- Elbaz-Poulichet, F., Seidel J.-L., Casiot C., **Tusseau-Vuillemin M.-H.**, Processes controlling the short-term variability of dissolved trace element concentrations in the Marne and Seine rivers near Paris, *Science of the Total Environment*, en révision.
- Buzier, R., **Tusseau-Vuillemin M.-H.**, Mouchel J.-M., trace metals speciation in urban raw and treated wastewaters as explored by means of DGT and biotests, *Science of the Total Environment*, sous presse.
- Gourlay C., Mouchel J.-M., **Tusseau-Vuillemin M.-H.**, Garric J. (2005). Influence of algal and bacterial particulate organic matter on benzo[a]pyrene bioaccumulation in *Daphnia magna*, *Science of the Total Environment*, 346, pp. 220-230.
- Gourlay C., **Tusseau-Vuillemin M.-H.**, Mouchel J.-M. and Garric J. (2005). the ability of DOM to decrease the B(a)P bioavailability increases along DOM mineralization, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61, pp.74-82.
- **M.-H. Tusseau-Vuillemin**, R. Buzier, C. Martin dit Mériadec, I. Chardon, F. Elbaz-Poulichet, J.-L. Seidel, J.-M. Mouchel et G. Varrault. (2005) Du réseau à la rivière et De la Marne à Andrésy : métaux labiles, dissous et particuliers, PIREN Seine, Paris.
- Miège C., Gourlay C., **Tusseau-Vuillemin M.-H.**, Wang D., Durand S., Garric J., Mouchel J.-M., 2004, Variability of SPMD-availability of PAHs in river waters and wastewater treatment plants effluents, *J. of Polycyclic Aromatic Compounds*, 24 (4-5), pp. 805-825.
- **Tusseau-Vuillemin M.-H.**, Gilbin R., Bakkaus E. and Garric J., 2004, Performance of DGT in evaluating the toxicity of copper to *Daphnia magna*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 23, n°9, 2154-2161.
- **Tusseau-Vuillemin M.-H.**, Gilbin R. and Taillefert M., 2003, A dynamical model to Characterize the labile complexes collected with DGT devices, *Environmental Science and Technology* 37, n°8, pp. 1645-1652.
- Gourlay C., **Tusseau-Vuillemin M.-H.**, Garric J. and Mouchel J.-M., 2003, Effect of dissolved organic matter of various origins and biodegradabilities on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Daphnia magna*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 22, n°6, p. 1288-1294.
- Gourlay C., Miège C., Garric J., **Tusseau-Vuillemin M.-H.** and Mouchel J.-M., 2002, The use of spectrofluorimetry for monitoring the bioaccumulation and

²⁷ projet interne MODIC, animé par moi-même.

²⁸ Projet ECODYN « influence de la dégradation hétérotrophe sur la biodisponibilité des contaminants dans les eaux fortement anthropisées », animé par moi-même.

²⁹ Projet PNETOX CRIQUALADIM « Critères de Qualité pour les milieux aquatiques : métaux labiles, dissous, ou associés aux matières en suspension ? », animé par moi-même.

biotransformation by *Daphnia magna*, J. of Polycyclic Aromatic Compounds 22, n°3-4, pp. 501-516.

Estelle Bakkaus (en thèse au CEA), Aurélie Pelfrene (en thèse au CNRS), Célia Martin (ingénieur DRIRE) et Daniel Ferreira (en thèse au LNHE) ont effectué leur stage de D.E.A. dans mon équipe. Les thèses de Catherine Gourlay (doctorante au CERREVE, en poste au Cemagref depuis avril 2004 dans mon équipe) et Rémy Buzier (A.T.E.R. à l'université de Limoges) ont été co-encadrées par Jean-Marie Mouchel, Jeanne Garric et moi-même. Rodolphe Gilbin (chercheur à l'IRSN) et Céline Ridame (maître de conférences à Paris VI) ont effectué leur post-doctorat sous ma responsabilité.

1 Spéciation et biodisponibilité.

1.1 Le modèle de l'ion libre.

Du fait de leur utilisation intense, les effets toxiques des métaux sur l'homme et sur l'écosystème sont souvent connus, parfois utilisés. Par exemple, la mauvaise santé des doreurs au mercure est connue depuis le dix-huitième siècle³⁰, mais à cette époque, le calomel (HgCl_2) est aussi utilisé comme vermifuge. La bouillie bordelaise, (sulfate de cuivre additionné de chaux), encore massivement utilisée de nos jours pour ses propriétés fongicides, a été mise au point au dix-neuvième siècle pour lutter contre le mildiou dans le Bordelais. Il faut cependant attendre les années 1970 pour que l'étude simultanée des réponses biologiques et de la chimie des milieux aquatiques mette en évidence le lien entre spéciation des métaux et leur biodisponibilité.

1.1.1 Etablissement du modèle de l'ion libre et de ses dérivés.

Curieusement, les premières observations de la biodisponibilité des métaux reposent, non sur leur toxicité, mais au contraire sur la carence de certaines algues, observée en particulier en milieu marin. La Figure 31 (Anderson *et al.* (1978)) est restée célèbre et particulièrement explicite. On y observe que la croissance algale augmente avec les ajouts de zinc, mais qu'un même effet biologique (ici un taux de croissance) peut être obtenu avec des concentrations en zinc total variant de plusieurs ordres de grandeur. En revanche, lorsque ces concentrations sont exprimées en zinc libre (Zn^{2+}) de manière à prendre en compte les complexants ajoutés au milieu de culture, une relation quasi-univoque est obtenue entre l'effet biologique et les concentrations d'exposition.

³⁰ Plus tard, au dix-neuvième siècle, Lewis Carroll créa un « chapelier toqué », dans Alice au Pays des Merveilles, qui pourrait bien avoir été un peu trop exposé au mercure en manipulant le feutre, comme nombre de ses confrères !

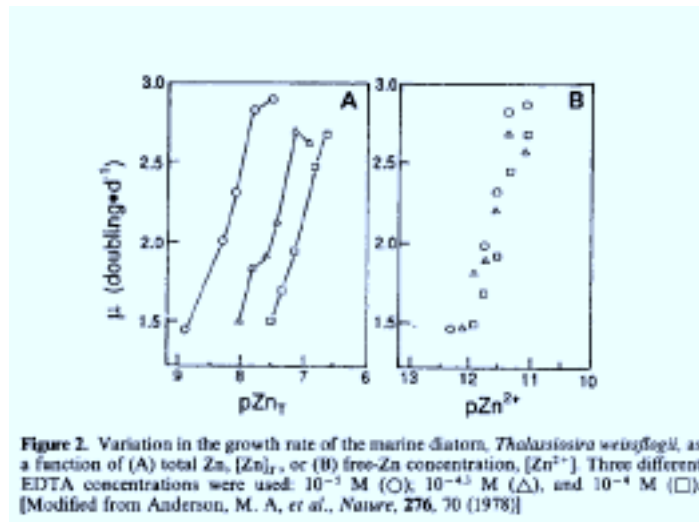


Figure 31. Variation des taux de croissance d'une diatomée marine en fonction de concentration d'exposition en zinc exprimées (A) en métal total, (B) en métal libre (Zn^{2+}). D'après (Anderson *et al.* (1978)).

Ce type de résultats a été reproduit maintes fois en laboratoire, pour différents métaux, différents organismes du milieu aquatique, et a donné lieu à une interprétation mécanistique formalisée dans deux familles successives de modèles (le modèle de l'ion libre, Morel (1983), puis le modèle du ligand biologique, Di Toro *et al.* (2001)). Un aperçu synthétique de cette littérature est donné par Peter Campbell dans ses deux revues successives du sujet (Campbell (1995), Campbell *et al.* (2002)) et par Batley *et al.* (2004). Le modèle de l'ion libre et son successeur, le modèle du ligand biologique, reposent sur les mêmes fondements conceptuels, schématisés sur la Figure 32. La spéciation du métal M y est très succinctement représentée en considérant un unique ligand L et une seule forme complexée du métal ML. Ces trois espèces se trouvent en équilibre dynamique dans la solution, dans laquelle se trouve également un organisme vivant. L'interface biologique est schématisée par deux surfaces successives. La première, qui sera une paroi cellulaire, ou du mucus selon l'organisme considéré, est constituée de polymères organiques (polysaccharides, glycoprotéines), présentant des groupes fonctionnels hydroxyles chargés négativement à pH neutre. La deuxième surface représentée est la membrane plasmique, de nature hydrophobe, qui présente des sites de complexation pour les métaux.

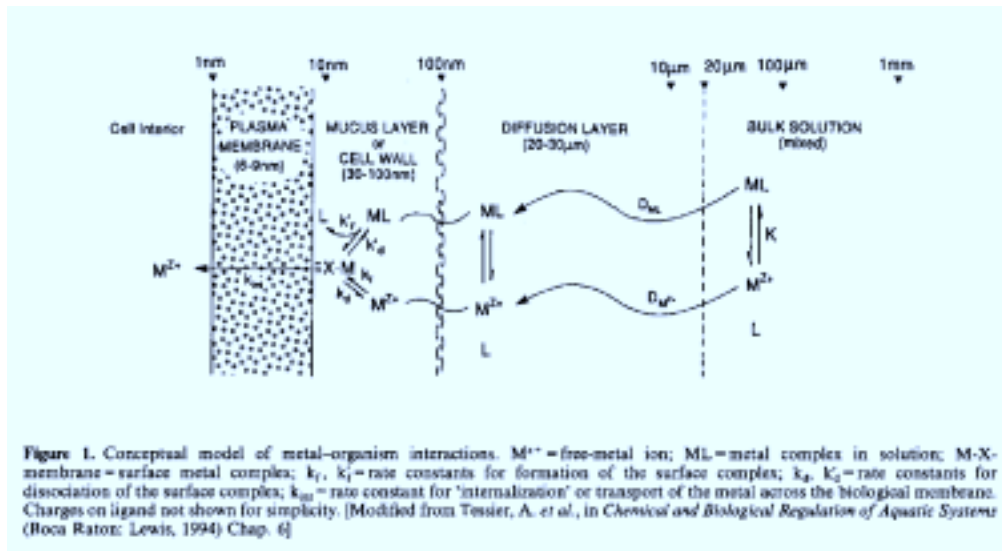


Figure 32. Modèle conceptuel des interactions des métaux avec les organismes (Campbell (1995)).

Les hypothèses fortes du modèle de l'ion libre sont 1) que l'effet biologique observable est proportionnel à la quantité de métal en interaction avec la membrane plasmique, ou ayant pénétré à l'intérieur de la cellule 2) que le métal ne pénètre dans la cellule qu'après avoir été en interaction prolongée (d'une durée largement supérieure aux temps caractéristiques des équilibres de la solution) avec la membrane plasmique au moyen d'une liaison chimique. De ces hypothèses découle que l'effet biologique est proportionnel à la quantité de métal fixée sur la membrane plasmique, qui est elle-même proportionnelle à la concentration en métal libre dans la solution (Morel (1983)). Le modèle du ligand biologique reprend ces hypothèses et étend le concept en considérant les sites de fixation du métal sur la membrane plasmique comme des ligands parmi d'autres en solution, susceptibles de liaison avec l'ensemble des espèces cationiques. La prévision de l'effet biologique se ramène donc à un calcul de spéciation en solution, qui permet par exemple de prendre en compte la compétition des ions H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , etc... avec le métal et ainsi de rendre compte des différences de toxicité observées, à métal libre constant, pour des solutions de dureté et de pH variables (Pagenkopf (1983)). Mis au point sur le modèle biologique des branchies de poisson, le modèle du ligand biologique a été récemment étendu aux micro-crustacés (De Schamphelaere et Janssen (2002)) et au phytoplancton (Campbell *et al.* (2002), De Schamphelaere *et al.* (2005)), ce qui ne pose pas de problème conceptuel mais nécessite de déterminer expérimentalement les pseudo-constantes de complexation des cations avec la membrane biologique. L'extrapolation des concepts du ligand biologique à la toxicité chronique est plus délicate car l'hypothèse d'un effet proportionnel à la quantité de sites occupés demande à être validée. D'un point de vue expérimental, il est difficile de contrôler la spéciation du milieu d'exposition lors d'un essai de toxicité chronique.

1.1.2 Les exceptions notoires.

Bien que le modèle de l'ion libre et ses dérivés aient permis de rendre compte d'un très grand nombre de situations expérimentales, plusieurs exceptions ont été décrites, qui sont d'autant plus importantes qu'elles mettent particulièrement en lumière les hypothèses qui sous-tendent le modèle. C'est généralement parce que les sites surfaciques de la membrane biologique ne sont pas en équilibre avec la solution que le modèle de l'ion libre n'est pas respecté.

Par exemple, certains complexes métalliques sont neutres et présentent un caractère lipophile, ce qui rend leur accumulation dans la membrane plasmique particulièrement efficace (Campbell (1995)). L'hypothèse du modèle de l'ion libre selon laquelle l'internalisation du métal est lente, et l'équilibre avec la solution rapide, n'est donc plus respectée et l'on observe un effet biologique accru en présence du complexe. C'est le cas des complexes formés entre le diéthylthiocarbamate (DDC) et le cadmium ou le cuivre, ainsi qu'entre les xanthates et le cadmium, le nickel, le mercure ou le plomb (Podolski (1979) ; Block et Glynn (1992)). Ces complexes sont d'autant plus efficaces qu'ils sont de petite taille et pénètrent facilement dans la membrane³¹. C'est le cas également des formes neutres du mercure (Hg° , HgCl_2° , $\text{CH}_3\text{HgCl}^\circ$, $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}^\circ$), qui diffusent passivement au travers du cytoplasme algal (Laurier (2001)). Pour que cette accumulation par diffusion soit efficace, il faut de plus que ces espèces puissent former des complexes stables avec des ligands intracellulaires. C'est ainsi que le monométhylmercure finit grand gagnant de la bioconcentration, remontant toute la chaîne trophique jusqu'à l'homme.

L'interaction métal-organisme peut également s'écarter du modèle de l'ion libre du fait d'une vitesse d'internalisation très élevée (ce qui peut être considéré comme une adaptation de l'organisme à un milieu particulièrement pauvre en métaux essentiels, cf. Morel et Price (2003)). Bien que l'interaction des formes libres du métal avec la membrane soit toujours nécessaire pour l'incorporation, si celle-ci est réalisée avant que l'équilibre chimique soit rétabli dans la solution, un gradient de concentration s'installe, qui induit non seulement la diffusion du métal sous sa forme libre, mais aussi la dissociation des formes complexées. Ainsi, la bioaccumulation de l'argent par l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* est proportionnelle à la concentration en métal inorganique total, qu'il se trouve ou non sous forme de complexes chlorides (Fortin et Campbell (2000)).

Enfin, lorsque le métal interagit avec la membrane biologique sous une forme autre qu'inorganique libre, la toxicité n'est plus proportionnelle à la concentration en métal libre. C'est le cas de l'arsenic, qui, selon son degré d'oxydation, agit différemment : l'arsenate, analogue de l'ion phosphate, utilise les transporteurs spécifiques de ce dernier pour venir inhiber la phosphorylation cellulaire. C'est le cas également de certains complexes du plomb, qui viennent former des complexes ternaires à la surface des membranes d'algues unicellulaires, comme l'ont montré très récemment Slaveykova *et al.* (2003).

1.2 Modèle du polluant organique libre et hydrophobe.

L'étude des liens entre la spéciation des micro-polluants organiques et leur biodisponibilité est beaucoup plus récente et moins aboutie que pour les métaux. Les observations convergent sur le fait qu'en phase dissoute, la matière organique réduit la biodisponibilité des micro-polluants organiques hydrophobes (Haitzer *et al.* (1999a), Haitzer *et al.* (2001)). L'explication généralement avancée est que ces contaminants s'associent avec les macro-molécules organiques de manière à former des structures stabilisées en solution. Ces structures seraient trop grosses et trop polaires pour traverser les membranes biologiques (Landrum *et al.* (1985)). Les interactions qui sont en jeu sont multiples et encore moins bien connues que la complexation des métaux avec la matière organique naturelle. Il s'agit probablement d'adsorption hydrophobe, de transferts de charge, de liaisons covalentes, de liaisons hydrogène... le tout sur les sites multiples des macro-molécules organiques. L'équilibre de partage qui en résulte peut néanmoins être décrit de façon macroscopique par une relation du type :

³¹ Notons que le DDC et les xanthates sont des molécules utilisées respectivement dans l'industrie minière et comme fongicide, que l'on ne trouve donc dans l'environnement que dans des conditions bien particulières.

$$K_{DOC} = \frac{C_{MOD}}{C_{libre} [COD]} \text{ (Équation 2),}$$

qui exprime que le rapport entre la concentration de polluant organique associé à la matière organique dissoute (C_{MOD}), normalisée à la concentration en carbone organique dissous ($[COD]$) et la concentration de polluant organique en solution (C_{libre}) est constant et égal à K_{DOC} . L'impact de ce partage sur la biodisponibilité est empiriquement décrit en considérant que le facteur de bioconcentration à l'équilibre est proportionnel à la fraction de contaminant se trouvant sous forme « libre » en solution (Haitzer *et al.* (1999a)) et ce modèle a pu être validé expérimentalement sur différents types d'organismes (Akkanen et Kukkonen (2003), Freidig *et al.* (1998), Haitzer *et al.* (1999b)). Cependant, comme pour la spéciation des métaux, la définition des contaminants organiques « libres » reste, sinon problématique, du moins très opérationnelle et repose en général sur différentes extractions ménagées de manière à ne pas attaquer les interactions entre le contaminant et la matière organique (Kukkonen et Pellinen (1994)). Afin de s'affranchir de cette variabilité méthodologique, Gourlay *et al.* (2003) ont utilisé une mesure de bioaccumulation du Benzo(a)pyrène par les daphnies en quatre heures, et montré que le résultat permettait d'évaluer rigoureusement une constante de partage fondée sur une mesure biologique uniquement.

1.3 Contraintes expérimentales pour l'observation de la biodisponibilité et de la spéciation.

Les contraintes expérimentales liées à l'évaluation de la spéciation des micro-contaminants ont fortement conditionné la plupart des expériences visant à relier un effet biologique à la chimie du milieu.

Pour les métaux par exemple, le pH est maintenu constant en travaillant dans des milieux tamponnés tels que l'HEPES (acide N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-éthanesulfonique) ou le MOPS (acide morpholino-3-propanesulfonique). La spéciation des métaux est habituellement modifiée et contrôlée au moyen de ligands artificiels, ou du moins bien documentés. Parmi eux, l'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) et le NTA (acide nitrilo-tri-acétique) sont particulièrement courants, car ils permettent de maintenir de façon fiable de très faibles concentrations en métal libre. Avec les modèles de spéciation chimique courants, il est possible de simuler la spéciation complète des métaux dans des solutions de ce type, éventuellement sans même avoir à réaliser la mesure. Dans ce type de solutions (pH stable, ligands formant des complexes très stables), la mesure de l'ion libre est d'ailleurs facilitée. Une partie importante des expériences supportant le modèle de l'ion libre ont ainsi été réalisées à partir de solutions beaucoup plus contaminées que le milieu naturel, dans lesquelles la spéciation est contrôlée par des ajouts d'EDTA (Campbell (1995)). Les relations sont souvent obtenues en diagramme log-log (Figure 31), sur plusieurs ordres de grandeur. Il est difficile de travailler sur des solutions plus réalistes pour plusieurs raisons. Aux niveaux naturels, la contamination est facile, la mesure de la spéciation des micro-polluants est très délicate, et les effets biologiques sont difficiles à observer. D'autre part, les macro-molécules formant la matière organique dissoute naturelle sont polyfonctionnelles et hétérogènes. On a pu montrer l'existence de certains types de sites de complexation très forts (Xue *et al.* (1996)), mais dans leur grande majorité, les ligands issus des acides humiques ou fulviques, par exemple, forment plutôt des complexes peu stables, d'autant moins que l'on augmente les concentrations métalliques. Enfin, à la différence des molécules simples comme l'EDTA, les molécules organiques naturelles, polymorphes, peuvent interagir de façon physico-chimique avec les organismes. Parent *et al.* (1996) et Campbell *et al.* (1997) démontrent l'accumulation de la matière organique naturelle à la surface des cellules vivantes. Slaveykova *et al.* (2003)

interprètent une induction de la bioaccumulation du plomb en présence d'acides fulviques par une modification des propriétés de surface de l'algue étudiée, du fait de l'adsorption de la matière organique, ce qui avait été observé par Vigneault *et al.* (2000). L'extrapolation des résultats de laboratoire à la biodisponibilité des métaux dans le milieu naturel est donc délicate, du fait des niveaux de contamination étudiée et de la nature des complexants habituellement choisis.

Les problèmes sont différents en ce qui concerne l'étude de la biodisponibilité des micro-polluants organiques. Contrairement aux métaux, les micro-polluants organiques sont potentiellement métabolisables lorsqu'ils pénètrent dans un organisme vivant. C'est donc non seulement la molécule d'origine, mais tout un cortège de potentiels métabolites, qu'il faut rechercher par l'analyse. Les effets biologiques sont d'ailleurs généralement différents selon le stade de métabolisation. Le marquage des molécules d'exposition par un traceur radioactif (^{14}C ou autre) reste une solution particulièrement élégante pour observer la bioaccumulation d'un contaminant organique, sans inconvénient majeur, si ce n'est les contraintes d'équipement et de manipulation. Les effets biologiques consécutifs à une contamination sont en revanche difficiles à observer, dans la mesure où ils s'expriment généralement à moyen voire long terme. Ces effets sont évidemment très variés, comme l'ensemble des molécules considérées. En ce qui concerne les hydrocarbures aromatiques polycycliques, la toxicité est essentiellement de nature mutagène, c'est à dire potentiellement cancérigène à moyen terme. L'observation de la biodisponibilité repose donc généralement sur des mesures de bioaccumulation plutôt que sur des tests écotoxicologiques. Le développement récent des biomarqueurs permet, dans certains cas, d'observer une réponse biologique précoce à la bioaccumulation (Vasseur et Cossu-Leguille, 2003).

2 Les métaux labiles sont-ils biodisponibles ?

C'est généralement leur spéciation qui peut rendre les métaux essentiels limitants pour la croissance ou au contraire toxiques. Dans la plupart des cas (c'est à dire hors les exceptions citées plus haut), c'est bien la concentration en métal libre qui permet de prévoir sa biodisponibilité, dans la mesure où elle représente sa réactivité en solution. Or, la mesure de la fraction libre d'un métal dans des échantillons naturels reste affaire de spécialiste (e.g. Meylan *et al.* (2004b)). La seule technique permettant théoriquement de mesurer *stricto sensu* le métal libre est l'électrode spécifique (Xue *et al.* (1996)), dont les niveaux de détection ne sont malheureusement pas toujours adaptés aux concentrations relevées dans le milieu naturel. Faute d'une mesure directe de la concentration en métal libre, on a donc classiquement recours aux mesures de métaux labiles. Moyennant la titration de l'échantillon au moyen d'un ligand connu, on peut alors, avec une modélisation inverse de la spéciation, déterminer la concentration en métal libre. L'inconvénient majeur est la modification de l'échantillon naturel et la lourdeur de la pratique (Meylan *et al.* (2004b)).

2.1 Définitions des métaux labiles.

Même dans le contexte scientifique restreint de la chimie des milieux aquatiques, le terme labile est utilisé avec différents sens. L'idée générale est que ce qui est labile est aisément modifiable, échangeable, en interaction facile et rapide avec la solution environnante. La définition des espèces labiles est toujours opérationnelle, c'est à dire liée à une technique d'extraction. On parle ainsi de métaux labiles pour désigner la fraction de métal associée à un sol, un sédiment ou des particules, qui s'échange avec la solution. Pour l'observer, on enrichit par exemple la solution en éléments marqués dont l'on suit la disparition (Ayoub *et al.* (2003)). On définit également parfois la fraction métallique labile comme celle qui est extraite par une attaque chimique ménagée (Tessier *et al.* (1996)). Enfin, si l'on s'intéresse aux métaux en solution seulement, on peut également définir une fraction labile, qui correspond

aux complexes métalliques qui s'échangent facilement et s'équilibrent rapidement avec la solution environnante. Cette définition touche aux propriétés cinétiques des réactions de formation et de dissociation des complexes et s'appuie sur des méthodes d'observation. Les méthodes électrochimiques reposent sur la mesure du courant induit par l'oxydation ou la réduction de l'ion métallique à une électrode (polarographie, ASV et DPASV). Dans ce cas, le terme labile fait référence à l'ensemble des complexes métalliques susceptibles de se dissocier au voisinage de l'électrode, pendant le temps caractéristique de la mesure (Davison (1978) ; De Jong et Van Leeuwen (1987) ; Guthrie *et al.* (2005)). D'autres méthodes ont été développées, délibérément fondées sur la discrimination cinétique, comme les méthodes d'analyses en flux. La solution migre en continu au travers d'une micro-colonne remplie d'un composé aux propriétés intéressantes (résine Chelex qui fixe les cations, gel hydrophobe qui capture les complexes non-ioniques, Downard *et al.* (2003), etc...). L'ajustement de la vitesse de passage - soit du temps de contact - permet de séparer les complexes par labilité. Les métaux labiles en solution comprennent les ions libres, les complexes inorganiques (hydroxydes, carbonates), et une partie des complexes organiques.

Toutes ces méthodes ont en commun de ne pouvoir être mise en œuvre que par des chimistes plutôt chevronnés, à des niveaux de contamination contraignants, ou bien de nécessiter un traitement préalable de l'échantillon. L'attrait de la méthode du gradient de diffusion en couche mince (Diffusion Gradient in Thin films en anglais, soit DGT dans ce qui suit) proposée dans les années 90 par Davison et Zhang (1994b) tient à ce qu'elle est d'un usage particulièrement simple et s'utilise directement *in situ*, sans modification de l'échantillon, en intégrant la contamination dans le temps si celle-ci est variable.

2.1.1 Le Gradient de diffusion en couche mince.

2.1.1.1 Principe de la méthode.

Le gradient de diffusion en couche mince repose sur l'emploi de gels de diffusion et de résine chélatante (Davison et Zhang (1994a)). Les cations métalliques migrent à travers le gel de diffusion et se fixent de façon irréversible sur la résine. L'innovation provient du fait que c'est la diffusion, contrôlée par les propriétés physiques du gel et la concentration en métal dans le milieu à échantillonner, qui limite la cinétique d'accumulation sur la résine Chelex. Sur la Figure 33, on voit le montage des DGT au laboratoire, et un dispositif d'exposition en Seine, après trois jours de déploiement.



Figure 33. Mise en place au laboratoire sur un support DGT en plastique des différents gels chélatant et diffusif (gauche) ; Six DGT après déploiement en Seine pendant trois jours (droite). D'après Tusseau-Vuillemin *et al.* (2005a).

Davison et Zhang (1994a) proposent de relier la quantité de métal accumulée pendant l'exposition à la concentration en métal labile de la solution par l'équation suivante :

$$C_{DGT} = \frac{M\Delta g}{tAD} \quad (M \text{ est la masse de métal accumulée, } \Delta g \text{ est l'épaisseur du gel, } t \text{ le temps}$$

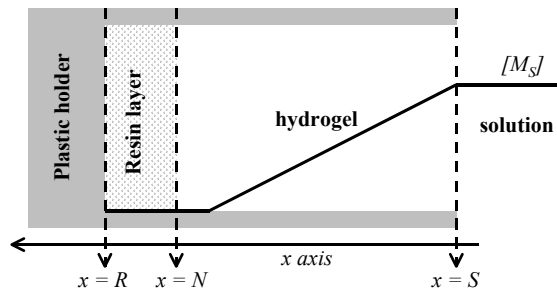
d'exposition, A la surface de gel exposée, et D le coefficient de diffusion du métal dans le gel, pré-déterminé par Lancaster Research Ltd). Cette quantité est déterminée par analyse (en absorption atomique ou par une autre méthode) de l'éluat acide de la résine, relevée après l'exposition dans la solution. La technique du gradient de diffusion en couche mince présente donc plusieurs avantages, qui rendent son utilisation tout à fait envisageable dans le cadre de la surveillance des milieux :

- pré-concentration de l'échantillon sur la résine (détection de faibles contaminations, diminution du risque de contamination)
- analyse chimique finale dans une matrice simple (acide concentré au lieu d'eau naturelle)
- échantillonnage spécifique *in situ* intégrateur au cours du temps.

2.1.1.2 La labilité des espèces collectées par le Gradient de Diffusion en Couche mince.

Comme toutes les méthodes de spéciation (exceptée l'électrode spécifique), la DGT ne permet pas de mesurer la concentration en ion libre stricto sensu, mais plutôt une concentration en métal labile. Il paraît d'autant plus important de bien définir ce que recouvre ce terme « labile » que la méthode est simple d'utilisation et donc potentiellement accessible aux non-spécialistes.

L'ensemble des complexes métalliques de la solution peut diffuser dans le gel tout en restant en équilibre dynamique avec leur forme dissociée. Ceux de ces complexes qui se dissocient au cours de leur migration dans le gel diffusif, donnent lieu à un cation qui se fixe sur la résine. Ces complexes sont dits « labiles » et sont mesurés en tout ou partie par la DGT. Ce couplage entre processus physiques et chimiques s'exprime simplement en équations, en considérant un métal M, un ligand L et leur forme complexée ML (Figure 34, (1)). L'irréversibilité de la fixation sur la résine se traduit simplement par une concentration en métal libre nulle à son voisinage.



$$\begin{cases} \frac{\partial [M_x]}{\partial t} = D_M \frac{\partial^2 [M_x]}{\partial x^2} + (k_{dis} [ML_x] - k_f [M_x][L_x]) \\ x \geq N, \quad [M_x] = 0 \end{cases}$$

$$(1) \quad \frac{\partial [L_x]}{\partial t} = D_L \frac{\partial^2 [L_x]}{\partial x^2} + (k_{dis} [ML_x] - k_f [M_x][L_x])$$

$$\frac{\partial [ML_x]}{\partial t} = D_{ML} \frac{\partial^2 [ML_x]}{\partial x^2} + (-k_{dis} [ML_x] + k_f [M_x][L_x])$$

$$(2) \quad \left. \frac{\partial [M_x]}{\partial x} \right|_R = \left. \frac{\partial [ML_x]}{\partial x} \right|_R = \left. \frac{\partial [L_x]}{\partial x} \right|_R = 0$$

Figure 34. Représentation schématique de la DGT utilisée pour la modélisation. D'après Tusseau-Vuillemin *et al.* (2003b).

k_{dis} et k_f sont les constantes cinétiques de dissociation et de formation associées à l'équilibre entre ligand, métal libre et métal complexé ; D_M , \overline{D}_L , \overline{D}_{ML} sont les coefficients de diffusion au travers du gel de M, au travers du gel et de la résine de L et ML. La condition aux limites (Figure 34, (2)) exprime le fait que le support en plastique sur lequel repose la résine est étanche.

L'analyse formelle de ce système couplé à l'état stationnaire permet de montrer que le taux d'accumulation du métal sur la résine est proportionnel à la concentration en ion libre, plus une fraction $\xi \frac{D_{ML}}{D_M}$ du métal complexé, où ξ est défini comme la fraction de métal complexé

perdue au cours de la diffusion depuis la solution vers la résine (terme $([ML_S]-[ML_N])$ dans l'équation (3) ci-dessous).

$$\Phi_R = \frac{D_M S}{g} [M_S] + \frac{D_{ML} S}{g} ([ML_S] - [ML_N]) \quad (3), \text{ où } \Phi_R \text{ est le taux d'accumulation du métal sur}$$

la résine, S la surface d'exposition, g l'épaisseur du gel, et les indices S et N réfèrent au schéma de la Figure 34.

ξ caractérise la labilité du complexe. Des simulations numériques de ce système non linéaire permettent d'explorer comment ξ varie en fonction de différents paramètres, opérationnels et chimiques. La labilité augmente lorsque sa vitesse de dissociation ou son temps de résidence dans le gel augmente (c'est à dire pour une épaisseur de gel plus importante ou une diffusion moins rapide). Cependant, la fraction de métal extraite en DGT ($\xi \frac{D_{ML}}{D_M}$) décroît globalement

lorsque D_{ML} décroît. Ceci confirme l'intérêt du développement de gels de diffusion spécialement conçus pour freiner certaines molécules comme les acides humiques (Zhang et Davison (2000)). La Figure 35 montre quatre exemples de données expérimentales d'accumulation de cuivre sur une résine de DGT en fonction du temps. Dans le cas d'une solution d'EDTA, seul le cuivre inorganique est labile, alors que dans une solution de citrate, toutes les formes du cuivre sont labiles. On voit sur la Figure 35a que l'accumulation de cuivre sur la résine n'est pas toujours fonction de la concentration en cuivre libre dans la solution puisqu'elle est plus forte pour $[Cu^{++}] = 0,03 \mu\text{mol.L}^{-1}$ que pour $[Cu^{++}] = 0,18 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

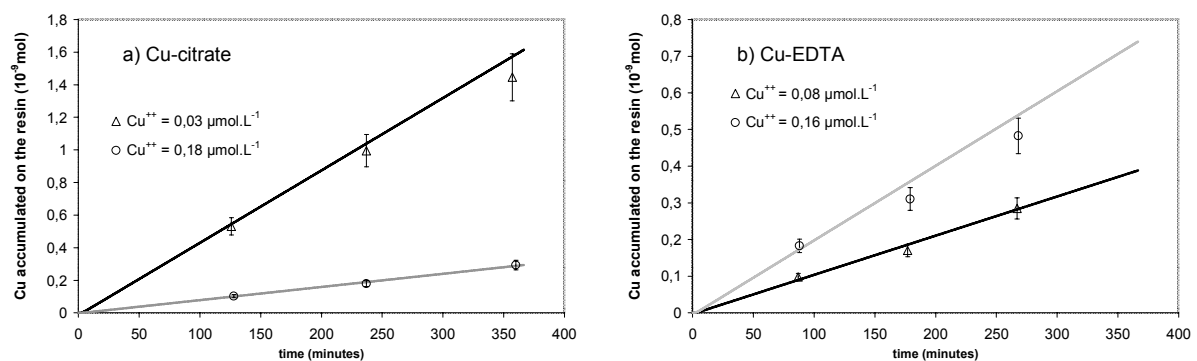


Figure 35. Accumulation du cuivre sur les résines de DGT en fonction du temps d'exposition pour des solutions de NaNO_3 (10^{-2} mol/L) et de cuivre additionnées a) de citrate ($0,5 \mu\text{mol/L}$) b) d'EDTA ($0,1$ et $0,2 \mu\text{mol/L}$). Triangles et ronds : données expérimentales ; lignes continues : simulations numériques. D'après Tusseau-Vuillemin *et al.* (2003b).

De façon plus surprenante, les simulations numériques ont permis de montrer qu'un même complexe pouvait apparaître labile ou non selon le rapport métal/ligand de la solution (plus ce ratio est élevé, moins le complexe apparaît labile). Cette tendance a pu être très nettement

reproduite expérimentalement sur le cas du complexe Cu-NTA (Figure 36). Pour une même solution de nitrate de sodium additionnée de NTA, le complexe Cu-NTA apparaît quasi totalement labile ou labile à seulement 30% selon la quantité de cuivre ajoutée. La modélisation sous-estime les variations de labilité observée (Tusseau-Vuillemin et Gilbin (2002)), probablement du fait que l'ensemble de la solution n'est pas pris en compte. Vasconcelos *et al.* (1996) avaient observé ce même phénomène avec une autre technique de spéciation (résine Chelex sans gel de diffusion).

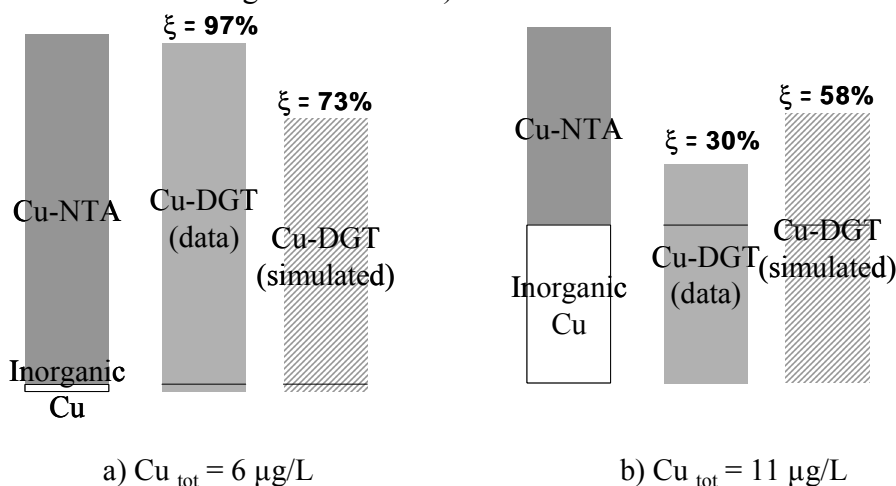


Figure 36. Spéciation du cuivre en solution dans du nitrate de sodium (10^{-2} M) additionné de NTA (10^{-7} M). La barre horizontale représente le cuivre inorganique. En gris clair : données expérimentales de cuivre labile. En hachures : prévision du cuivre labile par simulation numérique. D'après Tusseau-Vuillemin et Gilbin (2002).

On ne peut donc que souligner combien la définition d'une espèce labile s'avère délicate, dans la mesure où cette propriété varie, non seulement en fonction du dispositif expérimental, de la nature des ligands observés, mais encore du rapport métal : ligand dans la solution. Dans le milieu naturel, les deux derniers paramètres sont variables et difficilement mesurables.

2.1.2 Mise en œuvre dans des matrices diverses.

L'un des avantages les plus intéressants de la technique DGT est qu'elle permet d'étudier des matrices environnementales complexes (organiques et inorganiques) sans les complications analytiques habituelles (en particulier les interférences). En effet, seul l'échantillonnage est réalisé directement dans le milieu, l'analyse portant ensuite sur un éluat acide ne présentant pas de difficulté particulière pour les techniques de mesure classiques. Il devient ainsi théoriquement possible de réaliser des mesures de métaux labiles en eaux urbaines, usées ou traitées, pour lesquelles très peu de données sont encore disponibles. Buzier *et al.* (2003) montrent que l'accumulation des métaux sur la résine est effectivement linéaire en fonction du temps, dans une eau usée filtrée, en dépit de la formation probable d'une couche de biofilm à la surface de la DGT (Figure 37). Non seulement ce biofilm ne semble pas modifier l'épaisseur de la couche de diffusion (l'accumulation sur des longues périodes serait plus faible), mais la concentration en métaux labiles ne semble pas affectée par une éventuelle évolution de la matière organique dissoute (on obtient strictement le même résultat avant et après une journée d'incubation).

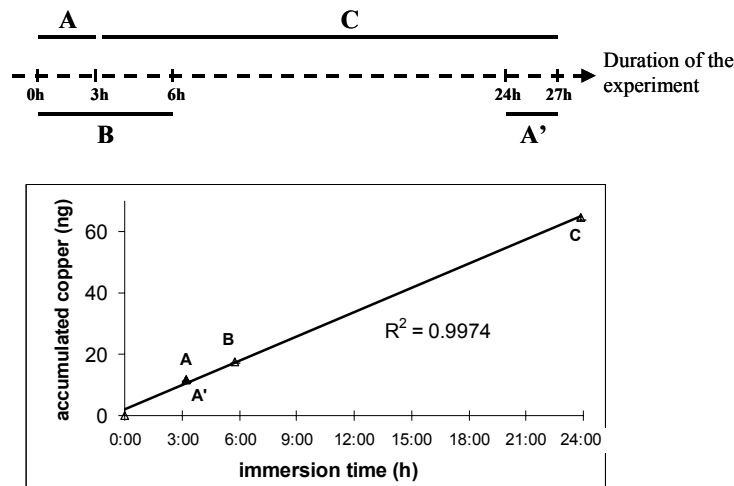


Figure 37. Accumulation du cuivre sur les résines de DGT en fonction du temps de déploiement dans une eau usée filtrée. Le schéma représente la séquence de déploiement des différents dispositifs. D'après Buzier *et al.* (2003).

2.2 Comparaison avec la réponse biologique.

Comme on l'a mentionné, plus haut, la plupart des expériences de réponse biologique à une exposition métallique s'interprètent au moyen du modèle de l'ion libre. On suppose donc généralement qu'une technique de spéciation fournira une information d'autant plus pertinente sur la fraction métallique biodisponible que la fraction labile effectivement mesurée sera proche de la concentration en métal libre (par exemple, Webb et Keough (2002)). Inversement, lorsque la réponse biologique ne peut pas s'interpréter au moyen du modèle de l'ion libre, il est intéressant d'évaluer si le métal labile n'est pas un meilleur paramètre explicatif, et à quelles conditions (Pinheiro et Van Leeuwen (2001), Meylan *et al.* (2004a)). Dans ce qui suit, on a couplé une approche écotoxicologique (tests de toxicité aiguë sur *Daphnia magna*) à des mesures chimiques de métaux dissous et labiles pour évaluer, sans préjuger de l'un ou l'autre de ces comportements, l'adéquation entre la technique de mesure DGT et la réponse biologique (Tusseau-Vuillemin *et al.* (2004)).

2.2.1 En matrice contrôlée.

Il est possible de reproduire les cas extrêmes mentionnés ci-dessus au laboratoire, avec des ligands organiques bien identifiées. L'acide éthylènediaminotriacétique (EDTA) et l'acide nitriloacétique (NTA) forment, avec le cuivre, des complexes respectivement inertes et labiles (Tusseau-Vuillemin et Gilbin (2002)). De plus, ces complexes ne sont pas toxiques pour la daphnie. Au contraire, la glycine forme avec le cuivre un complexe toxique pour la daphnie (Borgmann et Ralph (1983)), qui est de plus partiellement labile avec la technique DGT. Une première courbe dose-effet de référence a été obtenue en exposant les daphnies au cuivre dans de l'eau minérale (Figure 38, triangles noirs). Les biotests ont été répétés dans cette matrice minérale, additionnée des trois ligands organiques. On observe (Figure 38a et b) l'effet protecteur de la complexation par l'EDTA et le NTA. L'effet 50% de mortalité est obtenu, en conditions minérales comme en présence de ces deux ligands, pour une concentration en cuivre libre de 3,4 à 4 µg/L (calculé par logiciel de spéciation). En revanche, en présence de glycine, la concentration en cuivre libre donnant lieu à 50% d'effet est très inférieure (0,9 µg/L) car le complexe formé est toxique.

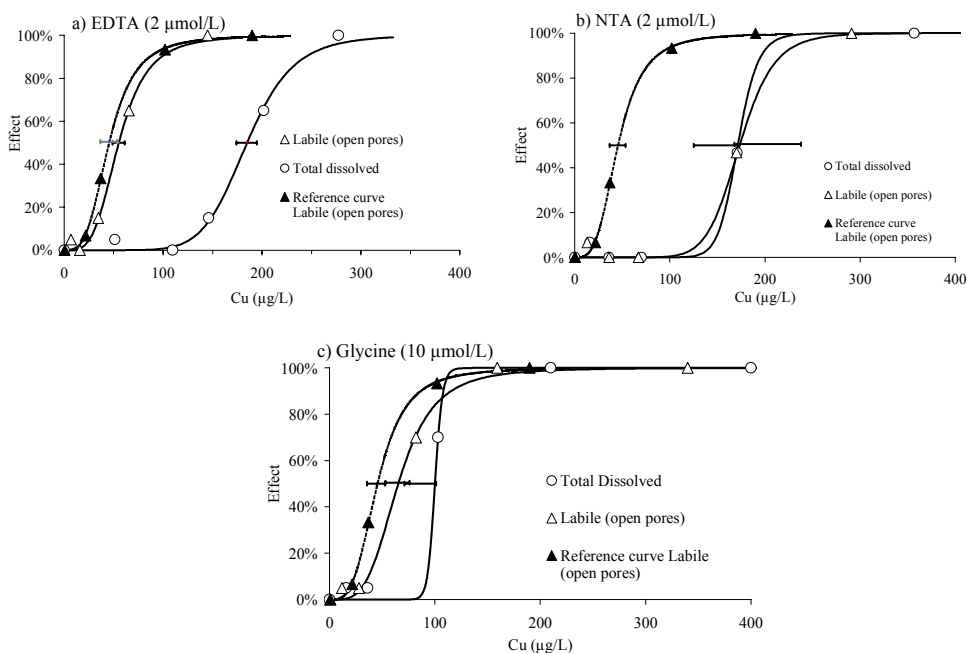


Figure 38. Courbes de toxicité obtenues avec le cuivre pour la daphnie, en eau minérale additionnée ou non de a) EDTA (2 µmol/L), b) NTA (2 µmol/L) et c) Glycine (10 µmol/L), exprimées en cuivre total dissous (ronds) ou labile (triangles blancs). La courbe de référence (triangles noirs) est obtenue en eau minérale pure. D'après Tusseau-Vuillemin *et al.* (2004).

Du fait que les complexes du cuivre et de l'EDTA sont inertes vis à vis de la DGT, le cuivre labile mesuré dans ce cas est égal au cuivre inorganique. De fait, les courbes dose-effet obtenues en eau minérale ou en présence d'EDTA, mais exprimées en cuivre labile se confondent (Figure 38a). C'est le cas simple, largement documenté (Campbell (1995)), où la mesure du cuivre labile permet de prévoir la toxicité d'une solution. En revanche, les complexes du cuivre et du NTA étant labiles, la mesure du cuivre labile se confond avec la mesure du cuivre total dissous (Figure 38b). La technique DGT ne permet donc pas de prévoir la toxicité d'une solution de cuivre et de NTA. Enfin, dans le cas de la glycine, il se trouve que la courbe dose-effet exprimée en cuivre labile est proche de celle obtenue en eau minérale (Figure 38c), ce qui reflète l'heureuse conjonction d'un complexe toxique et partiellement labile... Ce qui a été exposé plus haut sur le lien entre les conditions environnementales et la labilité des complexes montre que cette observation n'est pas généralisable. Toutefois, notons que certaines des exceptions au modèle de l'ion libre s'expliquent par le fait que l'organisme provoque un gradient de concentration de métal dans la solution, ce qui induit, de façon tout à fait similaire à l'échantillonnage par DGT, la dissociation partielle des complexes les plus labiles. Ce lien entre concentration labile et réponse biologique a été observé dans le cas de la bioaccumulation du cuivre par le périphyton en mésocosme peu contaminé (Meylan *et al.* (2004a)).

2.2.2 En matrices réelles.

Ces cas d'école sont intéressants pour illustrer les limites et les potentialités de la technique, mais demandent à être extrapolés au milieu naturel. La matière organique que l'on trouve dans les rivières résulte probablement d'un mélange entre ligands d'origine biologique éventuellement très spécifiques des métaux (Xue *et al.* (1996)), et ligands plus « mous », comme les acides humiques et fulviques. Nous avons appliqué la méthodologie présentée plus haut à de la matière organique dissoute d'origine naturelle (acides humiques, extraits d'algues fraîches, extraits d'algues fanées). Il apparaît que ces trois sources de matière organique permettent de former des complexes du cuivre qui réduisent globalement sa toxicité (Figure

39), cet effet étant le plus prononcé pour les acides humiques. Les complexes du cuivre avec les acides humiques sont en partie labiles, mais des gels particuliers permettant de limiter leur diffusion (Zhang et Davison (2000)) peuvent être utilisés. On montre qu'avec ces gels (dits « restrictifs »), la mesure du cuivre labile permet de prévoir sa toxicité en présence d'acides humiques. En revanche, en présence d'extraits d'algues fanées, et surtout d'algues fraîches, le cuivre labile surestime la toxicité du mélange (Figure 39). En effet, la technique DGT collecte des complexes labiles qui ne sont pas toxiques.

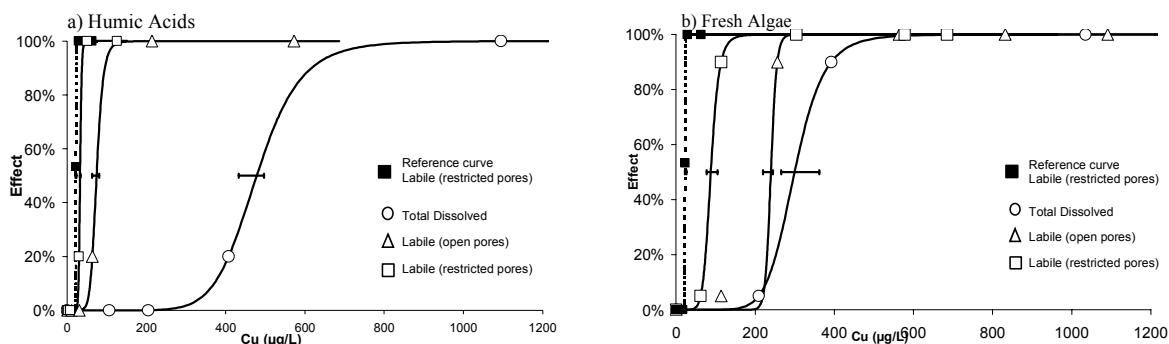


Figure 39. Courbes de toxicité obtenues avec le cuivre pour la daphnie, en eau minérale additionnée ou non de a) acides humiques (7 mgC/L), b) extraits d'algues fraîches (9 mgC/L), exprimées en cuivre total dissous (ronds) ou labile (triangles blancs), voire labile en gels restrictifs (carrés). La courbe de référence (carrés noirs) est obtenue en eau minérale pure, avec des gels restrictifs. D'après Tusseau-Vuillemin *et al.* (2004).

C'est donc a priori en tête de bassin, là où la matière organique provient essentiellement du ruissellement sur les sols, et hors des périodes de bloom algal que la meilleure corrélation sera obtenue entre cuivre labile et cuivre biodisponible.

Cette recommandation est confirmée par les expériences réalisées à partir de matière organique urbaine, obtenue par dilution d'eau usée et traitée (que nous avons prélevée sur deux stations boues activées) après filtration. En effet, Buzier *et al.* (2003) montrent avec la même méthodologie, adaptée aux eaux usées, qu'une fraction importante des complexes formés par le cuivre et le cadmium avec la matière organique d'origine urbaine est labile, sans être toxique (Figure 40, somme de Me_{res} et Me_{dif}). L'interprétation biologique des mesures de métaux labiles dans ces matrices doit donc être conduite avec précaution. Néanmoins, la technique DGT, couplée à des tests écotoxicologiques, permet d'établir une spéciation inédite du cuivre et du cadmium en présence de matière organique d'origine urbaine (Figure 40). Il en ressort donc qu'une partie importante de la complexation du cuivre et du cadmium dans les eaux usées est assurée par des ligands labiles, que les gels restrictifs ne freinent pas particulièrement et que l'on peut donc supposer de petite taille, comme cela fut observé par Bender *et al.* (1970) et Buckley (1983). Le traitement biologique semble diminuer la contribution de ces complexes en ce qui concerne le cuivre, alors que peu de changements sont observés pour la complexation du cadmium.

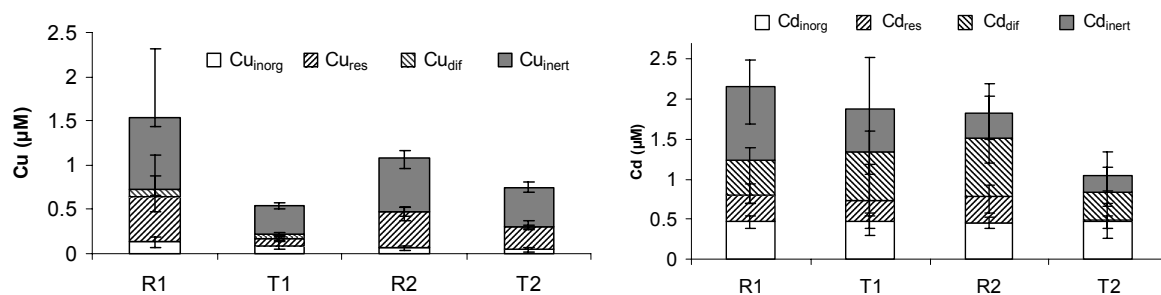


Figure 40. Fractionnement du cuivre et du cadmium nécessaires à l'obtention de 50% de toxicité sur la daphnie en présence d'eau usée (R1, R2) ou traitée (T1, T2), diluée à 10% dans de l'eau minérale. Me_{inorg} : métal inorganique (déterminé d'après biotest) ; Me_{res} : métal labile diffusant dans les gels restrictifs ; Me_{dif} : métal labile freiné par les gels restrictifs ; Me_{inert} : métal inerte. D'après Buzier *et al.* (soumis).

Pour l'ensemble de ces expériences, il convient cependant de souligner que l'observation d'un effet biologique (ici, toxicité aiguë sur daphnie) nécessite de travailler avec des concentrations de métaux plus élevées que celles que l'on rencontre dans le milieu naturel ou dans les effluents. La spéciation observée prend donc très probablement en compte certains sites de complexation faibles, qui ne seraient pas titrés à de moins fortes concentrations. L'écart entre métal labile et inorganique est donc certainement majoré en comparaison des échantillons non dopés. L'observation d'une réponse biologique à des niveaux de contamination plus faible est un enjeu important pour l'évaluation des outils de spéciation et pourrait passer par le développement de tests de bioaccumulation n'entraînant pas de toxicité immédiate (Pelfrene (2004), Tusseau-Vuillemin *et al.* (2005b), Ferreira (2005)).

3 Facteurs de contrôle de la biodisponibilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques.

3.1 Méthodologie.

Comme on l'a dit plus haut, Gourlay (2004) a choisi de mesurer la biodisponibilité du Benzo(a)pyrène au travers de sa bioaccumulation par les daphnies. La diminution de la bioaccumulation du B(a)P en présence de différentes sortes de matière organique dissoute permet d'évaluer, au moyen du modèle du polluant organique libre (section 1.2), une constante de partition $K_{DOC,biol}$. Cette constante (Equation 1) est obtenue par ajustement de l'Équation 3 aux données expérimentales et reflète l'affinité du B(a)P pour la matière organique dissoute.

$$\frac{F}{F_0} = \frac{1}{1 + K_{DOC}(biol).[COD]} \quad \text{Équation 3}$$

où F représente la quantité de B(a)P bioaccumulé en quatre heures par des daphnies, en présence de matière organique dissoute ($[COD]$, en mgC/L) ; F_0 représente la quantité de B(a)P bioaccumulé dans les mêmes conditions, en eau minérale.

La méthode de mesure en spectrofluorimétrie utilisée pour évaluer F et F_0 est détaillée et validée par Gourlay *et al.* (2002). Notons que cette exploitation ne peut être réalisée qu'à la condition que la bioaccumulation du B(a)P soit effectivement réduite en présence de matière organique dissoute. La Figure 41 présente des exemples de ce type d'expériences, pour de la matière organique dissoute issue d'acides humiques.

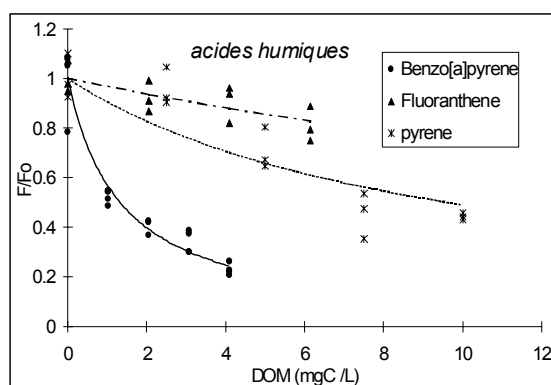


Figure 41. Bioaccumulation du Benzo(a)pyrène en présence de matière organique dissoute d'origine humique, normalisée à la bioaccumulation de Benzo(a)pyrène en eau minérale. D'après Gourlay et al., 2002.

Bien que la biodisponibilité des trois HAP soit réduite par la matière organique dissoute, c'est le B(a)P qui est le plus affecté, puisque 4 mgC/L d'acides humiques suffisent à diminuer de 80% sa bioaccumulation par les daphnies. Cet hydrocarbure, particulièrement lourd et hydrophobe (252 g/mol, $\log(K_{ow}^{32})=6,3$), a été retenu par la suite comme molécule modèle pour l'évaluation de l'efficacité relative de différents types de matière organique pour réduire la biodisponibilité des micro-polluants hydrophobes. Cette efficacité sera quantifiée au moyen de la constante de partition biologique $K_{DOC,biol}$.

3.2 Impact de la matière organique dissoute.

L'un des apports importants du travail de Catherine Gourlay (Gourlay (2004)) est d'avoir montré que des matières organiques dissoutes ne présentant pas de caractère humique réduisaient la biodisponibilité du B(a)P. La Figure 42 montre en effet que les exudats algaux provenant de cultures à des stades différents de développement, comme l'eau interstitielle de boues activées, réduisent la bioaccumulation du B(a)P de façon significative.

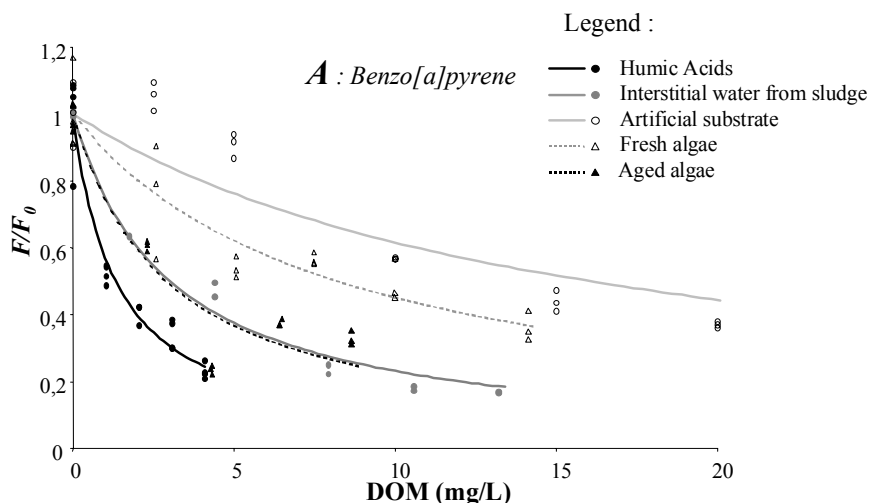


Figure 42. Bioaccumulation du Benzo(a)pyrène en présence de matière organique dissoute de différentes origines, normalisée à la bioaccumulation de Benzo(a)pyrène en eau minérale. D'après Gourlay et al., 2003.

Une réduction de 50% est obtenue pour une solution de 1 mgC/L d'acides humiques, de 5 mgC/L d'eau interstitielle de boues activées ou d'exudats algaux dégradés, de 10 mgC/L d'exudats algaux frais, et de 20 mgC/L de solution d'extrait de jus de viande (Viandox®).

³² Constante de partage octanol-eau

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 (Viandox)	0,18 (\pm 0,5)	2,8 (\pm 0,9)	6,2 (\pm 1,7)
Eau extraite de boue 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 7. Constantes de partition estimée à partir de la réduction de la bioaccumulation des hydrocarbures aromatiques polycycliques en présence de différents types de matière organique dissoute.

Tous les types de matière organique n'ont donc pas la même efficacité, comme le reflètent les constantes de partition établies par cette méthode biologique (Tableau 7). Néanmoins, les concentrations de carbone organique auxquelles l'on observe un effet significatif restent d'un ordre de grandeur environnemental (Tusseau-Vuillemin et Le Réveillé (2001)).

La matière organique non-humique se caractérisant généralement par son instabilité vis à vis de la biodégradation, il a paru intéressant d'envisager l'évolution de son potentiel d'interaction avec le B(a)P au cours du processus de biodégradation. Des incubations en conditions contrôlées ont été réalisées, au cours desquelles l'aromaticité de la matière organique a été évaluée au moyen de l'indice SUVA (absorbance UV à 254 nm normalisée à la concentration en carbone organique dissous), ainsi que les constantes de partitions biologiques (Gourlay *et al.* (2005b)).

Le substrat artificiel, choisi comme mélange modèle d'eau usée domestique, évolue au cours de la biodégradation vers une plus grande aromaticité et un potentiel accru d'interaction avec le B(a)P (Figure 43). La composition de ce substrat -comme des eaux usées- est complexe et variable. On peut cependant considérer que les molécules les plus facilement hydrolysables et biodégradables sont des sucres, des protéines, de petite taille, faiblement aromatiques. L'aromatisation progressive du substrat biodégradable pourrait donc correspondre à la concentration de composés aromatiques initialement présents (Gourlay *et al.* (2005b)). Au contraire, l'aromaticité des extraits d'algues, faible en début d'incubation, diminue encore légèrement au cours de la biodégradation, ce que l'on peut attribuer à certains composés aliphatiques et peu dégradables des parois algales (Allard *et al.* (1998)).

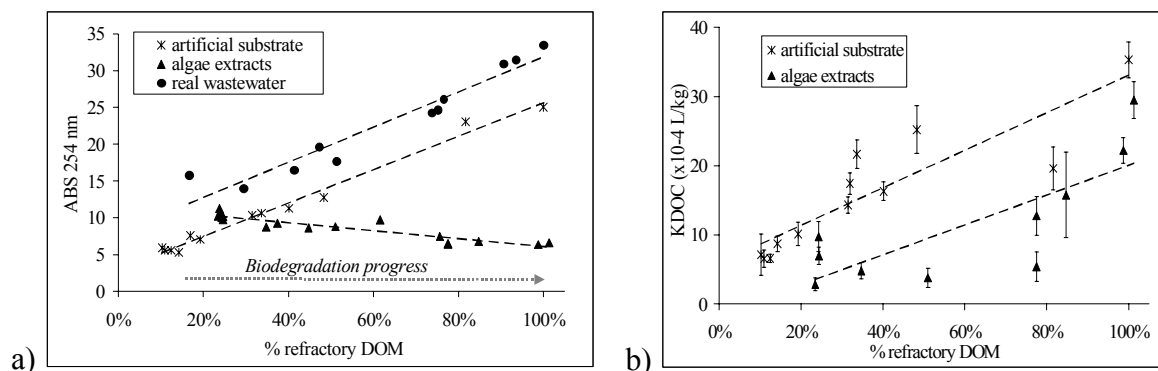


Figure 43. Evolution de la matière organique dissoute (jus de viande ou exudats algaux) en fonction de son état de biodégradation, exprimé par le pourcentage de matière réfractaire. a) absorbance à 254 nm (en $\text{cm. L}^{-1}.\text{g}^{-1}$); b) constante de partition biologique vis à vis du B(a)P. D'après Gourlay et al., 2005.

Pour les deux types de substrats, en revanche, la capacité à diminuer la bioaccumulation du B(a)P augmente avec la biodégradation (Figure 43b). Bien que ces expériences ne permettent pas de mettre en évidence les mécanismes, on explique ce résultat par la résistance à la biodégradation des molécules hydrophobes, présentant de fortes interactions avec le B(a)P. D'autre part, des molécules particulières (les produits microbiens solubles) apparaissent au cours de la biodégradation bactérienne. La constante de partition de ces molécules est élevée

($K_{DOC,biol} = 25 \times 10^4$ L/kg, Gourlay *et al.* (2005b)), leur apparition progressive au cours de l'incubation peut donc en partie être responsable de l'augmentation globale d'interactions avec le B(a)P.

Quoiqu'il en soit, il existe une relation entre l'état de biodégradation de la matière organique dissoute et sa capacité à diminuer la biodisponibilité du B(a)P. Il est remarquable de constater que des constantes de partition proches de celle des acides humiques sont obtenues après quelques jours de dégradation seulement, alors que le processus d'humification complet est *a priori* beaucoup plus lent.

3.3 Impact de la matière organique particulaire.

La faible solubilité et le caractère hydrophobe du B(a)P se traduisent, dans un environnement aquatique, par une forte affinité pour la phase particulaire (PIREN). Les matières en suspension susceptibles d'offrir de telles surfaces d'adsorption sont de nature très diverses. En guise de première approche, Gourlay *et al.* (2005a) ont étudié deux compartiments particulaires d'origine biologique : des algues unicellulaires (*Selenastrum capricornutum*) et les particules produites lors de la dégradation d'un substrat soluble (Viandox®). Ces deux types de matière organique particulaire peuvent être interprétés comme des modèles pour les particules d'origine algale et microbienne, impliquées au début et à la fin du cycle de la matière organique en rivière. La méthodologie est identique à celle exposée plus haut (voir chapitre 3.1) puisque l'on détermine des constantes de partition à partir de la différence de bioaccumulation du B(a)P par les daphnies en présence ou en absence de matière organique. Cependant, la biodégradation de substrat soluble produisant à la fois de la matière organique particulaire et soluble, un modèle de partition à trois compartiments (B(a)P libre, dissous et particulaire) a été utilisé pour reproduire les données expérimentales (Gourlay *et al.* (2005a)). La matière organique d'origine algale provoque une très forte diminution de la bioaccumulation du B(a)P par les daphnies (Figure 44), qui est d'autant plus visible que la durée d'exposition des daphnies est importante (4 à 24 heures)³³.

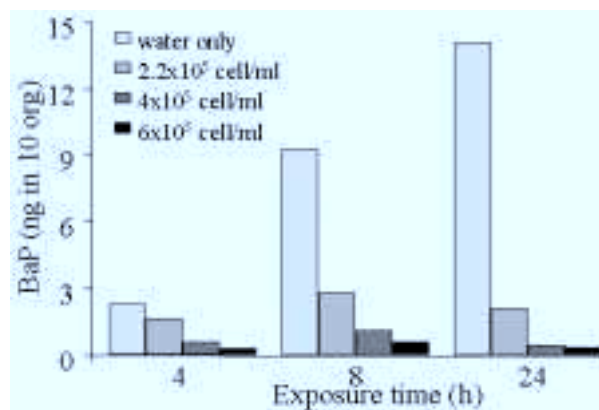


Figure 44. Quantité de B(a)P (ng) accumulé dans dix daphnies (âgées de 5 à 7 jours), après 4, 8 ou 24 heures d'exposition dans une solution de B(a)P à 1 µg/L, en présence d'algues unicellulaires (*Selenastrum capricornutum*). D'après Gourlay *et al.* (2005a).

Bien que les algues soient ingérées par les daphnies au cours de l'exposition (40 à 70% des algues sont ingérées après une journée d'exposition), le B(a)P qui leur est associé n'est donc pas retenu dans les organismes. On voit sur cet exemple où l'on a fait varier le temps d'exposition que la notion de constante de partition demande à être précisément définie, surtout lorsqu'elle est obtenue par une mesure biologique. Les constantes de partition

³³ Les solutions d'exposition sont préparées une heure avant l'immersion des daphnies, quelle que soit l'expérience.

obtenues pour les produits de biodégradation du Viadox sont sensiblement du même ordre de grandeur que celles obtenues pour les algues, avec la même durée d'exposition.

Conditions expérimentales	$K_{DOC} \times 10^4$ (L/kg)	$K_{POC} \times 10^4$ (L/kg)	r^2, n
<u>Algue <i>Selenastrum capricornutum</i></u>			
4 heures d'exp.	n.d.	49 (\pm 12)	0.92, 8
24 heures d'exp.	n.d.	149 (\pm 38)	0.89, 16
<u>Réacteur de biodégradation (4 heures d'exposition)</u>			
3ème jour : Filtrat	14.3 (\pm 1.6)		0.96, 14
eau brute		46.3 (\pm 6.1)	0.97, 14
7ème jour : Filtrat	20.1 (\pm 2.9)		0.96, 11
eau brute		15.7 (\pm 3.7)	0.96, 13

Tableau 8. Constantes de partition déterminées pour les algues monocellulaires et les produits de dégradation du Viadox® en réacteurs. D'après Gourlay *et al.* (2005a).

A partir des valeurs du Tableau 7 et du Tableau 8, il est possible de simuler la répartition du B(a)P entre les compartiments « dissous libre », « dissous associé à la matière organique » et « associé à la matière organique particulaire » pour des milieux types. Cette vision est macroscopique et repose sur des estimations biologiques. On pourrait donc tout aussi bien employer les termes « biodisponible », « dissous non biodisponible » et « particulaire non biodisponible ». Pour établir le Tableau 9 et la Figure 45, on formule les hypothèses simplificatrices suivantes : les eaux usées sont représentées par le substrat Viadox®, les eaux traitées sont représentées par ce substrat lorsqu'il a subi une dégradation complète en réacteurs. La Seine à l'aval de Paris est représentée également comme de l'eau traitée, en adoptant les valeurs de carbone organique dissous et particulaire de Servais *et al.* (1999). Enfin, on décrit une rivière eutrophe, en début et en fin de floraison, comme une culture d'algues monocellulaires de concentration équivalente, fraîche ou bien fanée.

	1) Eaux usées	2) Eaux traitées	3) La Seine en aval de Paris
DOC, pK_{DOC}	43 mgC/L, $pK = 4,8$	10 mgC/L, $pK = 5,5$	5,5 mgC/L, $pK = 5,5$
POC, pK_{POC}	187 mgC/L, $pK = 5,7$	20 mgC/L, $pK = 5,2$	5,2 mgC/L, $pK = 5,2$
	4) rivière eutrophe (début de bloom)	5) rivière eutrophe (fin de bloom)	
DOC, pK_{DOC}	6 mgC/L, $pK = 5,1$	3 mgC/L, $pK = 5,5$	
POC, pK_{POC}	6 mgC/L, $pK = 6,0$	3 mgC/L, $pK = 6,0$	

Tableau 9. Description de quelques matrices aquatiques typiques en termes de matière organique, dissoute et particulaire, et de constantes de partition vis à vis du B(a)P (estimées par bioaccumulation pendant quatre heures).

Ces hypothèses posées (Tableau 9), on obtient les répartitions suivantes (Figure 45) pour le B(a)P dans ces différents milieux qui ont en commun d'être fortement soumis à l'influence anthropique. Selon l'Equation 1, cette répartition ne dépend pas de la concentration en B(a)P. On observe que la biodisponibilité du B(a)P (représentée par le quartier blanc) est très variable, d'un milieu à l'autre, le maximum étant atteint pour les eaux les plus « humifiées », c'est à dire la Seine à l'aval de Paris, ou la rivière eutrophe après dégradation du bloom. Au contraire, le B(a)P est très peu biodisponible dans les eaux usées brutes. L'évaluation du risque lié au B(a)P en milieu aquatique nécessite donc, non seulement de prendre en compte la présence de matière organique, dissoute et particulaire, mais également son origine et son devenir à court terme. L'inclusion d'une variable « B(a)P » dans le modèle Prose dans les

mois qui viennent à pour objectif de quantifier l'importance relative et la variabilité spatio-temporelle des micro-polluants associés à ces différentes fractions de matière organique.

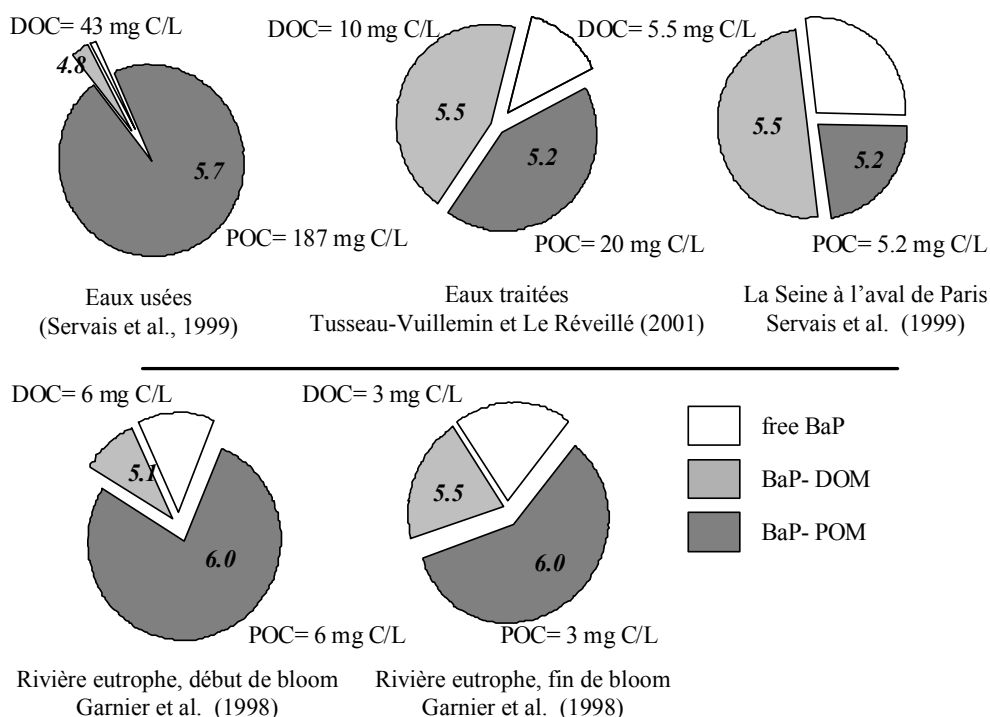


Figure 45. Répartition théorique du B(a)P entre les phases aqueuse, matière organique dissoute et particulaire, estimées à partir des caractéristiques du Tableau 9. D'après Gourlay (2004). En italique sont indiquées les constantes de partition pour ces différentes phases (en log).

Conclusions et perspectives.

Les métaux et les hydrocarbures aromatiques polycycliques représentent deux classes de contaminants typiques des eaux urbaines et figurent en bonne place dans les diverses listes de substances dangereuses de la nouvelle directive cadre européenne sur l'eau. La première étape nécessaire à l'évaluation du risque qu'ils constituent dans les eaux urbaines consiste à se doter d'outils chimiques et biologiques permettant d'établir leur biodisponibilité dans un milieu réputé complexe. Le travail de Rémy Buzier sur le Gradient de Diffusion en couche mince, celui des équipes du CERREVE et du Cemagref de Lyon sur les membranes semi-perméables ont démontré le potentiel que représente la nouvelle génération d'échantillonneurs passifs dans ce domaine. C'est probablement du côté des modèles biologiques que se situe désormais l'enjeu méthodologique, pour obtenir une meilleure sensibilité tout en conservant la robustesse nécessaire à l'utilisation dans des eaux usées.

L'originalité de notre approche tient à la prise en compte des spécificités de la matière organique qui accompagne les métaux et les hydrocarbures dans les rejets urbains. Sans chercher à en faire l'inventaire, nous caractérisons cet ensemble de molécules diverses par leur réactivité vis à vis de la biodégradation. Ces substances représentent en effet un ensemble beaucoup plus « jeune » et biodégradable que celles que l'on retrouve dans les cours d'eau de tête de bassin et que l'on assimile souvent aux substances humiques. Nos

résultats montrent que la matière organique issue des rejets urbains possède une capacité de modulation de la biodisponibilité des micro-polluants sensiblement différente de celle des substances humiques, plus classiquement étudiées. Cette capacité est plutôt moins importante, et de plus susceptible d'évoluer avec la biodégradation.

L'évaluation du risque écotoxicologique lié aux rejets urbains devrait prendre en compte ce potentiel de modulation, non pas dans l'objectif à trop court terme de minimiser l'impact instantané des micro-polluants, mais au contraire pour souligner l'instabilité de cette « protection » de l'écosystème par une matière organique biodégradable. Alors que l'essentiel de la littérature consacrée à la question de la biodisponibilité des micro-polluants en milieu aquatique repose sur des études thermodynamiques d'équilibre, il apparaît maintenant que l'évaluation du risque in situ est probablement contrôlée par des processus à la dynamique transitoire (mélange, biodégradation, échange de ligands), malheureusement plus complexes à aborder.

Conclusion générale.

Les flux de matière organique et leurs impacts sur le milieu aquatique ont été abordés avec des approches numériques, expérimentales, et dans des environnements de dimensions caractéristiques très variables. Les questions posées, elles aussi très différentes (l'origine, la biodégradation, ou encore les interactions de la matière organique avec les micro-polluants) amènent cependant à quelques conclusions communes.

Tout d'abord, on retiendra une certaine homogénéité des modèles, notamment en ce qui concerne le couplage de la dynamique bactérienne avec son substrat et la synthèse de matière organique. Il ne s'agit peut-être que du reflet d'une certaine pauvreté conceptuelle des représentations biogéochimiques, qui reposent en effet le plus souvent sur des équations paramétriques très générales. Les limites de pertinence et d'utilisation de ces modèles sont donc avant tout celles de l'identifiabilité et de la validation des paramètres qui les sous-tendent. L'utilisation de modèles similaires dans des environnements très différents en dimensions spatio-temporelles et en concentrations nous a permis de mettre en évidence le lien entre les conditions d'études et l'identifiabilité relative des paramètres. Ceci relativise l'apparente et séduisante généralisation des concepts de modélisation.

Les processus de biodégradation et de recyclage de la matière organique, ainsi que les sous-produits qui les accompagnent (produits microbiens solubles, matière organique réfractaire, etc...) sont également au cœur de ces différentes problématiques. Or, si l'on paramétrise facilement la dégradation de la matière organique labile dans les stations d'épuration, en présence de fortes quantités de biomasse, il est plus difficile de décrire les processus plus lents, et la nature des molécules subsistantes ou formées au cours de la dégradation. Dans le milieu naturel, c'est pourtant ces processus lents qui vont contrôler la possible séquestration de carbone organique dans les sédiments, ou au contraire son exportation vers l'aval. C'est également par ces molécules lentement biodégradables que seront majoritairement convoyés les micro-polluants, dont la biodisponibilité pourra être altérée.

Enfin, on pourrait encore faire le parallèle entre les cinétiques lentes et les expositions chroniques, la matière organique réfractaire et les substances pérennes dans le milieu aquatique... pour conclure qu'en biogéochimie comme en éco-toxicologie, la palette du chercheur comporte désormais plus de demi-teintes que de couleurs vives et que c'est tout en nuances que s'aborde l'étude de l'environnement !

Perspectives.

Finally, ce parcours atypique et sinueux, qui va de l'océanographie à l'écotoxicologie des eaux urbaines, a ses aspects positifs... Certes, les mobilités thématiques ne sont pas aussi faciles à valoriser que les carrières strictement disciplinaires, au moins à court terme, mais dans le domaine de l'environnement, elles devraient presque être obligatoires ! En effet, même s'il est devenu terriblement banal de dire que les sciences de l'environnement sont par essence pluridisciplinaires, il reste tout aussi rare, voire difficile, de pratiquer cette pluridisciplinarité.

Mon projet général est de contribuer à la compréhension de l'impact des micro-polluants sur la biosphère aquatique, c'est à dire de faire le lien entre un environnement physico-chimique et une réponse biologique. En termes de demande sociale, ce projet s'adosse à l'évolution de la réglementation européenne sur l'eau, qui vise à améliorer l'état écologique des cours d'eau par une gestion raisonnée à l'échelle du bassin versant. De plus, en se concentrant sur l'interface environnement physico-chimique / organismes vivants, ce projet relève également des grands axes de recherche sollicités au travers du Plan National Santé Environnement. En effet, la compréhension des modes de transfert entre l'eau, vecteur quasi-universel des micro-polluants, et la sphère biologique, constitue une première étape vers l'évaluation de leur impact sur la santé humaine, même si les voies de contamination sont différentes.

Cette problématique se décline en trois axes principaux, de la mise au point méthodologique à l'évaluation intégrée de l'écosystème dans son environnement.

Méthodologie pour l'évaluation de la réponse biologique.

D'un point de vue plus technique, il me semble que l'effort méthodologique doit maintenant porter sur l'évaluation de la réponse biologique à la modification physico-chimique de son environnement. Ce terme est utilisé au sens très large d'une observation réalisée à partir d'un organisme vivant, en conditions contrôlées de laboratoire comme en conditions environnementales.

1 Des méthodes plus sensibles.

Des modèles suffisamment sensibles doivent être obtenus, adaptés à chacune des problématiques envisagées. Par exemple, pour évaluer la biodisponibilité des métaux aux faibles doses, les D.E.A. d'Aurélie Pelfrène (2004) puis de Daniel Ferreira (2005) ont permis de mettre au point un mode opératoire très sensible pour le cuivre, reposant sur la bioaccumulation dans les bryophytes. Avec cette méthode, la biodisponibilité du cuivre dans des milieux contaminés à hauteur de 1µg/L peut être évaluée, ce qui est tout à fait cohérent avec les niveaux environnementaux et permettra donc d'aborder réellement la question de l'impact de la matière organique dissoute, quelle soit d'origine phytoplanctonique, humique ou urbaine... Ce travail de mise au point constitue la première partie du projet CRIQUALADIM³⁴, financé par le ministère du Développement Durable et de l'Environnement dans son programme PNETOX sur la période 2005-2008. L'objectif de ce projet est de relativiser la contribution des différentes fractions de métaux (labile, dissous ou particulaire) à la contamination biologique. Bien qu'il soit connu que pour les organismes autotrophes, la fraction labile soit la plus dangereuse, doit-on vraiment négliger la contamination des organismes supérieurs par ingestion de particules enrichies ? Peut-on définir des critères de qualité au moyen de concentration en métal labile ? Ce projet réunit

³⁴ CRIères de QUALité pour les eaux de surface : métaux LABiles, DIssous, ou associés aux Matières en suspension ?, coordonné par moi-même.

deux équipes du Cemagref (des biologistes de Lyon et des chimistes à Antony), ainsi que le LNHE (EDF, site de Chatou).

2 Lien entre concentration interne et effets.

De façon générale, fonder l'analyse de la réponse biologique sur la bioaccumulation permet d'abaisser les niveaux de détection et de suivre un contaminant en particulier, mais ne permet pas de conclure quant à l'effet sur l'organisme. Pour aller plus loin dans l'analyse, une piste consiste à chercher à localiser les contaminants dans l'organisme pour comprendre et anticiper leur impact. C'est l'un des axes de recherche de l'équipe du Cemagref de Lyon (Laboratoire d'écotoxicologie, Jeanne Garric), qui sera également décliné dans mon équipe par Isabelle Chardon, dans le cadre de son mémoire d'ingénieur du CNAM en 2006. Il s'agit d'utiliser des sondes fluorescentes spécifiques des métaux cationiques pour visualiser leur bioaccumulation dans les daphnies, au moyen d'un microscope confocal permettant d'explorer l'organisme en trois dimensions avec une bonne précision. Les potentialités de cette technique, utilisée jusqu'à présent dans d'autres contextes (biologie humaine), restent à explorer pour l'écotoxicologie.

3 Prise en compte des régulations biologiques.

Enfin, une autre façon d'améliorer l'ordinaire de la bioaccumulation consiste encore à utiliser le concept de « biodynamique ». Il s'agit simplement de constater que les organismes possèdent tous des capacités de régulation de la contamination, qui s'expriment de façon plus ou moins efficace. Une première évaluation de ces capacités en conditions contrôlées permet ensuite d'interpréter les différentes contaminations observées, et de faire le lien avec la chimie du milieu. On cherchera en particulier à analyser le rôle de la matière organique, qui module la biodisponibilité tout en fournissant une source d'énergie aux micro-organismes. C'est aussi une manière d'aborder la question très complexe de la multi-contamination : la présence de plusieurs micro-polluants, à des niveaux même faibles, est-elle de nature à inhiber certaines des fonctions régulatrices des organismes, et donc de les fragiliser vis à vis de la pollution dominante? Ces aspects seront abordés, à partir de novembre 2005, par Bastien Pellet, IGRF en formation complémentaire par la recherche dans mon équipe (2005-2008).

Evaluation de l'environnement.

1 Echantillonneurs passifs et biodisponibilité.

Les outils développés comme capteurs passifs et intégratifs de micro-polluants sont destinés à être utilisés dans des environnements aquatiques variés. Dans le cadre du projet PIREN Seine, nous avons déjà déployé des membranes de diffusion semi-perméables et des systèmes de gradient de diffusion en couche mince à différentes stations du bassin versant. La prochaine phase du programme comprendra vraisemblablement une analyse du gradient d'urbanisation de l'agglomération parisienne, depuis le centre de Paris jusqu'au bassin de l'Orgeval, au cours de laquelle ces techniques seront encore mises à profit pour un suivi exhaustif du milieu. Ces aspects constituent le projet SISTEO³⁵, financé par la région Ile de France dans le cadre de son programme de recherche sur le développement durable, pour une durée de cinq ans (2005-2010). Une attention particulière sera portée à la nature de la matière organique présente dans ces différents milieux, ainsi qu'à la distribution des contaminants selon l'usage du territoire. Les travaux de Catherine Gourlay et Rémy Buzier ont en effet mis en évidence les

³⁵ Hydro-écologie d'un territoire urbain : reflets du développement durable en Ile de France, coordonné par Jean-Marie Mouchel.

particularités de la matière organique d'origine urbaine pour la modulation de la biodisponibilité. Il s'agit maintenant d'utiliser ces résultats expérimentaux pour l'interprétation d'observations dans un environnement complexe.

2 Organismes modèles pour le suivi du milieu.

Les méthodes biologiques développées au laboratoire pour être comparées aux mesures chimiques ne sont pas toujours directement utilisables dans l'environnement aquatique, même si elles permettent d'en analyser les processus. Il est difficile par exemple d'exposer des daphnies en rivière, surtout sur des durées de plusieurs jours. La bioaccumulation des métaux dans les bryophytes, réputée depuis plusieurs années comme un indicateur fiable de contamination biodisponible, se révèle sensible aux variations de température, de composition cationique du milieu... et finalement assez difficilement interprétable. Ces aspects seront abordés au cours d'une thèse, financée par EDF au LNHE de Chatou³⁶, en collaboration avec le Cemagref et le CEREGE, débutant début 2006. Il s'agit de développer l'équivalent d'un modèle du ligand biologique pour l'accumulation des métaux dans les bryophytes et d'apprécier l'apport de la technique du gradient de diffusion en couche mince pour le suivi du cuivre biodisponible. D'autres perspectives seront également ouvertes par la thèse de Bastien Pellet, qui étudiera d'autres organismes modèles, invertébrés hétérotrophes, sous l'angle de leur capacité à refléter à la fois l'état écologique du milieu et sa contamination chimique.

Réponse écologique intégrée du milieu.

Enfin, le vrai défi consiste toujours à interpréter le milieu vivant aquatique, tel qu'il se donne à voir, en fonction de ses caractéristiques chimiques. Le lien entre la contamination chimique d'un milieu et la réponse écologique résiste à l'interprétation immédiate, probablement du fait des stress multiples occasionnés par la pression anthropique, mais aussi du fait de notre mauvaise estimation de l'adaptabilité des écosystèmes. L'extrapolation aux conditions naturelles des relations dose-effet observées en laboratoire reste un verrou scientifique majeur face auquel biologistes, écotoxicologues et géochimistes avouent encore malheureusement leur impuissance³⁷... De nouvelles techniques, issues de la biologie moléculaire, permettent depuis peu d'aborder l'adaptation des populations, les mutations génétiques, de façon de plus en plus précoce avec la protéomique... Ces outils constituent des pistes séduisantes pour rendre compte de la réalité actuelle des milieux aquatiques, artificialisés et contaminés de multiples façons mais l'utilisation même des résultats auxquels ils conduisent constitue une perspective de recherche.

Il s'agit de rendre compte de la réponse biologique à faibles mais multiples doses, qui est forcément très complexe. Comment expliquer sinon que, dans des environnements très pollués, survivent des organismes très contaminés ? Ces organismes expriment-ils une toxicité bien qu'ils survivent ? La protéomique (l'analyse de l'induction de la synthèse de protéines en réponse à des stress) permettra-t-elle d'en rendre compte ? La réponse naturelle dépasse souvent notre compréhension actuelle et appelle à beaucoup de créativité pour développer les outils pertinents d'évaluation. La question de l'acceptabilité environnementale ne peut être posée qu'en fonction de ces nouveaux critères.

³⁶ « Intégration du concept de biodisponibilité dans l'évaluation du risque environnemental de métaux (Cu, Cd) en milieu aquatique : complémentarité des outils de diagnostic et de modélisation »

³⁷ cf. le thème du dernier congrès européen de la SETAC (mai 2005, Lille) : « the raison d'être of Environmental Toxicology and Chemistry in a changing world... »

Références.

F. Abrantes et M. Moita. (1999) Water column and recent sediment data on diatoms and coccolithophorids, off Portugal, confirm sediment record of upwelling events. *Oceanologica Acta* **22**(3), 318-336.

M. Akkanen et J. Kukkonen. (2003) Measuring the bioavailability of two hydrophobic organic compounds in the presence of dissolved organic matter. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**, 518-524.

C. Albérola, C. Millot et J. Font. (1995) On the seasonal and mesoscale variabilities of the Northern Current during the PRIMO-0 Experiment in the western Mediterranean. *Oceanologica Acta* **18**, 163-192.

B. Allard, J. Templier et C. Largeau. (1998) An improved method for the isolation of artifact-free algaenans from micro-algae. *Organic Geochemistry* **28**(9/10), 543-548.

M. A. Anderson, F. M. M. Morel et R. R. L. Guillard. (1978) *Nature* **276**, 70-71.

A. S. Ayoub, B. A. McGaw, C. A. Shand et A. J. Midwood. (2003) Phytoavailability of Cd and Zn in soil estimated by stable isotope exchange and chemical extraction. *Plant and Soil* **252**(2), 291-300.

D. J. Barker, G. A. Mannuchi, S. M. L. Salvi et d. C. Stuckey. (1999) Characterisation of soluble residual chemical oxygen demand (COD) in anaerobic wastewater treatment effluents. *Water Research* **33**(11), 2499-2510.

S. Barles, P. Benoit, K. Berthier, G. Billen, P. Boët, F. Boyer, D. Brunstein, J. Garnier, A. Guillerm, L. Lestel et M. Meybeck. (2001) Analyse rétrospective du fonctionnement du système Seine. rapport de synthèse 1998-2001, PIREN-Seine, Paris. 52 pages.

G. E. Batley, S. Apte et J. L. Stauber. (2004) Speciation and Bioavailability of trace metals in water: progress since 1982. *Australian Journal of Chemistry* **57**, 903-919.

M. I. Beach, J. Beach et F. Cadeno. 1995. *Respirometric methods for rapid toxicity/inhibition assessment of industrial water*. Presented at 50 th Purdue Industrial Waste Conference

B. Bellanger, S. Huon, P. Steinmann, F. Chabaux, F. Velasquez, V. Valles, K. Arn, N. Clauer et A. Mariotti. (2004) Oxic-anoxic conditions in the water column of a tropical freshwater reservoir (Pena-Larga dam, NW Venezuela). *Applied Geochemistry* **19**(8), 1295-1314.

M. E. Bender, W. R. Matson et R. A. Jordan. (1970) On the significance of metal complexing agents in secondary sewage effluents. *Environment Science and Technology* **4**(6), 520-521.

M. Bianchi, D. Marty, J. L. Teyssie et J. Fowler. (1992) Strictly aerobic and anaerobic bacteria associated with sinking particulate matter and zooplankton fecal pellets. *Marine Ecological Progress Series* **88**(1), 55-60.

Bioavailability of contaminants in soil and sediments. Processes, tools and application. 2003. Washington: National Academies press

T. H. Blackburn. 1993. Nitrogen cycling in the NW Mediterranean sediments. In *4th workshop EROS 2000*, ed. J.-M. Martin et H. Barth, pp. 225-229. Bruxelles: EC.

M. Block et A. W. Glynn. (1992) Influence of xanthates on the uptake of Cd-109 by eurasian dace (*phoxinus-phoxinus*) and rainbow-trout (*oncorhynchus-mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **11**(6), 873-879.

P. Boët, J. Belliard, R. Berrebi-dit-Thomas et E. Tales. (1999) Multiple human impacts by the city of Paris on fish communities in the Seine river basin, France. *Hydrobiologia* **410**, 59-68.

M.-P. Bonnet, C. O'Riordan, K. Soetaert, K. Buis, M.-H. Tusseau-Vuillemin, L. Mortier et J. J. Middelburg. 2000. *Pelagic/Benthic Coupled 3D Modeling of Carbon and*

Nitrogen Cycling in the Gulf of Lions (NW Mediterranean Sea): the Role of Sediments. Presented at Ocean Sciences Meeting, San Antonio, Texas.

U. Borgmann et K. M. Ralph. (1983) Complexation and toxicity of copper and the free metal bioassay technique. *Water Research* **17**(11), 1697-1703.

H. Brouwer, A. Klapwijk et K. J. Keesman. (1998) Identification of activated sludge wastewater characteristics using respirometric batch experiments. *Water Research* **32**(4), 1240-1254.

J. A. Buckley. (1983) Complexation of copper in the effluent of a sewage treatment plant and an estimate of its influence on toxicity to *coho salmon*. *Water Research* **17**(12), 1029-1034.

J. Buffle et G. G. Leppard. (1995) Characterization of aquatic colloids and macromolecules, 1: structure and behavior of colloidal material. *Environmental Science and Technology* **29**, 2169-2175.

R. Buzier, M.-H. Tusseau-Vuillemin, J. Garric et J.-M. Mouchel. 2003. *Dgt as a tool for the assessment of bioavailable metals in wastewaters*. Presented at European Meeting on Environment and Chemistry, Plymouth.

P. G. C. Campbell. 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms : a critique of the Free Ion Activity Model. In *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*, ed. A. Tessier et D. R. Turner, pp. 45-102: John Wiley & sons Ltd.

P. G. C. Campbell, O. Errécalde, C. Fortin, V. P. Hiriart-Baer et B. Vigneault. (2002) Metal bioavailability to phytoplankton-applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **33**, 189-206.

P. G. C. Campbell, M. R. Twiss et K. J. Wilkinson. (1997) Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells: implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* **54**, 2543-2554.

A. Chesterikoff, D. Thévenot, J.-M. Mouchel, M. Poulin, B. Garban et D. Ollivon. 1998. Le fleuve dans la ville. In *La Seine en son bassin*, ed. M. Meybeck, G. De Marsily et E. Fustec, pp. 301-344. Paris: Elsevier.

P. Chudoba, B. Capdeville et J. Chudoba. (1992) explanation of biological meaning of the S0/X0 ratio in batch cultivation. *Water Science and Technology* **26**(3-4), 743-751.

W. Davison. (1978) Defining the electroanalytically measured species in a natural water sample. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **87**, 395-404.

W. Davison et H. Zhang. (1994a) In situ speciation measurements of trace components in natural-waters using thin-film gels. *Nature* **367**(february), 546-548.

W. Davison et H. Zhang. (1994b) In-Situ Speciation Measurements of Trace Components in Natural-Waters Using Thin-Film Gels. *Nature* **367**(6463), 546-548.

H. G. De Jong et H. P. Van Leeuwen. (1987) Voltammetry of metal complex systems with different diffusion coefficients of the species involved. Part II : Behaviour of the limiting current and its dependence on association/dissociation kinetics and lability. *Journal of Electroanalysis* **234**, 17-29.

K. A. C. De Schamphelaere et C. R. Janssen. (2002) A Biotic Ligand Model predicting acute copper toxicity for *Daphnia magna* : the effects of calcium, magnesium, sodium, potassium and pH. *Environmental Science and Technology* **36**(1), 48-54.

K. A. C. De Schamphelaere, J. L. Stauber, K. L. Wilde, S. J. Markich, P. L. Brown, N. M. Franklin, N. M. Creighton et C. R. Janssen. (2005) Toward a Biotic Ligand Model for Freshwater Green Algae: Surface-Bound and Internal Copper are better predictors of toxicity than Free Cu²⁺ -Ion Activity when pH is varied. *Environmental Science and Technology* **in press**.

- L. Denis et C. Grenz. (2003) Spatial variability in oxygen and nutrient fluxes at the sediment-water interface on the continental shelf in the Gulf of Lions. *Oceanologica Acta* **26**(4), 373-389.
- A. Denis-Karafistan, J.-M. Martin, H. Minas, P. Brasseur, J. Nihoul et C. Denis. (1998) Space and seasonal distributions of nitrates in the Mediterranean Sea derived from a variational inverse model. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers* **45**(2-3), 387-408.
- A. Devol. (1991) Direct measurement of nitrogen gas fluxes from continental shelf sediments. *Nature* **349**, 319-321.
- D. M. Di Toro, H. A. Allen, H. L. Bergman, J. M. Meyer, P. R. Paquin et R. C. Santore. (2001) Biotic Ligand Model of the acute toxicity of metals. A. Technical basis. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(10), 2383-2396.
- M.-F. Dignac, S. Derenne, P. Ginestet, A. Bruchet, H. Knicker et C. Largeau. (2000a) Determination of structure and origin of refractory organic matter in bio-epurated wastewater via spectroscopic methods. Comparison of conventional and ozonation treatments. *Environmental Science and Technology* **34**(16), 3389-3394.
- M.-F. Dignac, P. Ginestet, D. Rybacki, A. Bruchet, V. Urbain et P. Scribe. (2000b) Fate of wastewater organic pollution during activated sludge treatment : Nature of residual organic matter. *Water Research* **34**(17), 4185-4194.
- J. Dispan, J.-M. Mouchel, I. Charpentier et P. Servais. (soumis) Acetate degradation by a non-cultivated primary sludge, I. A methodology to assess model parameters. *Water Research*.
- D. Dochain, P. A. Vanrolleghem et M. Van Daele. (1995) Structural identifiability of biokinetics models of activated sludge respiration. *Water Research* **11**, 2571-2578.
- A. J. Downard, J. Panther, Y. C. Kim et K. J. Powell. (2003) Lability of metal ion-fulvic acid complexes as probed by FIA and DGT: a comparative study. *Analytica Chimica Acta* **499**(1-2), 17-28.
- G. Dubreuil, M. Prévost, R. Desjardins et R. G. Mac Lean. (1997) Bioreactors for the rapid determination of biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) in drinking water: feed mode impact. *Environmental Technology* **18**, 363-374.
- V. Echevin, M. Crépon et L. Mortier. (2003a) Analysis of a mesoscale circulation in the North Western Mediterranean Sea simulated in the framework of the Mediterranean forecast System Pilot Project. *Annales of Geophysics* **21**(1), 281-297.
- V. Echevin, L. Mortier et M. Crépon. (2003b) Interaction of a coastal current with a gulf : application to the shelf circulation of the Gulf of Lions in the Mediterranean Sea. *Journal of Physical Oceanography* **33**(1), 188-206.
- G. A. Ekama et G. v. R. Marais. (1979) Dynamic behaviour of activated sludge process. *Journal of WPCF* **51**(3), 534-566.
- B. Escoffier et J. Pagès. (1988) *Analyses factorielles, simples et multiples*. Dunod, Paris.
- C. Estournel, X. Durrieu de Madron, P. Marsaleix, F. Auclair et R. Vehil. (2001) The Rhone river plume in unsteady conditions: numerical and experimental results. *Estuarine Coastal Shelf Science* **53**, 25-38.
- S. Even, M. Poulin, J. Garnier, G. Billen, P. Servais, A. Chesterikoff et M. Coste. (1998) River ecosystem modelling: application of the PROSE model to the Seine river (France). *Hydrobiologia* **374**, 27-45.
- S. Even, M. Poulin, J.-M. Mouchel, M. Seidl et P. Servais. (2004) Modelling oxygen deficits in the Seine River downstream of combined sewer overflows. *Ecological Modelling* **173**(2-3), 177-196.

M. J. R. Fasham, J. L. Sarmiento, R. D. Slater, H. W. Ducklow et R. Williams. (1993) Ecosystem behavior at station "S" and ocean weather station "India": A general circulation model and observational analysis. *Global Biogeochemical Cycles* **7**, 379-415.

B. Faugeras, M. Lévy, L. Memery, J. Verron, J. Blumm et I. Charpentier. (2003) Can biogeochemical fluxes be recovered from nitrate and chlorophyll data? a case-study assimilation data at the JGOFS-DYFAMED station. *Journal of Marine Systems* **40-41**, 99-125.

C. Faure et Y. Papegay. (1998) *Odyssee user's guide*. Rapport technique, *Rep. 0224*, INRIA, Versailles. 81 pages.

D. Ferreira. (2005) Comparaison des fractions labiles et biodisponibles du cuivre aux faibles niveaux de contamination. D.E.A. Sciences et Techniques de l'Environnement, Université Paris XII-val de marne, Créteil. 58 pages.

M. Fieux. 1972. Contribution à l'étude hydrologique et dynamique du Golfe du Lion en période hivernale., Faculté des Sciences de Paris, Paris. 90 pages.

N. Flipo, S. Even, M. Poulin, M.-H. Tusseau-Vuillemin, T. Améziane et A. Dauta. (2004) Biogeochemical modelling at the river scale : dynamics of phytoplankton and periphyton. *Journal of Ecological Modelling* **176**, 333-347.

C. Fortin et P. G. C. Campbell. (2000) Silver uptake by the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in relation to chemical speciation: Influence of chloride. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**(11), 2769-2778.

A. P. Freidig, E. Garicano et F. J. M. Busser. (1998) Estimating the impact of humic acid on the bioavailability and bioaccumulation of hydrophobic chemicals in guppies using kinetic solid-phase extraction. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**, 998-1004.

J. Garric, B. Vollat, D. K. N'Guyen, M. Bray, B. Migeon et A. Kosmala. (1996) Ecotoxicological and Chemical characterization of municipal treatment plant effluents. *Water Science and Technology* **33**(6), 83-91.

M. Gehlen, C. Rabouille, E. Ullah et L. Guidi-Guilvard. (1997) Drastic changes in deep-sea sediment porewater composition induced by episodic input of organic matter. *Limnology and Oceanography* **42**(5), 980-986.

K. Gernaey, M. C. M. Van Loosdrecht, M. Henze, M. Lind et B. Jorgensen. (2004) Activated sludge treatment plant modelling and simulation : state of the art. *Environmental Modelling and Software* **19**(9), 763-783.

J.-L. Gonzales. 2003. *Modélisation dynamique des contaminations chimiques*. Presented at Séminaire de lancement du projet MEDICIS, La Londe les Maures.

C. Gourlay. 2004. Biodisponibilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les écosystèmes aquatiques : influence de la matière organique naturelle et anthropique. doctorat, Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et des Forêts, Paris. 128 pages.

C. Gourlay, C. Miège, J. Garric, M.-H. Tusseau-Vuillemin et J.-M. Mouchel. (2002) The use of spectrofluorimetry for monitoring the bioaccumulation and biotransformation by *Daphnia magna*. *Journal of Polycyclic Aromatic Compounds* **22**(3-4), 501-516.

C. Gourlay, J.-M. Mouchel, M.-H. Tusseau-Vuillemin et J. Garric. (2005a) Influence of algal and bacterial particulate organic matter on benzo[a]pyrene bioaccumulation in *Daphnia magna*. *Science of the Total Environment* **346**, 220-230.

C. Gourlay, M.-H. Tusseau-Vuillemin, J. Garric et J.-M. Mouchel. (2003) Effect of dissolved organic matter of various origins and biodegradabilities on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**(6), 1288-1294.

C. Gourlay, M.-H. Tusseau-Vuillemin, J. Garric et J.-M. Mouchel. (2005b) The ability of dissolved organic matter (DOM) to influence benzo[a]pyrene bioavailability increases with DOM biodegradation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **61**, 74-82.

- A. Guillerme. (2003) 1780-1830 : l'âge du mercure., *Rep. 4-3-2*, PIREN-Seine, Paris. 1-16.
- W. Gujer, M. Henze, T. Mino et M. Van Loosdrecht. (1999) Activated sludge Model n°3. *Water Science and Technology* **39**(1), 183-193.
- J. W. Guthrie, N. M. Hassan, M. S. A. Salam, Fafous, II, C. A. Murimboh, J. Murimboh, C. L. Chakrabarti et D. C. Gregoire. (2005) Complexation of Ni, Cu, Zn, and Cd by DOC in some metal-impacted freshwater lakes: a comparison of approaches using electrochemical determination of free-metal-ion and labile complexes and a computer speciation model, WHAM V and VI. *Analytica Chimica Acta* **528**(2), 205-218.
- M. Haitzer, M. Akkanen, C. E. W. Steinberg et J. Kukkonen. (2001) No enhancement in bioconcentration of organic contaminants by low levels of DOM. *Chemosphere* **44**, 165-171.
- M. Haitzer, B. K. Burnison, S. Höss, W. Traunspurger et C. E. W. Steinberg. (1999b) Effects of quantity, quality, and contact time of dissolved organic matter on bioconcentration of benzo(a)pyrene in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**(3), 459-465.
- M. Haitzer, S. Höss, W. Traunspurger et C. Steinberg. (1999a) Relationship between concentration of dissolved organic matter and the effect of DOM on the bioconcentration of benzo(a)pyrene. *Aquatic Toxicology* **45**, 147-158.
- M. A. Head et J. A. Oleszkiewicz. (2004) Bioaugmentation for nitrification at cold temperatures. *Water Research* **38**(3), 523-530.
- J. Hedges, J. Baldock, Y. Gelinas, C. Lee, M. Peterson et S. Wakeham. (2001) Evidence for non-selective preservation of organic matter in sinking marine particles. *Nature* **409**(6822), 401-404.
- J. I. Hedges, G. Eglinton, P. G. Hatcher, D. L. Kirchman, C. Arnosti, S. Derenne, R. P. Evershed, I. Kogel-Knabner, J. W. de Leeuw et R. Littke. (2000) The molecularly-uncharacterized component of nonliving organic matter in natural environments. *Organic Geochemistry* **31**, 945-958.
- C. H. R. Heip, G. Duineveld, E. Flach, G. Graf, W. Helder, P. M. J. Herman, M. Lavaleye, J. J. Middelburg, O. Pfannkuche, K. Soetaert, T. Soltwedel, H. De Stigter, L. Thomsen, J. Vanaverbeke et P. De Wilde. (2001) The role of the benthic biota in sedimentary metabolism and sediment-water exchange processes in the Goban Spur area (NE Atlantic). *Deep-sea research. Part 2. Topical studies in oceanography* **48**(14-15), 3323-3243.
- M. Henze. (1992) Characterization of wastewater for modelling of activated sludge process. *Water Science and Technology* **25**(6), 1-15.
- M. Henze, C. Grady, W. Gujer, G. Marais et T. Matsuo. (1987) Activated Sludge Model n°1. Scientific and technical report, *Rep. 1*, IWA. 33 pages.
- C. Herbaut, L. Mortier et M. Crépon. (1996) A sensitivity study of the general circulation of the western Mediterranean Sea, Part I, The response to density forcing through the straits. *Journal of Physical Oceanography* **26**, 65-84.
- J. Huthnance. (2002) Wind-driven circulation in coastal and marginal seas. *Canadian Journal of Remote Sensing* **28**(3), 329-339.
- A. Imai, T. Fukushima, K. Matsushige et 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 Research* **35**(17), 4019-4028.
- L. A. Kaplan et J. D. Newbold. (1995) Measurement of streamwater biodegradable dissolved organic carbon with a plug-flow bioreactor. *Water Research* **29**(12), 2696-2706.
- J. Kappeler et W. Gujer. (1992) estimation of heterotrophic parameters under aerobic conditions and characterization of wastewater for activated sludge modelling. *Water Science and Technology* **25**, 125-39.

- J. Kim et R. Schneider. (2003) Low-latitude control of interhemispheric sea-surface temperature contrast in the tropical Atlantic over the past 21 kyears: the possible role of SE trade winds. *Climate Dynamics* **21**(3-4), 337-347.
- J. Kukkonen et J. Pellinen. (1994) Binding of organic xenobiotics to dissolved organic macro-molecules : comparison of analytical methods. *The Science of the Total Environment* **152**, 19-29.
- L. Lagadic et W. Ahlf. 2005. The "raison d'être" of Environmental Toxicology and Chemistry. In *SETAC - GLOBE*, pp. 1-4.
- F. Lagarde. 2003. Modélisation et optimisation du traitement de l'azote et du carbone par boues activées avec aération séquencé en temps de pluie à différentes températures. doctorat, Paris XII val de Marne.
- F. Lagarde, M.-H. Tusseau-Vuillemin, P. Lessard et A. Héduit. (en prép.) Full scale calibration and long term evaluation of ASM1. *Environmental Modelling and Software*.
- F. Lagarde, M.-H. Tusseau-Vuillemin, P. Lessard et A. Héduit. (soumis) Assessing chemical oxygen demand and nitrogen mass transfers in a multi-stage activated sludge plant. *Environmental Modelling and Software*.
- F. Lagarde, M.-H. Tusseau-Vuillemin, P. Lessard, J.-M. Mouchel, F. Dutrop et A. Héduit. (in press) Variability estimation of urban wastewater biodegradable fractions by respirometry. *Water Research*.
- P. F. Landrum, M. D. Reinhold, S. R. Nihart et B. J. Eadie. (1985) Predicting the bioavailability of organic xenobiotics to *Pontoreia hoyi* in the presence of humic and fulvic materials and natural dissolved organic matter. *Environmental Toxicology and Chemistry* **4**, 459-467.
- C. S. Lapidou et B. E. Rittman. (2002) A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Research* **36**, 2711-2720.
- M. Laugier, L. Mortier et I. Dekeyser. (1994) A bidomain primitive equation model. *Oceanologica Acta* **17**(4), 355-367.
- F. Laurier. 2001. Cycle du mercure en estuaire, baie de Seine et pays de Caux : spéciation et biodisponibilité. Thèse de doctorat, Paris VII-Denis Diderot, Paris. 177 pages.
- G. Le Réveillé et M.-H. Tusseau-Vuillemin. 2000. *Biodegradable Organic Matter in treated wastewaters of the Seine river basin*. Presented at 1st World Congress of the IAWQ, Paris.
- J. A. Leenheer et J.-P. Croué. (2003) Characterizing Aquatic Dissolved Organic Matter. *Environmental Science and Technology* **19A**(1), 1A-26A.
- M. J. Lehtola, I. T. Miettinen, T. Variainen, T. Myllykangas et P. J. Martikainen. (2001) Microbially available organic carbon, phosphorus, and microbial growth in ozonated drinking water. *Water Research* **35**(7), 1635-1640.
- P.-M. Lehucher, L. Beautier, M. Chartier, F. Martel, L. Mortier, P. Brehmer, C. Millot, C. Albérola, M. Benzhora, I. Taupier-Letage, G. C. Dhieres, H. Didelle, P. Gleizon, D. Obaton, M. Crépon, C. Herbaut, G. Madec, S. Speich, J. Nihoul, J.-M. Beckers, P. Brasseur, E. Deleersnijder, S. Djenidi, J. Font, A. Castellon, E. Garcialadona, M. J. Lopezgarcia, M. Manriquez, M. Maso, J. Salat, J. Tintore, S. Alonso, D. Gomis, A. Viudez, M. Astraldi, D. Bacciola, M. Borghini, F. Dellamico, C. Galli, E. Lazzoni, G. P. Gazsparini, S. Sparnocchia et A. Harzallah. (1995) Progress from 1989 to 1992 in understanding the circulation of the western Mediterranean Sea. *Oceanologica Acta* **18**(2), 255-271.
- L. Lestel. (2004) Les cycles du plomb en France : 1818-1996., PIREN-Seine, Paris. 8 pages.

- K. K. Liu, L. Atkinson, C. T. A. Chen, S. Gao, J. Hall, R. W. Mac Donald, L. Talaue McManus et R. Quiñones. 2000. Exploring continental margin carbon fluxes on a global scale. In *EOS transactions*, pp. 641-644.
- L. Lohse, H. T. Kloosterhuis, W. Van Raaphorst et W. Helder. (1996) Denitrification rates as measured by the isotope pairing method and by the acetylene inhibition technique in continental shelf sediments of the North Sea. *Marine Ecological Progress Series* **132**, 169-179.
- F. Lucena, J. Frias et F. Ribas. (1990) A new dynamic approach to the determination of biodegradable dissolved organic carbon in water. *Environmental Technology* **12**, 343-347.
- H. Ma, H. E. Allen et Y. Yin. (2001) Characterization of isolated fractions of dissolved organic matter from natural waters and a wastewater effluent. *Water Research* **35**, 985-996.
- G. Madec, M. Chartier, P. Delecluse et M. Crépon. (1991) A three-dimensional numerical study of deep water formation in the northwestern Mediterranean Sea. *Journal of Physical Oceanography* **21**, 1349-1371.
- R. F. C. Mantoura, J.-M. Martin et R. Wollast. 1991. Introduction to the Dalhem workshop on Ocean Margin processes in Global Change. In *Ocean Margin processes in Global Change*, ed. R. F. C. Mantoura, J.-M. Martin et R. Wollast, pp. 1-4: John Wiley and sons.
- T. F. Marhaba, D. Van et R. L. Lippincott. (2000) Rapid identification of dissolved organic matter fractions in water by spectral fluorescent signatures. *Water Research* **34**(14), 3543-3550.
- J. Marsalek et Q. Rochford. 1999. *Toxicity of urban wet-weather pollution sources : stormwater and CSOs*. Presented at 8th international conference on urban storm drainage, Sydney, Australia.
- J.-C. Marty, J. Chiaverini et M. Pizay, B. (2002) Seasonal and interannual dynamics of nutrients and phytoplankton pigments in the western Mediterranean Sea at the DYFAMED time-series station (1991-1999). *Deep Sea Research II* **49**(11), 1965-1985.
- M. Meybeck. (2002) Riverine quality at the Anthropocene: Propositions for global space and time analysis, illustrated by the Seine river. *Aquatic Sciences* **64**, 376-393.
- S. Meylan, R. Behra et L. Sigg. (2004a) Influence of metal speciation in natural freshwater on bioaccumulation of copper and zinc in periphyton: a microcosm study. *Environmental Science and Technology* **38**(11), 3104-3111.
- S. Meylan, N. Odzak, R. Behra et L. Sigg. (2004b) Speciation of copper and zinc in natural freshwater: comparison of voltammetric measurements, diffusive gradients in thin films (DGT) and chemical equilibrium models. *Analytica Chimica Acta* **510**(1), 91-100.
- J. J. Middelburg, K. Soetaert et P. M. J. Herman. (1997) Empirical relationships for use in global diagenetic models. *Deep Sea Research I* **44**(2), 327-344.
- M. Mills, C. Ridame, M. Davey, J. Laroche et R. Geider. (2004) Iron and phosphorus co-limit nitrogen fixation in the Eastern Tropical North Atlantic. *Nature* **429**, 292-294.
- J.-C. Miquel, J. Fowler et J. La Rosa. (1993) Vertical particle fluxes in the Ligurian Sea. *Annales de l'institut océanographique* **69**, 107-110.
- H. A. C. Montgomery. (1967) The determination of biochemical oxygen demand by respirometric methods. *Water Research* **1**(1), 632-640.
- A. Morel et J.-M. André. (1991) Pigment distribution and primary production in the western Mediterranean as derived and modeled from coastal zone color scanner observations. *Journal of Geophysical Research* **96**, 12685-12698.
- F. M. M. Morel. (1983) *Principles of Aquatic Chemistry*. John Wiley & Sons, New York.

- F. M. M. Morel et N. M. Price. (2003) The biogeochemical cycles of trace metals in the oceans. *Science* **300**(May), 944-947.
- P. Namour et M. C. Müller. (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. *Water Research* **32**(7), 2224-2231.
- C. O'Riordan, K. Soetaert, M.-H. Tusseau-Vuillemin, L. Mortier, K. Buis et J. J. Middelburg. 1998. *Vertical and cross-shelf flux and recycling of carbon and nitrogen in Mediterranean coastal waters: a pelagic/benthic coupled modeling approach*. Presented at 2nd ELOISE annual conference, Huelva, Espagne.
- G. Pagenkopf. (1983) Gill surface interaction model for trace metal toxicity to fishes : role of complexation, pH and water hardness. *Environment Science and Technology* **17**, 342-347.
- L. Parent, M. R. Twiss et P. G. C. Campbell. (1996) Influences of natural dissolved organic matter on the interaction of aluminum with the microalgae *Chlorella*: a test of the free-ion model of trace metal toxicity. *Environmental Science and Technology* **30**(5), 1713-1720.
- R. D. Peinert, S. Fowler, J. La Rosa, J.-C. Miquel et J. L. Teysse. 1991. Vertical flux and microplankton assemblages in the Gulf of Lions. In *EROS 2000 3rd workshop on the north-west Mediterranean Sea*, ed. J.-M. Martin et H. Barth. Bruxelles: Commission of the European Communities.
- A. Pelfrene. (2004) Mesure du cuivre biodisponible en milieu naturel au moyen de bryophytes et de DGT (gradient de diffusion en couche mince). D.E.A. d'écotoxicologie, Université de Metz, Metz. 61 pages.
- H. Percherancier, B. Volat et B. Montuelle. (1996) Testing the biodegradability of wastewater treatment plant outfalls : role of bacteria inocula. *Water Science and Technology* **33**(6), 221-229.
- J. P. Pinheiro et H. P. Van Leeuwen. (2001) Metal Speciation and Bioavailability. 2. Radial diffusion effects in the microorganism range. *Environmental Science and Technology* **35**(5), 894-900.
- Plan National Santé Environnement(2004)., Ministère de la santé et de la protection sociale
Ministère de l'écologie et du développement durable
Ministère de l'emploi, du travail et de la cohésion sociale
Ministère délégué à la recherche, Paris. 88.
- J. E. Podolski. (1979) Cadmium bioaccumulation assays. Their relationship to various ionic equilibriums in Lake Superior water. *Environment Science and Technology* **13**(6), 701-706.
- P. Prunet, J.-F. Minster, V. Echevin et I. Dadou. (1996) Assimilation of surface data in a one-dimensional physical-biogeochemical model of the surface ocean .2. Adjusting a simple trophic model to chlorophyll, temperature, nitrate, and pCO₂ data. *Global Biogeochemical Cycles* **10**(1), 139-158.
- K. Quenea, S. Derenne, F. J. Gonzalez-Vila, A. Mariotti, J. N. Rouzaud et C. Largeau. (2005) Study of the composition of the macromolecular refractory fraction from an acidic sandy forest soil (Landes de Gascogne, France) using chemical degradation and electron microscopy. *Organic Geochemistry* **36**(8), 1151-1162.
- P. Raimbault. 2003. *La Méditerranée : du régional au global*. Presented at la Méditerranée sous surveillance : prévoir et agir, Toulon.
- P. Raimbault et X. Durrieu de Madron. (2003) Research activities in the Gulf of Lions (NW Mediterranean) within the 1997-2001 PNEC project. *Oceanologica Acta* **26**, 291-298.
- G. M. Rand, P. G. Wells et L. S. Mc Carthy. 1995. Introduction to Aquatic Toxicology. Effects, environmental fate and risk assesment., pp. 3-67: Taylor and Francis.

J. A. Raven et P. G. Falkowski. (1999) Oceanic sinks for atmospheric CO₂. *Plant Cell and Environment* **22**(6), 741-755.

P. Reichert. (2001) River Water Quality Model n°1, Case study ii. oxygen and nitrogen conversion processes in the river glatt (switzerland). *Water Science and Technology* **43**(5), 51-60.

C. Ridame et C. Guieu. (2002) Saharan input of phosphate to the oligotrophic water of the open western Mediterranean Sea. *Limnology and Oceanography* **47**(3), 856-869.

R. Riegman. (1995) Nutrient-related selection mechanisms in marine phytoplankton communities and the impact of eutrophication on the planktonic food web. *Water Science and Technology* **32**(4), 63-75.

A. I. Schärfer, R. T. Mauch, D. Waite et A. G. Fane. (2002) Charge Effects in the Fractionation of Natural Organics Using Ultrafiltration. *Environmental Science and Technology* **36**(12), 2572-2580.

P. Servais, A. Barillier et J. Garnier. (1995) Determination of the biodegradable fraction of dissolved and particulate organic carbon in waters. *Annals Limnology* **31**, 75-80.

P. Servais, G. Billen et M.-C. Hascoët. (1987) Determination of the biodegradable fraction of dissolved organic matter in waters. *Water Research* **21**(4), 445-450.

P. Servais, J. Garnier, N. Demarteau, N. Brion et G. Billen. (1999) Supply of organic matter and bacteria to aquatic ecosystems through waste water effluents. *Water Research* **33**(16), 3521-3531.

V. I. Slaveykova, K. J. Wilkinson, A. Ceresa et E. Pretsch. (2003) Role of fulvic acid on lead bioaccumulation by *Chlorella kesslerii*. *Environmental Science & Technology* **37**(6), 1114-1121.

K. Soetaert, P. M. J. Herman et J. J. Middelburg. (1996) A model of early diagenetic processes from the shelf to abyssal depths. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **60**(6), 1019-1040.

K. Soetaert, P. M. J. Herman et J. J. Middelburg. (1997) Mixing characteristics of the water column in the Goban spur shelf break- an attempt to describe the temperature evolution by turbulence closure modelling. Technical report, OMEX II, NIOO.

K. Soetaert, J. J. Middelburg, P. M. J. Herman et K. Buis. (2000) On the coupling of benthic and pelagic biogeochemical models. *Earth-Science reviews* **51**, 173-201.

U. Sollfrank et W. Gujer. (1991) Characterization of domestic wastewater for mathematical modelling of the activated sludge process. *Water Science and Technology* **23**, 1057-1066.

H. Spanjers, I. Takacs et H. Brouwer. (1999) Direct parameter extraction from respirograms for wastewater and biomass characterization. *Water Science and Technology* **39**(4), 137-145.

H. Spanjers et P. A. Vanrolleghem. (1995) Respirometry as a tool for rapid characterization of waste-water and activated-sludge. *Water Science and Technology* **31**(2), 105-114.

H. Spanjers, P. A. Vanrolleghem, G. Olsson et P. L. Dold. (1998) Respirometry in control of the activated sludge process : principles. Scientific and Technical report, *Rep. 7*, International Water Association, London. 48 pages.

M. Sperandio et E. Paul. (2000) Estimation of wastewater biodegradable COD fractions by combining respirometric experiments in various S₀/X₀ ratios. *Water Research* **34**(4), 1233-1246.

M. Sperandio, V. Urbain, P. Ginestet, M. Audic et E. Paul. (2001) Application of COD fractionation by a new combined technique: comparison of various wastewaters and sources of variability. *Water Science and Technology* **43**(1), 181-189.

- A.-E. Stricker, P. Lessard, A. Héduit et P. Chatellier. (2003) Observed and simulated effect of rain events on the behaviour of an activated sludge plant removing nitrogen. *Journal of Environmental Engineering and Science* **2**(6), 429-440.
- M. V. Struglia, A. Mariotti et A. Filograsso. (2004) River discharge into the Mediterranean Sea: Climatology and aspects of the observed variability. *Journal of Climate* **17**(24), 4740-4751.
- A. Tessier, D. Fortin, N. Belzile, R. R. DeVitre et G. G. Leppard. (1996) Metal sorption to diagenetic iron and manganese oxyhydroxides and associated organic matter: Narrowing the gap between field and laboratory measurements. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **60**(3), 387-404.
- C. M. Turley, M. Bianchi, U. Christaki, P. Conan, J. R. W. Harris, S. Psarra, G. Ruddy, E. D. Stutt, A. Tselepidis et F. Van Wambeke. (2000) Relationship between primary producers and bacteria in an oligotrophic sea - the Mediterranean and biogeochemical implications. *Marine Ecological Progress Series* **193**, 11-18.
- M.-H. Tusseau. 1996. *Modélisation des variations saisonnières des cycles biogéochimiques dans le Golfe du Lion.*, Université Paris VI, Paris. 225 pages.
- M.-H. Tusseau, C. Lancelot, J.-M. Martin et B. Tassin. (1997) 1D coupled physical-biological model of the north-western Mediterranean Sea. *Deep Sea Research II* **44**(3-4), 851-880.
- M.-H. Tusseau et J.-M. Mouchel. 1995. Nitrogen inputs to the north-western Mediterranean Sea via the Rhône river. In *EROS 2000 5th workshop*, ed. H. Barth et J.-M. Martin, pp. 49-59. Brussels: European Commission.
- M.-H. Tusseau-Vuillemin. (1998) Do Food processing industries contribute to the eutrophication of aquatic systems? *Ecotoxicology and Environmental Safety* **50**, 143-152.
- M.-H. Tusseau-Vuillemin, R. Buzier, C. Martin dit Mériadec, I. Chardon, F. Elbaz-Poulichet, J.-L. Seidel, J.-M. Mouchel et G. Varrault. (2005a) Du réseau à la rivière et De la Marne à Andrésy : métaux labiles, dissous et particulaires., PIREN Seine, Paris. 1-18.
- M.-H. Tusseau-Vuillemin, J. Dispan, J.-M. Mouchel et P. Servais. (2003a) Biodegradable fraction of organic carbon estimated under oxic and anoxic conditions. *Water Research* **37**, 2242-2247.
- M.-H. Tusseau-Vuillemin, J. Garnier et P. Servais. (2001a) Charges spécifiques domestiques et caractérisation des rejets de station d'épuration. Rapport de synthèse 1998-2001, PIREN-Seine. 18 pages.
- M.-H. Tusseau-Vuillemin et R. Gilbin. 2002. *Characterization of the labile complexes measured with DGT by means of a numerical modeling*. Presented at European Meeting on Environmental Chemistry, Geneva.
- M.-H. Tusseau-Vuillemin, R. Gilbin, E. Bakkaus et J. Garric. (2004) Performance of Diffusion Gradient in Thin films in evaluating the toxicity of copper to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**(9), 2154-2161.
- M.-H. Tusseau-Vuillemin, R. Gilbin et M. Taillefert. (2003b) A dynamical model to characterize labile metal complexes collected with Diffusion Gradient in Thin films devices. *Environmental Science and Technology* **37**(8), 1645-1652.
- M.-H. Tusseau-Vuillemin, F. Lagarde, C. Chauvière et A. Héduit. (2001b) Hydrogen peroxyde (H₂O₂) as a source of dissolved oxygen in COD-degradation respirometric experiments. *Water Research* **36**, 793-798.
- M.-H. Tusseau-Vuillemin et G. Le Réveillé. (2001) Le carbone organique biodégradable dans les eaux traitées du bassin de la Seine. *Ingénieries, Eau, Agriculture et Territoires* **25**, 3-12.

M.-H. Tusseau-Vuillemin, L. Mortier et C. Herbaut. (1998) Modeling nitrate fluxes in a open coastal environment (Gulf of Lions): transport versus biogeochemical processes. *Journal of Geophysical Research* **103**, 7693-7708.

M.-H. Tusseau-Vuillemin, C. Ridame, A. Pelfrene et N. Tousset. 2005b. *Methodology for evaluating copper bioavailability at low concentration levels : bioaccumulation in aquatic moss compared to DGT labile concentrations*. Presented at SETAC annual meeting, Lille, France.

M.-H. Tusseau-Vuillemin, P. Servais et J.-M. Mouchel. (2001c) Diversité des rejets de station d'épuration. Leçons d'un petit bassin rural. rapport d'avancement 2000, PIREN-Seine, Paris. 15.

A. C. Van Haandel, G. A. Ekama et G. v. R. Marais. (1981) The activated sludge process-3. Single sludge denitrification. *Water Research* **15**, 1135-1152.

R. L. Vannote, G. W. Minshall, K. W. Cummins, J. R. Sedell et C. E. Cushing. (1980) The river continuum concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* **37**, 130-137.

P. A. Vanrolleghem, H. Spanjers, B. Petersen, P. Ginestet et I. Takacs. (1999) Estimating (combinations of) Activated Sludge Model No. 1 parameters and components by respirometry. *Water Science and Technology* **39**(1), 195-214.

M. T. Vasconcelos, M. F. C. Leal et H. M. V. M. Soares. (1996) Influence of the ratio copper(II) to ligand concentrations and the nature of entering and leaving ligands on the lability of copper(II) complexes. *Analytica Chimica Acta* **330**, 273-281.

B. Vigneault, A. Percot, M. Lafleur et P. G. C. Campbell. (2000) Permeability changes in model and phytoplankton membranes in the presence of aquatic humic substances. *Environmental Science and Technology* **34**(18), 3907-3913.

J. J. Walsh. (1991) Importance of Continental Margins in the marine biogeochemical cycling of carbon and nitrogen. *Nature* **350**(6313), 53-55.

P. Wassman. (1998) Retention versus export food chains: processes controlling sinking loss from marine pelagic systems. *Hydrobiologia* **363**, 29-57.

J. A. Webb et M. J. Keough. (2002) Measurement of environmental trace-metal levels with transplanted mussels and diffusive gradients in thin films (DGT) : a comparison of techniques. *Marine Pollution Bulletin* **44**, 222-229.

J. W. M. Wijsman, P. M. J. Herman, J. J. Middelburg et K. Soetaert. (2002) A model for early diagenetic processes in sediments of the continental shelf of the Black sea. *Estuarine, coastal and shelf science* **54**(3), 403-421.

K. Wilkinson, E. Balnois, G. G. Leppard et J. Buffle. (1999) Characteristic features of the major components of freshwater colloidal organic matter revealed by transmission electron and atomic force microscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **155**(2-3), 287-310.

H. Xue, A. Oestreich, D. Kistler et L. Sigg. (1996) Free cupric ion concentrations and Cu complexation in selected Swiss lakes and rivers. *Aquatic Sciences* **58**(1), 69-87.

H. Zhang et W. Davison. (2000) Direct in situ measurements of labile inorganic and organically bound metal species in synthetic solutions and natural waters using diffusive gradients in thin films. *Analytical Chemistry* **72**(18), 4447-4457.

J. Zumstein et J. Buffle. (1989) Circulation of pedogenic and aquagenic organic matter in an eutrophic lake. *Water Research* **23**(2), 229-239.

Annexes générales.

Curriculum vitae.

Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin,
Née le 7 octobre 1968, mariée.

33, boulevard Garibaldi, 75 015 Paris.
marie-helene.tusseau@cemagref.fr

INGENIEUR DU GENIE RURAL, DES EAUX ET FORETS, DOCTEUR ES SCIENCES,

1 Expérience professionnelle.

Depuis 1997, Cemagref : Chef d'équipe « impact des rejets urbains sur le milieu aquatique », unité de recherches Qualité et Fonctionnement Hydrologique des Systèmes Aquatiques. Développement de la thématique, mise en place d'activités de recherches, de collaborations scientifiques, encadrement et animation de la recherche, enseignement en formation initiale et continue.

1992 – 1996, Ecole Normale Supérieure : Thèse et post-doctorat.

Devenir des apports continentaux dans la zone côtière : processus biogéochimiques de transformation et d'exportation. Utilisation des techniques de modélisation couplée en trois dimensions, en collaboration étroite avec des équipes de Paris VI (L.O.Dy.C.) et du Netherlands Institute of Ecology (N.I.O.O.) , dans le cadre de projets européens.

1992 : Massachussets Institute of Technology (M.I.T.), stage au Ralph Parsons Laboratory, auprès de François M. Morel : la restauration de la qualité de l'eau dans le port de Boston, 6 semaines.

1991 : International Institute of Management of Irrigation (I.I.M.I.), Lahore, Pakistan, stage de terrain, 2 mois.

2 Formation initiale.

1992-1996 : Thèse de doctorat de l'université Paris VI (Océanologie, Météorologie, Environnement), réalisée à l'Ecole Normale Supérieure, sous la direction de J.-M. Martin.

Titre de la thèse : « **Modélisation des variations saisonnières des cycles biogéochimiques dans le Golfe du Lion** », obtenue avec les félicitations du jury.

1991-1992 : D. E. A. « Océanographie, Météorologie, Environnement » à Paris VI.

1990-1992 : Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et Forêts.

1987-1990 : Ecole Polytechnique, spécialisation en chimie et biologie.

3 Thèmes de recherche abordés

- ***Modélisation des cycles biogéochimiques (C, N, Si) en milieu côtier.***

Les apports de nitrates au Golfe du Lion et leur devenir dans la chaîne trophique selon leur origine : continentale via le Rhône, autochtone via la diagénèse sédimentaire, ou hauturière via la circulation générale méditerranéenne ont été quantifiés et mis en perspective. L'importance immédiate des apports fluviaux est ainsi relativisée. En revanche, leur impact est renouvelé au cours du temps du fait de la reminéralisation de la production primaire dans les sédiments.

- ***Modélisation du traitement des eaux et de la nature des rejets urbains.***

La modélisation est utilisée comme un outil pour simuler des surcharges de station d'épuration correspondant à des situations de temps de pluie. Ces simulations permettront d'optimiser la définition du débit maximum admissible en station, et donc de minimiser les rejets non traités.

- ***Biodégradabilité de la matière organique des rejets urbains ; développement de méthodologies de caractérisation, devenir dans le milieu naturel.***

Selon sa nature et sa biodégradabilité, la matière organique des rejets urbains provoque des effets immédiats ou différés dans le milieu naturel. Des techniques complexes (respirométrie) sont développées pour parvenir à une caractérisation pertinente.

- ***Rôle de la matière organique vis à vis de la biodisponibilité des micro-polluants urbains ; développement de méthodes de mesure, modélisation.***

Les métaux et les micro-polluants organiques ne provoquent pas les mêmes effets biologiques selon qu'ils sont accompagnés ou non de matière organique, qui tend généralement à diminuer leur toxicité. Cet effet peut n'être que temporaire à cause de la biodégradabilité de la matière organique. La toxicité réelle des rejets est donc vraisemblablement variable dans le temps et l'espace.

4 Animation Scientifique.

Rédaction et coordination de projets nationaux et européens :

- SISTEO (Hydro-écologie d'un territoire métropolitain : reflets du développement urbain en Ile de France), coordonné par J.-M Mouchel, CERREVE et financé par la région Ile de France, 2005-2010.
- CRIQUALADIM (Critères de qualité des eaux de surface : métaux labiles, dissous, ou associés en matières en suspension ?), financé par l'appel d'offres PNETOX 2004 (Cemagref Antony et Lyon, EDF-LNHE) du MEDD.
- Influence de la dégradation hétérotrophe sur la biodisponibilité de toxiques modèles en eaux fortement anthropisées (Cemagref Antony et Lyon, CERREVE, Université de Metz, ENSMP), projet INSU financé dans le cadre de l'appel d'offres ECCO 2003-2004.
- Modification de la biodisponibilité des micro-polluants en présence de matière organique dissoute de différentes origines (Cemagref Antony et Lyon), projet de quatre ans financé par l'appel d'offre interne « Etat Ecologique » du Cemagref.
- PIREN-Seine (CNRS - Programme Environnement, Vie et Société) : Co-animation avec Pierre Servais (Université Libre de Bruxelles), du thème « Dynamique de la Matière Organique et des Micro-organismes dans les systèmes urbains » du programme PIREN-Seine (1998-2002).
- GLAMOR (Gulf of Lions Advanced Modeling Research), en collaboration avec le Laboratoire d'Océanographie Dynamique et du Climat (Paris VI) et du Netherlands Institute of Ecology : rédaction et conduite du projet (1996-1999).

Participation à des projets européens.

- EROS 2000 (European River Ocean Systems 2000)
- CecoSEcoM (Coupled Socio-Economical and Ecological Modeling).

Expertise :

- Evaluation de projets proposés en réponse aux appels d'offres européens du 5ème PCRD (action-clef « Eau »).
- Evaluation de projets pour le programme ECCO (INSU).

- Evaluation de projets internationaux pour le programme INTAS.
- Relecture régulière d'articles pour "Water Research", "Environmental Toxicology and Chemistry", "Environmental Science and Technology", "Analytica et Chimica Acta".

Participation à des comités scientifiques :

- Congrès annuel international de la SETAC (Lille, 2005), membre du comité scientifique, du comité d'organisation et présidente de session.
- Programme PIREN-Seine (2002-2006).

5 Encadrement

- Thèse de doctorat de Fabienne Lagarde (~60% de l'encadrement) : « Modélisation du fonctionnement des stations d'épuration à boues activées en faible charge par temps de pluie ; optimisation du débit maximum admissible », financement Cemagref et F.N.S.E. (2000-2003), école doctorale Ville et Environnement (Paris XII, D. Thévenot), directeurs Alain Héduit (Cemagref) et Paul Lessard (université Laval, Québec). Soutenue le 27 octobre 2003. Mention très honorable avec les félicitations du jury. Fabienne Lagarde est Maître de conférences en IUT à La Roche S/Yon.
- Thèse de doctorat de Rémy Buzier (~80% de l'encadrement) : « Métaux labiles dans les eaux résiduaires urbaines », financement Cemagref et Conseil régional d'Ile de France (2002-2005), école doctorale Ville et Environnement (Paris XII, D. Thévenot), directeur Jean-Marie Mouchel, soutenance prévue en novembre 2005. Rémy Buzier est ATER à l'université de Limoges.
- Co-encadrement de la thèse de doctorat de Catherine Gourlay (~40% de l'encadrement) avec l'E.N.P.C. : « Biodisponibilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques en présence de matière organique dissoute et biodégradable » (2001-2004), école doctorale Géosciences et Ressources Naturelles (Paris VI, G. de Marsily), directeur Jean-Marie Mouchel. Soutenue le 24 novembre 2004. Mention très honorable avec les félicitations du jury à l'unanimité. Catherine Gourlay est chargée de recherches au Cemagref.
- Co-encadrement de la thèse de Daniel Ferreira (~60%) avec le CEREGE et le LNHE « Intégration du concept de biodisponibilité dans l'évaluation du risque environnemental de métaux (Cu, Cd) en milieu aquatique : complémentarité des outils de diagnostic et de modélisation », démarrage en octobre 2005.
- Comité de thèse de C. Duresa (INRA). Bilans de zinc à l'échelle d'une parcelle agricole.
- Chaque année, plusieurs étudiants de l'E.N.S.T.A., l'E.N.S.A.I.A., l'E.C.P., la Fédération Universitaire Luxembourgeoise, le D.E.A. Sciences et Techniques de l'Environnement :
- ENSIACET : Marion Keirlsbuck (2005), Bénédicte Dupoirion (2004)
- DEA STE : Daniel Ferreira (2005), Célia dit Meriadec (2004), Sylvie de Almeida (2003), Estelle Bakkaus (2002), Katherine Safronieva (2001), Guillaume Le Réveillé (1999).
- D.E.A. écotoxicologie (Metz) : Aurélie Pelfrene (2004)
- D.E.S.S. C.C.I. : Asma Djedaa (2003)
- C.N.A.M. : Isabelle Chardon (2004)
- E.N.S.T.A. : François Dutrop (2003)
- F.U.L. : Claire Chauvière (2000), Marie Sainte-Laudy (2001)
- E.M.E. : Virginie Alfandari (2001)
- E.C.P. : Julien Lerat (2000)
- E.N.S.A.I.A. : Isabelle Forgue (1999)

6 Enseignement

- Ecole Nationale Supérieure des Techniques Avancées (E.N.S.T.A.) :
- Création d'un module de 21 heures de cours, en deuxième année du cursus ingénieur : « Introduction à la biogéochimie des eaux superficielles » (depuis 2000).
- Appui à la création d'un module de 21 heures de cours en troisième année dans la voie « environnement » : « Rôle des écosystèmes dans les grands cycles de matière » (proposition du contenu du cours et des enseignants).
- Ecole Nationale Supérieure des Ponts et Chaussées (E.N.P.C.) :
- Participation au cours « Ecologie appliquée » de première année, proposé par Alain Franc en 2000.
- Participation au cours « Biogéochimie » du D.E.A. Sciences et Techniques de l'Environnement, conduit par J.-M. Mouchel (depuis 2000).
- Paris VI :
- Participation à l'option Environnement du D.E.U.G. mathématiques et Informatique appliquées aux sciences de l'ingénieur (1997-1999).
- Ecole Nationale du Génie de l'Eau et de l'Environnement de Strasbourg, Université de Metz, AGHTM :
- Participation régulière à des formations continues portant sur l'impact des rejets urbains et la biodisponibilité des micro-polluants.

7 Publications dans revues internationales

- Tusseau-Vuillemin M.-H., Gourlay C., Lorgeoux C., Mouchel J.-M., Buzier R., Gilbin R., Elbaz-Poulichet F., Bioavailability of dissolved contaminants in the river Seine basin. Soumis à Science of the total environment (septembre 2005).
- Buzier R., Tusseau-Vuillemin M.-H., Mouchel J.-M., Célia Martin dit Meriadec, Olivier Rousselot, Mouchel J.-M., Trace metal speciation and fluxes within a major French wastewater treatment plant: impact of the successive treatments stages, soumis à Chemosphere, Septembre 2005.
- F. Elbaz-Poulichet, J.-L. Seidel, C. Casiot et M.-H. Tusseau-Vuillemin, Short-term variability of dissolved trace element concentrations in the Marne and Seine Rivers near Paris. Soumis à Science of the total environment (juillet 2005).
- Lagarde F., Tusseau-Vuillemin M.-H., Lessard P., Hédit A., Assessing Chemical Oxygen Demand and nitrogen mass transfers in a multi-stage activated sludge plant, submitted to Environmental Modelling and Software, August 2005, en révision.
- Buzier R., Tusseau-Vuillemin M.-H., Mouchel J.-M., Evaluation of DGT as a metal speciation tool in wastewater, The Science of the Total Environment, sous presse.
- Lagarde F., Tusseau-Vuillemin M.-H., Lessard P., Hédit A., Dutrop F. and Mouchel J.-M., Variability estimation of urban wastewater biodegradable fractions by respirometry, Water Research, sous presse.
- Catherine Gourlay, Jean-Marie Mouchel, Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin, Jeanne Garric, 2005, Influence of algal and bacterial particulate organic matter on benzo[a]pyrene bioaccumulation in Daphnia magna, The Science of the Total Environment, 346, pp. 220-230.
- Gourlay C., Tusseau-Vuillemin M.-H., Mouchel J.-M. and Garric J., 2005, the ability of DOM to decrease the BaP bioavailability increases along DOM mineralization, Ecotoxicology and Environmental Safety, 61, 74-82.
- Miège C., Gourlay C., Tusseau-Vuillemin M.-H., Wang D., Durand S., Garric J., Mouchel J.-M., 2004, Variability of SPMD-availability of PAHs in river waters and wastewater treatment plants effluents, J. of Polycyclic Aromatic Compounds, 24 (4-5), PP. 805-825.

- Flipo N., Even S., Poulin M., Tusseau-Vuillemin M.-H., Améziane T., Dauta A., 2004, Biogeochemical modelling at the river scale : dynamics of phytoplankton and periphyton, *Journal of Ecological Modelling*, 176, pp. 333-347.
- Tusseau-Vuillemin M.-H., Gilbin R., Bakkaus E. and Garric J., 2004, Performance of DGT in evaluating the toxicity of copper to *Daphnia magna*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 23, n°9, 2154-2161.
- Tusseau-Vuillemin M.-H. and Gilbin R. and Taillefert M., 2003, A dynamical model to Characterize the labile complexes collected with DGT devices, *Environmental Science and Technology* 37, n°8, pp. 1645-1652.
- Jean-Gabriel Wasson , Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin, Vazken Andréassian , Charles Perrin, Jean-Baptiste Faure , Olivier Barreteau , Mathieu Bousquet , Bernard Chastan, 2003, What kind of models are needed for the implementation of the WFD ? Examples from France, *International Journal of River basin management*, vol. 1, n°2, pp. 125-135.
- Gourlay C., Tusseau-Vuillemin M.-H., Garric J. and Mouchel J.-M., 2003, Effect of dissolved organic matter of various origins and biodegradabilities on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Daphnia magna*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 22, n°6, p. 1288-1294.
- 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, pp. 2242-2247.
- Gourlay C., Miège C., Garric J., Tusseau-Vuillemin M.-H. and Mouchel J.-M., 2002, The use of spectrofluorimetry for monitoring the bioaccumulation and biotransformation by *Daphnia magna*, *J. of Polycyclic Aromatic Compounds* 22, n°3-4, pp. 501-516.
- Tusseau-Vuillemin M.-H., Lagarde F., Chauvière C., Héduit, A., 2002, Hydrogen Peroxide as a source of dissolved oxygen in respirometric experiments, *Water Research*, 36, 793-798.
- Tusseau-Vuillemin M.-H., 2001, Do food processing industries contribute to the eutrophication of aquatic systems ?, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 50, 143-152.
- Tusseau-Vuillemin M.-H., Mortier L., Herbaut C., 1998, Modeling nitrate fluxes in an open coastal environment (Gulf of Lions) : transport versus biogeochemical processes, *Journal of Geophysical Research* 103, C4, pp. 7693-7708.
- Tusseau M.-H., Lancelot C., Martin J.-M. and Tassin B., 1997, 1D coupled physical-biological model of the north-western Mediterranean Sea, *Deep Sea Research II*, vol. 44, n°3-4, pp. 851-880.
- Guézennec C. Y., Lienhard F., Louisy F., Renault G., Tusseau M.-H., Portero P., 1991, in situ NADH laser fluorimetry during muscle contraction in humans, *European journal of applied physiology and occupational physiology*, 63 (1), pp. 36-42.

8 Autres revues

- Schmidt-lainé C. et Tusseau-Vuillemin M.-H., en préparation, Développement de la modélisation - nécessité de mise en place d'indicateurs, in « Cycles biogéochimiques », Rapport Science et Technologie de l'Académie des Sciences, animé par G. Pedro, prévu pour octobre 2005.
- Flipo N., Even S., Poulin M., Tusseau-Vuillemin M.-H., Améziane T., 2004, modélisation spatialisée du périphyton à l'échelle de la rivière (Grand Morin), *Journal de Recherche Océanographique*, vol. 28, fasc. 1 & 2, pages 154-158.
- Tusseau-Vuillemin M.-H. et Le Réveillé G., 2001, Le carbone organique biodégradable dans les eaux traitées du bassin de la Seine, *Ingénieries Eau et Territoire*, n°25, pp. 3-12.

- Tusseau M.-H. and Mouchel J.-M., 1995, nitrogen inputs to the Gulf of Lions via the Rhône river, Water Pollution Research Reports 32, EROS 2000 5th workshop, J.-M. Martin and H. Barth eds., pp. 49-59.

9 Rapports

- Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin, Rémy Buzier, Célia dit Mériadec, Isabelle Chardon, Françoise Elbaz-Poulichet et Jean-Luc Seidel, Jean-Marie Mouchel, Gilles Varrault, 2005, Du réseau à la rivière et De la Marne à Andrésy : métaux labiles, dissous et particulaires, rapport PIREN Seine.
- Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin, Sylvie de Almeida, Isabelle Chardon, Rémy Buzier, Françoise Elbaz-Poulichet et Jean-Luc Seidel, 2004, Contamination en métaux biodisponibles : variabilité temporelle en amont et en aval de Paris, rapport PIREN-Seine.
- M.-H. Tusseau-Vuillemin, Cécile Miège, Catherine Gourlay, Rodolphe Gilbin, Corinne Ravelet, Françoise Elbaz-Poulichet, Jean-Luc Seidel, Jeanne Garric, Jean-Marie Mouchel, 2003, Systèmes d'estimation intégrative de la contamination par les micro-polluants et de leur biodisponibilité, rapport PIREN-Seine.
- Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin, J. Garric, R. Gilbin, C. Gourlay, C. Miège, B. Montuelle, C. Ravelet, J.-L. Roulier, F. Delmas, C. Moreau, 2003, Modification de la Disponibilité des Contaminants (MODIC), rapport final (1999-2002).
- Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin, Josette Garnier, Pierre Servais, Laeticia Laroche, Charges domestiques spécifiques et rejets de station d'épuration, 2002, rapport PIREN-Seine.
- Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin, Marie Sainte-Laudy, Séverine Goulette, Pierre Servais, Jean-Marie Mouchel, Diversité des rejets de station d'épuration : leçons d'un petit bassin versant rural, 2001, rapport PIREN-Seine.
- Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin, Guillaume Le Réveillé, Jean-Marie Mouchel, Jérôme Dispan, Marc Delbec, Pierre Servais, 2000, Biodégradabilité de la matière organique en sortie de station d'épuration, rapport PIREN-Seine.
- Garric J., Babut M., Flammarion P., Gouy V., Kosmala A., Montuelle B., Roulier J.L., Tusseau-Vuillemin M.-H., mars 2000, Analyse écotoxicologique de l'impact des contaminants dans les écosystèmes aquatiques : quels outils et quels modèles. Modélisation biogéochimique. Biodisponibilité. Effets biologiques, Rapport Cemagref, Etat Ecologique, 54p. + annexes
- Tusseau-Vuillemin M.H., Forgue I., Babut M., Flammarion P., Garric J., mars 2000, Evaluation du risque écotoxicologique lié aux hydrocarbures aromatiques polycycliques. Rapport Cemagref. Département GMA "état écologique". 5 pages.
- Jean-Marie Mouchel, Jérôme Dispan, Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin, Guillaume Le Réveillé, Pierre Servais, M. Frébutte, 1999, Encore un effort du côté de la matière organique, rapport PIREN Seine.
- 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, 35 pages
- Rapports d'avancement des projets européens GLAMOR-METROMED et CECOSECOM.

Sélection d'articles.

Modeling nitrate fluxes in an open coastal environment (Gulf of Lions): Transport versus biogeochemical processes

Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin

Institut de Biogéochimie Marine - Ecole Normale Supérieure, Montrouge, France
 Cemagref, Division Qualité et Fonctionnement Hydrologique des Systèmes Aquatiques, Antony, France

Laurent Mortier

Ecole Nationale Supérieure des Techniques Avancées, Paris

Christophe Herbaut

Center for Meteorology and Physical Oceanography, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge

Abstract. A 13-compartment model of primary production and degradation of dissolved organic matter has been coupled with a general circulation model in an open coastal environment (Gulf of Lions, Mediterranean) so as to quantify exchanges with the open sea. The biogeochemical model had been previously calibrated with a one-dimensional vertical version on a 1-year data set, and this simulation provides boundary conditions for the three-dimensional model. After a 1-year spin-up simulation, quasi-equilibrium is obtained for all the compartments, and the results of an additional annual simulation are compared with coastal zone color scanner images and other data collected in the area: the simulation of chlorophyll *a*, nutrient concentrations, and primary production is quite satisfactory, although the spring bloom starts slightly earlier than usual. Total gross community production is estimated at $76 \text{ g C m}^{-2} \text{ y}^{-1}$, and New Gross Community Production at $45 \text{ g Carbon m}^{-2} \text{ y}^{-1}$ ($f = 0.37$). The model was used to understand the nitrate annual cycle in the coastal zone of the Gulf of Lions. Nitrate input from the Rhône river, from the sediment, and from marine advection are compared in terms of potential fertilization. Model results indicate that, regarding the open sea, the margin acts most of the time as a sink for nitrate. However, during winter, when phytoplankton growth is reduced and cascading of dense waters is active along the shelf, the margin is shown to export nitrate toward the open sea. These results may qualitatively apply to other open Mediterranean margins, although the intensity of the fluxes would be modulated by local features.

1. Introduction

The fate of the land-derived material introduced into the ocean depends essentially on the biogeochemical transformations occurring in the coastal zones that are likely to play a major role on a global scale [Mackenzie *et al.*, 1991; Walsh, 1991]. These transformations involve complex biogeochemical and physical interactions, for which coupled models provide a useful study tool. However, even though such models have already been developed for entire oceanic basins [e.g., Fasham *et al.*, 1993; Six and Maier-Reimer, 1996] and seas [Nihoul *et al.*, 1993; Baretta *et al.*, 1994] or semienclosed coastal areas [e.g., Aksnes and Lie, 1990; Tamsalu and Ennet, 1995], few attempts have been made to describe an open margin zone with a biogeochemical model. However, such tools are needed to quantify, on a seasonal and annual scale, not only the internal biogeochemical functioning of the coastal zone, but also its exchanges with the open sea. We present here such a coupled model, applied to the Gulf of Lions.

Copyright 1998 by the American Geophysical Union.

Paper number 97JC03709.
 0148-0227/98/97JC-03709\$09.00

The Gulf of Lions lies south of France in the northwestern Mediterranean Sea. Its shape is roughly semicircular with a radius of about 100 km (Figure 1). It is one of the major margins in the western Mediterranean ($\sim 20,000 \text{ km}^2$) and forms a shallow receptacle for the most important Mediterranean river (Rhône River, with mean discharge of $1000 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$). The oligotrophic character of the Mediterranean Sea is therefore locally counterbalanced by continental input, as shown by Coastal Zone Color Scanner images that reveal a permanent higher productivity in the Gulf of Lions than in the adjacent area [Morel and André, 1991]. The shelf break is bordered by the northern current [Alberola *et al.*, 1995], which makes incursions into the shelf, providing exchange with the open sea. In the offshore area of the gulf, intense vertical convection occurs in winter and leads to the seasonal enrichment of surface waters by nutrients.

In an earlier study, Pinazo *et al.* [1996] focused on the spatio-temporal variability of the Rhône River plume and its implication for primary production. The present study aims at integrating both the continental and marine influence in the description of the biogeochemistry of the Gulf of Lions. Finally, we aim to quantify from a daily to an annual scale the exchanges between the margin and its environment.

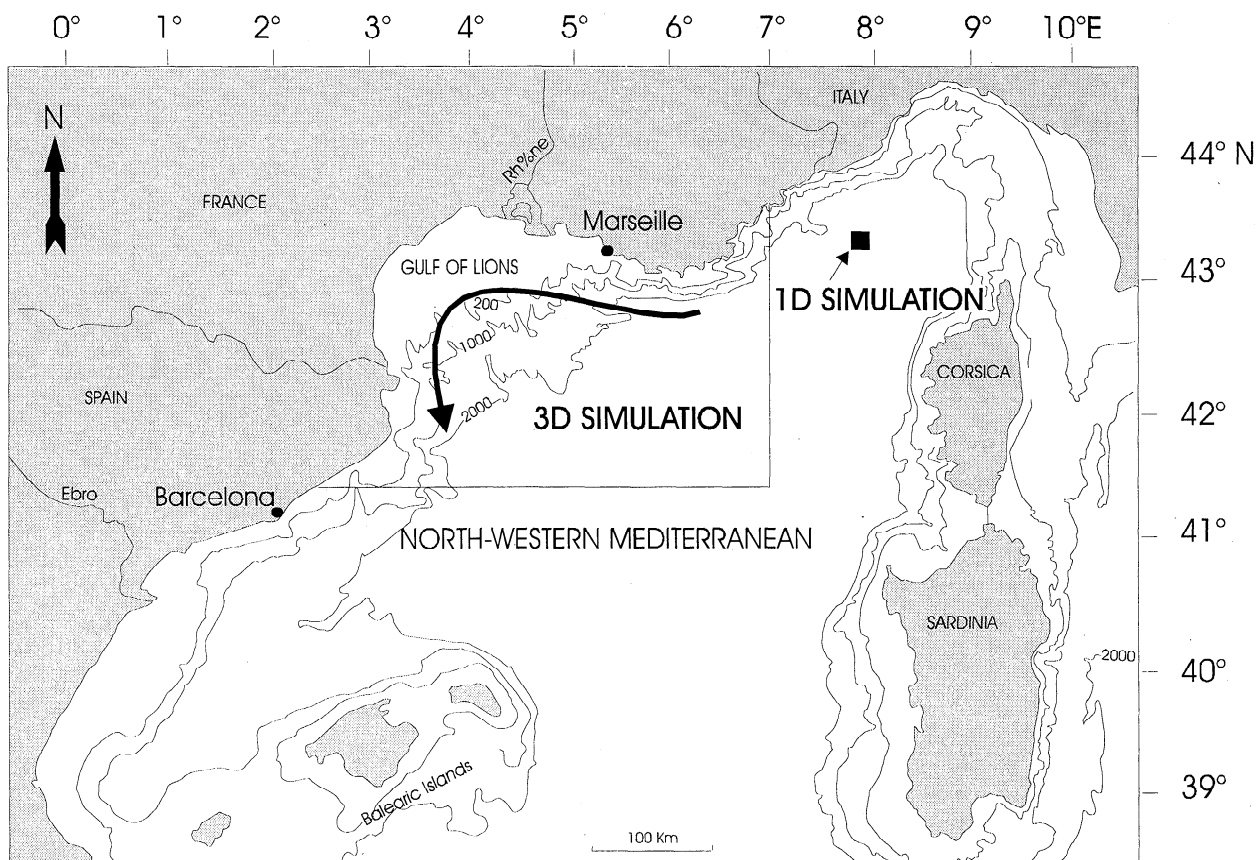


Figure 1. Location and bathymetry of the Gulf of Lions in the northwestern Mediterranean Sea. The direction of the main current is indicated with the curved arrow. The one-dimensional simulation site is indicated with the solid square; the three-dimensional simulation domain lies between the straight lines and the coastline.

2. Description of the Three-Dimensional Model

The three-dimensional model results from the “off-line” coupling between a general circulation model and a mechanistic biogeochemical model. These two sub-models and the coupling procedure are described below.

2.1. General Circulation Model

2.1.1. The model. The hydrodynamics of the Gulf of Lions has been numerically simulated with a general circulation model covering the whole northwestern Mediterranean Sea (8.5°W – $17^{\circ}\text{E} \times 34.8^{\circ}\text{N}$ – 44.8°N), and results have been truncated to our area of interest (2.5°E – $7^{\circ}\text{E} \times 41.5^{\circ}\text{N}$ – 43°N). This finite difference primitive equation model developed at the Laboratoire d’Océanographie Dynamique et du Climat [Madedec et al., 1991a, b] uses a rigid lid approximation filtering barotropic gravity waves. The horizontal discretization on an Arakawa C grid uses a tensorial formalism which provides a second-order accuracy scheme on any orthogonal three-dimensional curvilinear mesh. The horizontal grid mesh is $1/8^{\circ}$ in longitude and $1/10^{\circ}$ in latitude (i.e., $\sim 11 \text{ km} \times 11 \text{ km}$) in order to fit the first baroclinic radius of deformation, which is about 15 km in the Mediterranean Sea due to the mean vertical density profile. In the present study, the vertical coordinate is a z coordinate.

Thirty-one vertical levels ranging from 6 m at the surface to 140 m for the deepest level are used. The bottom topography is based on the National Geographical Data Center $5' \times 5'$ earth topography database.

Subgrid scale physics is parameterized by a fourth-order operator for momentum, salinity and temperature. The pseudohorizontal eddy viscosity and diffusion coefficients are equal to $10^{-10} \text{ m}^4 \text{ s}^{-1}$, and the vertical coefficients are computed from a turbulent kinetic energy parameterization [Blanke and Delecluse, 1993]. The density field is computed from the temperature and salinity fields by a nonlinear state equation [Millero and Poisson, 1981].

2.1.2. The simulation. The model was forced with density gradients at the Straits of Gibraltar and Sicily and twice daily atmospheric thermohaline fluxes and winds from the numerical weather prediction model “PERIDOT” [Imbard and Joly, 1986]. PERIDOT has been run in an operational mode by the French Meteorological Office over Europe and the Mediterranean area during the early 1990’s and provides daily output on a fine grid mesh ($33 \text{ km} \times 33 \text{ km}$). The general circulation model was run during 20 years, so that the simulation was considered to have reached steady state [Herbaut, 1994]. Model results are qualitatively and quantitatively in good agreement with observations [Herbaut,

1994, *Herbaut et al.*, 1996, 1997]. Hereinafter, we focus our description of the model results in the area of interest.

Along the shelf break of the Gulf of Lions, the circulation is characterized by the Liguro-Provençal-Catalan current (the northern current hereinafter) which flows cyclonically along the coasts of Italy, France, and Spain (Figure 1). The model describes the seasonal variability of the northern current's transport with a maximum of about 1.6 Sv in winter, coherent with the observations [*Alberola et al.*, 1995]. Its mesoscale variability is marked by the growth of meanders which break down into eddies. The deep water formation occurring in the "MEDOC" region off the shelf of the Gulf of Lions is shown to reinforce this circulation as predicted by theory [*Crépon et al.*, 1989; *Madec et al.*, 1991a, b]. The northern current then follows the continental slope of the Balearic Sea.

In winter, the model describes the formation of two water masses in the area of the Gulf of Lions: the surface water of Atlantic origin (MAW) is transformed into winter intermediate water (WIW hereinafter) characterized by a minimum temperature [*Millot*, 1985], and into western mediterranean deep water as described by several authors [*Stommel*, 1972; *Gascard*, 1978].

Deep water formation is shown to occur in an area centered at 5°E-42°N whose diameter is about 100 km. The convection reaches at least a 1500-m depth at the end of February. The temperature of the newly formed deep water is 12.80°C and its salinity is 38.42 practical salinity units (psu).

WIW formation occurs in different places. Water much colder and less salty ($T < 10^{\circ}\text{C}$, $S < 38.15$ psu) than deep water forms over the shelf in the Gulf of Lions. This water sinks along the continental slope and stabilizes between 300- and 400-m depth. Figure 2 shows the intensity of this downward flux of water at 200-m depth. These waters flow southwestward along the Spanish coast, constituting an export of the Gulf of Lions surface waters toward the general circulation. In situ measurements have described this phenomenon, the water formed over the shelf stabilizing around 350 m [*Fieux*, 1972], but did not provide volume estimates as the model does.

In summer, the salient features described by the model have a strong analogy with the observations (see, e.g., *Millot* [1989]). For example, mistral gusts are shown to bring waters below 19°C at the surface, featuring coastal upwellings, despite the relatively coarse resolution of the model. After these northwesterly wind events, the branching of the northern current onto the continental shelf clearly appears. The vertical stratification is also well described, exhibiting strong gradients in the surface layers (Figure 3). This last feature is of crucial importance for coupling with a biogeochemical model, as will be discussed in the next section.

2.2. Biogeochemical Model.

2.2.1. Conceptual model. The biogeochemical model describes C, N, and Si cycling through the pelagic food web as represented by 13 compartments (Table 1 and Figure 4). Emphasis has been given to the mechanisms describing photosynthesis and organic matter degradation [*Tusseau et al.*, 1997]. The food web is closed by mesozooplankton and protozooplankton grazing. The model then consists of assemblage of two submodules: "AQUAPHY" [*Lancelot et al.*, 1991a], describing phytoplankton dynamics, and "HSB" [*Billen and Servais*, 1989], describing organic matter microbial degradation. These conceptual models are based on physiological principles and have been successfully applied in various aquatic environments [*Lancelot et al.*, 1991a, b; *Tusseau et al.*, 1997]. Equations and parameters are described in extenso in the appendix.

2.2.1.1. The AQUAPHY model: The model of phytoplankton development differs from most other primary production models in that it explicitly distinguishes photosynthesis (directly dependent on irradiance) and phytoplankton growth (dependent on both nutrient and energy availability) [*Lancelot et al.*, 1991a].

Two phytoplankton communities (diatoms and flagellates) are described by three compartments defined according to their metabolic function: the monomers S, the reserve

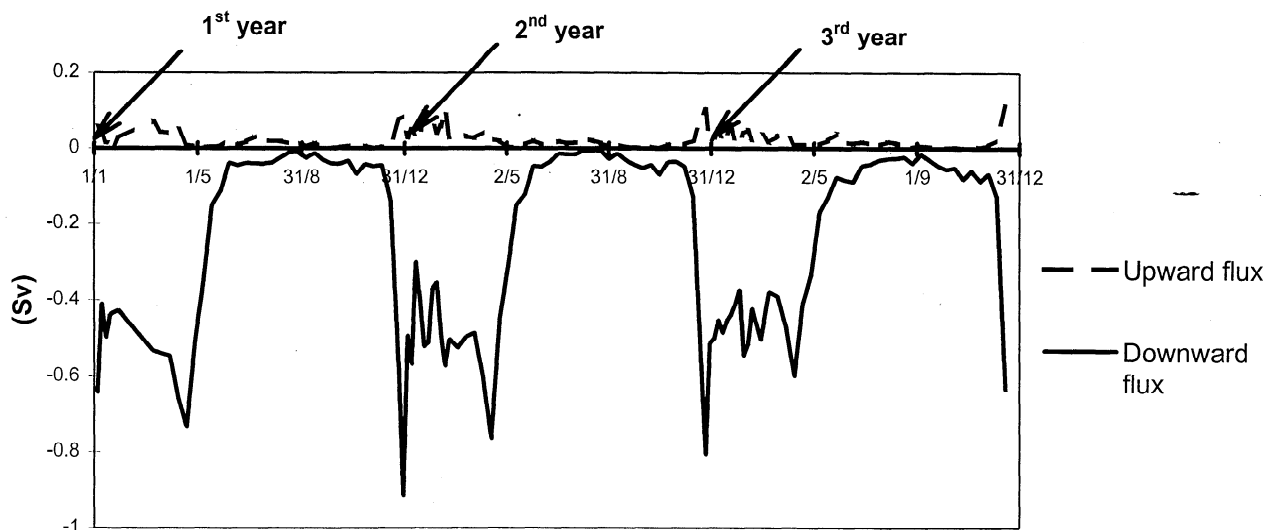


Figure 2. Seasonal variations of the upward (dashed line) and downward (solid line) fluxes of water (in sverdrups) through the margin box as a function of time, for a 3-year period (the arrows point to January 1), as obtained by the general circulation model. The margin box is defined as the upper 200 m above the 500-m isobath. The dates are expressed as day/month.

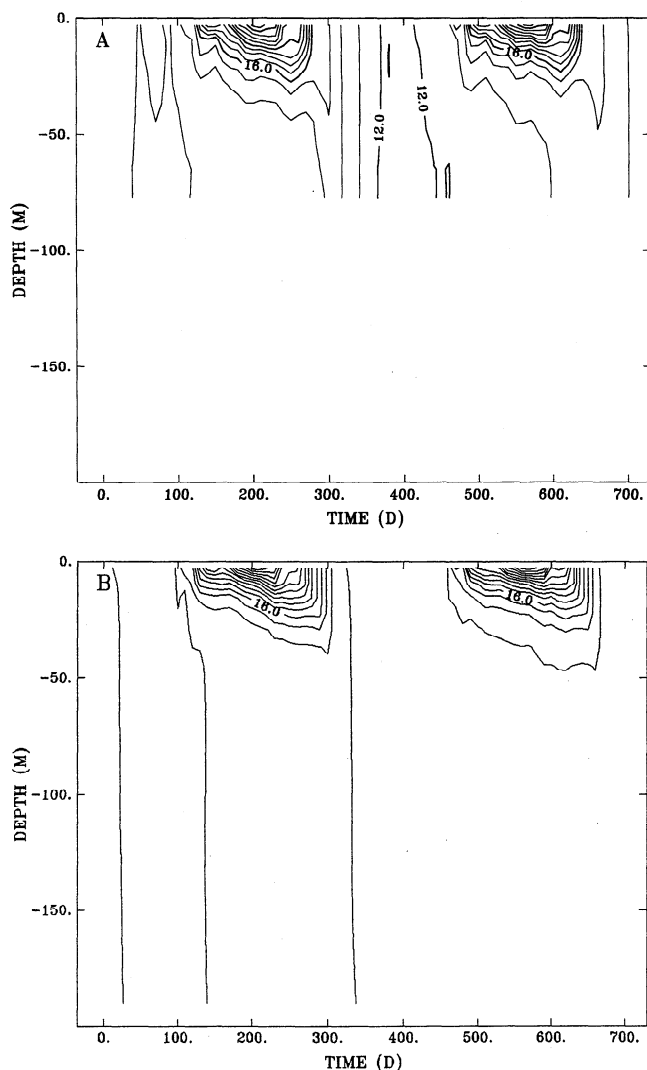


Figure 3. Seasonal and in-depth variations of temperature (degrees Celsius) at (A) 3.6°E - 42.8°N (shelf) and (B) 5.°E - 41.6°N ("MEDOC" zone, off the shelf of the Gulf of Lions) as obtained by the general circulation model for a 3-year period. Interval between two isolines is 2°C; time is expressed in days (day 1 is January 1).

products R (polysaccharides and lipids), and the functional and structural macromolecules F (proteins, DNA, ATP, etc.), these latter containing nutrients (N, P, and Si for diatoms). Phytoplankton growth is described by F synthesis, depending on both S and nutrient availability. S is provided either directly by photosynthesis or indirectly by R catabolism. Energy required for metabolic pathway and basal maintenance is provided either by photosynthesis or R catabolism. Experimental evidence of these regulatory mechanisms is given by *Lancelot and Mathot* [1985]. Phytoplankton losses include autolysis and exudation, grazing and sedimentation, all with different fates in the ecosystem (Figure 4). Grazing affects the three compartments of both communities while sedimentation applies only to diatoms.

2.2.1.2. The HSB model: The description of microbial degradation of organic matter is derived from the HSB model of *Billen and Servais* [1989]. Dissolved organic matter is described by two classes of molecules according to their

molecular weight and their potential utilization by bacteria: monomers MS and polymers H. Equations and parameters are described in the appendix and reflect that the exoenzymatic hydrolysis of polymeric dissolved organic matter is the limiting step for the overall process of degradation and bacteria growth [*Billen*, 1991].

2.2.1.3. The nutrient loop: N (nitrate and ammonium) and Si (silicic acid) for diatoms are the major inorganic nutrients considered by the model. The mass N:Si:C ratio of structural material F is assumed to be constant, while the N:Si:C ratio of phytoplankton cells varies according to the importance of storage products. The model assumes a Michaelis-Menten dependence of nutrient assimilation by phytoplankton and does not consider luxury consumption. Allocation of nitrogen uptake between NO₃ and NH₄ is calculated for each algal group according to an empirical law describing the relative preference for ammonium depending on ammonium availability [*Dortch and Postel*, 1989; *Kokkinakis and Wheeler*, 1988; *Malone*, 1980].

The nitrate stock can be renewed only by mixing with the deeper layers, whereas ammonia and silica are regenerated throughout the water column. The remineralization of silica is described with a simple first-order law, but ammonia is part of a complex and much faster remineralization loop involving bacteria, zooplankton, and heterotrophic nanoflagellates. These organisms are assumed to hold a constant C:N mass ratio that they maintain with their diet. Ammonium excretion then depends on the nitrogen content of their substrates or food items. When the C:N ratio of monomeric substrates is poorly balanced, bacteria take up ammonium and compete with phytoplankton for their N requirements. A constant mass C:N ratio is assumed for bacteria, zooplankton, and protozoa (taken from *Lancelot et al.* [1991a, b]). The C:N ratios of dissolved organic matter and phytoplankton are calculated at each time increment.

2.2.2. Calibration. The calibration of the biogeochemical model was achieved on a one-dimensional basis [*Tusseau*, 1996], on a 1-year vertical data set available at a fixed station

Table 1. Biogeochemical State Variables With Their Units

Variables	Units
(1) NO ₃ : nitrate	mmol m ⁻³
(2) NH ₄ : ammonium	mmol m ⁻³
(3) Si: silicate	mmol m ⁻³
(4) Dsi: Detritic silicate	mmol m ⁻³
(5) Dia_S: diatoms small metabolites	mg C m ⁻³
(6) Dia_R: diatoms reserves	mg C m ⁻³
(7) Dia_F: diatoms functional macromolecules	mg C m ⁻³
(8) FI_S: flagellates small metabolites	mg C m ⁻³
(9) FI_R: flagellates reserves	mg C m ⁻³
(10) FI_F: flagellates functional macromolecules	mg C m ⁻³
(11) MS: monomeric dissolved organic matter	mg C m ⁻³
(12) H: polymeric dissolved organic matter	mg C m ⁻³
(13) B: bacteria	mg C m ⁻³
<i>Other Definitions</i>	
S _{eff} = (PHY_S/PHY_F) - Q _S	n.d.
N : C _{MS} = N : C mass ratio of MS	n.d.
N : C _H = N : C mass ratio of H	n.d.

Abbreviation n.d. indicates dimensionless.

The fluxes coming in and out of these compartments are mathematically described in the appendix.

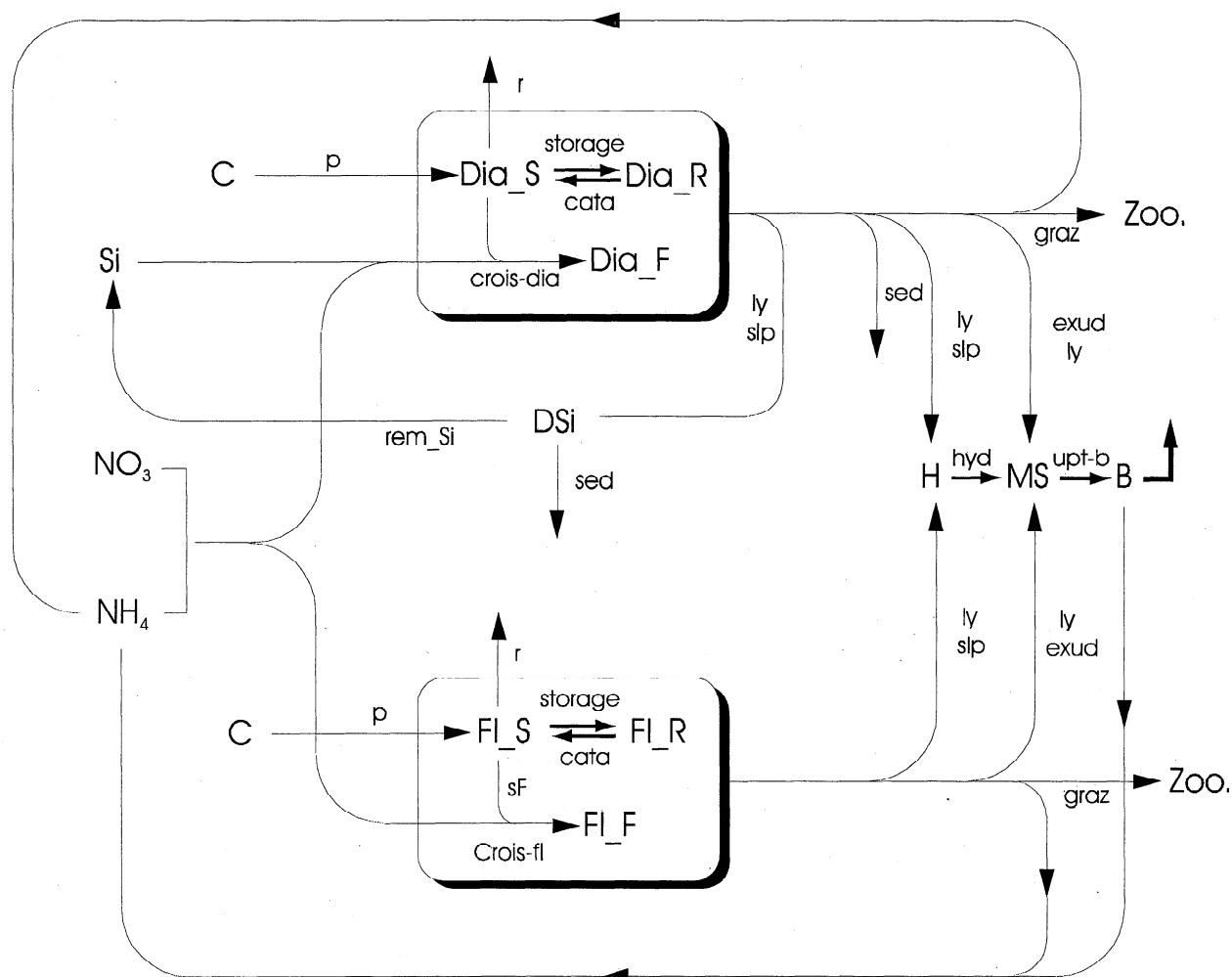


Figure 4. Biogeochemical conceptual model. The state variables are listed in Table 1 and the processes are described in the appendix.

at the eastern entrance of the Gulf of Lions (43°24'N, 07°52'E). These data (twelve 200-m profiles of temperature, salinity, nitrate, silicate and chlorophyll *a*) have been collected in the frame of the French program "FRONTAL" (year 1986). At this station, it has long been recognized that horizontal advection could be neglected in comparison with the vertical movements and that one-dimensional water quality models could be developed there [Zakardjian and Priour, 1994; Lévy *et al.*, 1995].

The parameters displayed in the appendix lead to a 1-year simulation in good agreement with the data [Tusseau *et al.*, 1997] and were applied without any modification in the three-dimensional version of the model.

2.3. Coupled Model

2.3.1. Numerical solving. The coupling has been carried out in an off-line mode with subsampling and averaging of the velocity, temperature, and salinity every 10 days. Indeed, a shorter period does not allow correct filtering of small-scale motions which, in principle, would require a simultaneous integration of the two models to be taken into account. Such an integration is computationally too expensive at this stage.

Nevertheless, the vertical mixing coefficient has been recomputed on the basis of the averaged state variables of the model but with the exact wind forcing. The coefficient has been found to be in very good agreement at short time scales with the mixing coefficient computed by the circulation model. The advective scheme is of FCT type, based on the antidiffusive correction algorithm [Smolarkiewicz, 1984]. No horizontal explicit diffusion was included, since a small implicit diffusion is inherent to the advective scheme and because standard explicit diffusive operators (Laplacian or bi-Laplacian) are not positive.

The thirteen biogeochemical equations (appendix) are simultaneously solved using a fourth-order Runge-Kutta scheme [Press *et al.*, 1992] with a 1-hour time step. In-depth irradiance, I , is computed as follows (H.J. Minas, personal communication, 1994), depending on the surface light:

$$-1/I \, dI/dz = 0.0575 \times \text{Chl} + 0.06$$

where I is penetrated irradiance at depth z in W m^{-2} , z is depth in meters, and Chl is chlorophyll *a* concentration at depth z in mg m^{-3} .

Surface irradiance is assumed to be uniform over the whole domain, and computed from classical astronomical formulas [Tusseau, 1996]. Photosynthetically available irradiance is computed as 45% of I [Lancelot *et al.*, 1991a].

2.3.2. Boundary conditions. The boundary conditions are constituted of the open boundaries (east and west), the bottom boundary, and the Rhône River.

2.3.2.1. Open boundaries: The mean residence time of surface waters in the Gulf of Lions has been estimated with the circulation model to be about 1 month [Tusseau, 1996]. Any simulation lasting more than 1 month thus requires a careful description of the open boundary conditions. As eastern and southern boundary conditions, we used, for all biogeochemical compartments, the one-dimensional simulation realized during the calibration phase at the eastern entrance of the Gulf of Lions [Tusseau et al., 1997] with a 1-day time step (Figure 1).

However, the eastern 7°E boundary transect displays a well-known heterogeneous distribution of nutrients and chlorophyll, owing to the frontal structure induced by the Liguro-Provençal current [Sournia et al., 1990; Lefevre et al., 1997]. As our one-dimensional simulation was realized in the divergence area of the Ligurian Sea, we had to correct the nutrients and chlorophyll simulated concentrations with a south-north decreasing gradient, as estimated after the *Prolig* cruise's measurements [Sournia et al., 1990]. By doing so, in the upper 150 m of the water column, we aim at reproducing the oligotrophy of the Liguro-Provençal current.

The simulation realized in the Ligurian Sea may, however, not be relevant for describing the southern boundary. We assume that, thanks to the prevailing southward circulation, this approximation does not dramatically perturb the simulation inside the Gulf of Lions.

Deep water concentrations (deeper than 200 m) are set to the 200-m value obtained during the one-dimensional simulation.

Finally, for any "X" biogeochemical state variable, the open boundary conditions are formulated as follows:

$$\text{if } 0 \leq z \leq 200 \text{ m, } X(7^\circ \text{E}, j, z) = X_{1D}(z) \times \rho$$

where

$$\rho = 0.7 + \left(\frac{43^\circ 30' - j}{1^\circ} \right) \text{ if } \begin{cases} 42^\circ 30' \text{N} \leq j \leq 43^\circ 30' \text{N} \\ z \leq 150 \text{ m} \end{cases}$$

$$\rho = 1 \text{ otherwise}$$

otherwise, $X(7^\circ \text{E}, j, z) = X(i, 41^\circ 30' \text{N}, z) = X_{1D}(200 \text{ m})$

2.3.2.2. Bottom boundaries: Specifying the bottom boundary conditions consists of formulating the fluxes of all the biogeochemical species at the water-sediment interface. As our model does not explicitly consider particulate matter falling down to the bottom, nor the early diagenesis in the sediments, we had to parameterize the nutrient fluxes at this interface. Instead of describing them explicitly, we take them into account by setting the concentrations of NO_3 , NH_4 , and Si equal to an observed value, in the bottom layer of the model and at each time step. These values are spatially and temporally interpolated from a five-cruise data set (EROS 2000 project, *Discovery* cruises (winter), *Marion Dufresne* cruise (spring), *Bannock* cruise (summer) and *Rhodiber* cruise (autumn)). This parameterization is very coarse and will be discussed below, but it allows us to run the model during 2 years without impoverishing unrealistically the most shallow parts of the domain.

2.3.2.3. Rhône River plume: In this preliminary version of the biogeochemical model, the Rhône River has been described as a pinpoint source of inorganic nutrients (NO_3 and

Si). Organic nitrogen data show that this flux ranges between 40 and 80% of the nitrate flux. However, the Rhône delta is a very active sedimentation zone, making it difficult to estimate the fraction of the organic flux contributing to the nitrogen budget of the Gulf of Lions. The seasonal variations of the inorganic nutrients flux have been described with a statistical model [Tusseau and Mouchel, 1995], so as to take into account the variations in both the concentrations and the water discharge.

2.3.3. Initial conditions. A preliminary 1-year run was necessary to obtain inner initial fields fully coherent with the boundary conditions. The second run was considered satisfactory as quasi-equilibrium was obtained after 1 year of simulation for most of the biogeochemical compartments (Table 2). Moreover, the standing stocks remain remarkably stable over 1 year when considering only the euphotic zone (Third column of Table 2). Most of the observed drift (Second column of Table 2; see NH_4 and H, for example) is linked to a slow evolution of the bottom standing stock, which is due to a coarse estimation of the bottom concentrations at the open boundaries. This slight drift does not influence the biogeochemistry of the upper layers in annual simulations but should be worked out before using the model for long-term predictions.

3. Model Validation

The biogeochemical model has been calibrated and deeply investigated apart from the three-dimensional simulation [Tusseau et al., 1997]. The best way to estimate its validity in a three-dimensional version would be to compare the simulation with a climatological data set covering the appropriate temporal and space scale. Such a data set should comprise several years of observational data, so as to eliminate most of the interannual variability. Although it is difficult to compare observational data with model simulations owing to meteorological interannual variability in the Gulf of Lions which causes biological variability, we

Table 2. Ratio Between the Final and Initial Stocks of the Biogeochemical Species for the Second 1-Year Run (Precision : 10^{-3})

	Whole Domain	Euphotic Zone (0-200 m)
NO_3	0.952	0.985
NH_4	0.655	0.935
Si	0.895	0.966
Dsi	1.000	1.000
Dia_S	1.001	1.000
Dia_R	1.001	1.001
Dia_F	1.000	1.000
FI_S	1.000	1.000
FI_R	1.000	1.000
FI_F	1.000	1.000
MS	1.023	1.000
H	0.725	0.929
B	1.000	1.000
N : C	0.794	0.953
N : C ^{MS}	0.994	0.995
Total nitrogen	0.931	0.981
Mean	0.936	0.984
S. D.	0.112	0.025

S. D., standard deviation.

compare here our results with nitrate, chlorophyll *a*, and primary production data, in terms of orders of magnitude and spatial structure. For the other compartments, we have checked the annual budgets (Table 2).

3.1. Spatial Distribution of Nitrate and Phytoplankton

Phytoplankton abundance is usually expressed in chlorophyll *a* concentration. In order to compare our model results with data, we use the following conversion factor [Tusseau *et al.*, 1997]:

$$[\text{Chl}] \equiv \left(\frac{[\text{Dia}_F] + [\text{Fl}_F]}{40} \right) \frac{\text{mg m}^{-3}}{\text{mg m}^{-3}}$$

3.1.1. Initial conditions. The initial fields (February 1) of all biogeochemical species have been obtained after a preliminary 1-year run. Winter conditions imply that chlorophyll concentrations (mg Chl m^{-3}) are very low, even in the surface layer (average of 0.03 mg m^{-3} , and standard deviation of 0.03 mg m^{-3}), as a result of not only the light and temperature limitation, but also of the convection occurring mostly in January. Indeed, the offshore area, submitted to intense winter mixing, is completely depleted (Figure 5a), while the Liguro-Provençal vein, more stable, contains about $0.1 \text{ mg Chl m}^{-3}$. This situation compares very well with the CZCS image obtained by Morel and André [1991] in February.

Conversely, the model predicts elevated nitrate concentrations, even in the upper layer (average of 5.28 mmol m^{-3} and standard deviation of 1.98 mmol m^{-3}), as a result of mixing with deeper layers (Figure 5b). Such surface concentrations are commonly encountered at the end of winter, as stated by Minas *et al.* [1993], while higher figures ($8\text{--}9 \text{ mmol m}^{-3}$) would correspond to an exceptionally cold winter.

3.1.2. Spring bloom. The model predicts that the spring bloom starts in early March in surface waters and lasts about 1 month, progressively settling down. On March 19 for example, the surface chlorophyll *a* concentrations range between 0.5 and 3.5 mg m^{-3} and the distribution is patchy (Figure 6). These concentrations are very close to those measured in the same area by Travers [1975] and Minas and Blanc [1970], or observed by Morel and André [1991] during the spring bloom. However, most of these authors state that the spring bloom occurs in the Gulf of Lions at the beginning of April. Indeed, during the *Cybele* cruise (April 12–29, 1990), Cruzado and Velasquez [1992] measured rather homogeneous chlorophyll surface concentrations ranging from 0.5 to 2 mg m^{-3} , the deep chlorophyll maximum being located between 10- and 45-m depth. On the other hand, our model predicts that on April 11, the bloom has already disappeared from the surface layer and settled down to 15-m depth, which corresponds to a more advanced stage of seasonal evolution. This comparison leads us to the conclusion that the spring bloom is slightly anticipated by the model, although its amplitude and location (especially on the vertical) are correctly simulated. At this stage, it is difficult to determine the cause of this as the spring bloom is correctly simulated in the one-dimensional model. The reason for this anticipation may be that the physical forcings (temperature, motions) do not compare exactly with those prevailing during

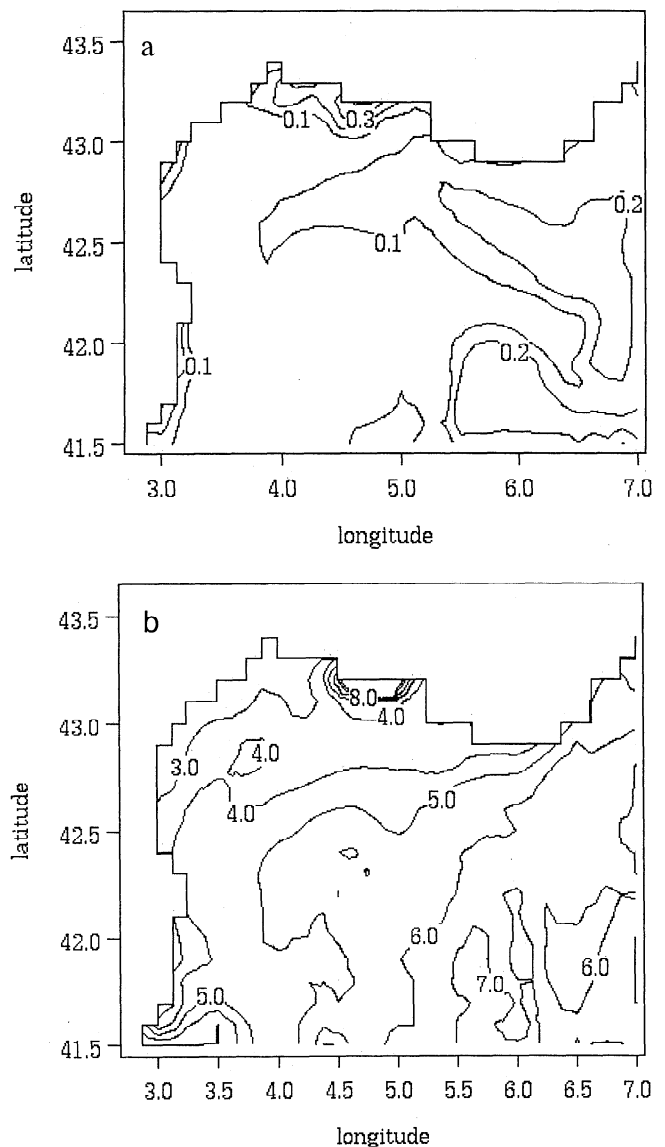


Figure 5. Initial surface field (February 1) obtained after 1 year of simulation. (a): Chlorophyll *a* (mg m^{-3}); (b) nitrate (mmol m^{-3}).

the observations. Indeed, the meteorological forcing we used corresponds to a mild winter (1991–1992), which could lead to an early spring bloom.

3.1.3. Summer regime. Very low surface biomass are predicted during summer, as nutrients have been exhausted. Phytoplankton development becomes sustained by both the remineralization of dissolved organic matter and by vertical diffusion of nutrients through the nutricline. Thus the bloom settles down and forms the deep chlorophyll maximum (DCM). In July, the model predicts that the DCM has deepened to 60-m depth and more (average chlorophyll *a* concentrations at 3-m depth of 0.06 mg m^{-3} and standard deviation of 0.25 mg m^{-3} ; at 70-m depth of 0.65 mg m^{-3} and standard deviation of 0.3 mg m^{-3}), as is usually observed in the western Mediterranean [Estrada, 1985] and in the Gulf of Lions [e.g., Minas and Blanc, 1970]. At the same time, the model predicts a nutricline located at about 60-m depth, which is supported by the observational data collected during

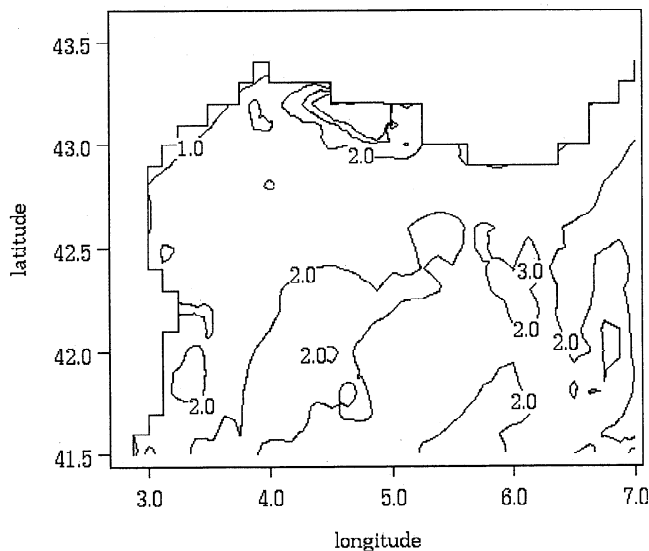


Figure 6. Chlorophyll *a* surface field simulated on March 19 (mg m^{-3}).

the *Bannock* cruise (July 1-15, 1989) by A. Cruzado (personal communication, 1996). Figure 7 displays the observed distribution of nitrate at 77-m depth (*Rhodiber* cruise, [Cruzado, 1991]) during September 1990 (Figure 7a), with the one predicted by the model on September 15 (Figure 7b). These two distributions are, of course, not identical but compare very well in that low concentrations (2 mmol m^{-3}) are in both cases encountered near the shallow northwestern coast. Higher concentrations ($5\text{--}6 \text{ mmol m}^{-3}$) punctually occur in the central part of the Gulf of Lions, owing to exchange with deeper layers. The order of magnitude of nitrate concentrations is quite satisfactory. This situation, typical of oligotrophic regimes, is maintained until the first autumnal mixing events break the thermocline.

3.1.4. Autumnal and Winter mixing. The autumnal thermocline erosion allows nutrients to come up in the upper layer and induce in some cases a secondary bloom, often less extensive than the spring one. This autumnal bloom eventually collapses with intense winter mixing, drawing out phytoplankton from the euphotic zone and coinciding with a decrease in light and temperature. *Morel and André* [1991] observed an early autumnal bloom (October) from Coastal Zone Color Scanner imagery. On the other hand, [1975] states that the autumnal bloom of the Gulf of Lions typically occurs in late November-early December. Our model predicts a secondary development of phytoplankton in December, as illustrated by Figure 8 (December 7), which has almost completely disappeared by mid-January (on January 13, average chlorophyll *a* surface concentration is 0.15 mg m^{-3} and standard deviation is 0.14 mg m^{-3}). After this last primary production event, biomass remains low in the surface layer, while the nutrient content progressively recovers its initial state due to mixing with the deeper layers.

3.2. Seasonal Variability of Primary Production

The model allows us to calculate daily and annual primary production rates: if a quantity ΔN (mmol N d^{-1}) has been taken up by phytoplankton during one day, we estimate that $\Delta N(12/14)(106/16) \text{ mg C}$ has been produced during the same

period [Redfield *et al.*, 1963]. This primary production is considered a gross primary production (GPP). Moreover, we are able to distinguish between new and regenerated production, depending on the nutrient (nitrate or ammonium) consumed.

We compare here the model results averaged over the area of the Gulf of Lions with the CZCS-derived GPP estimated by *Morel and André* [1991] during the year 1981 for the whole northwestern Mediterranean Sea (Figure 9a). This comparison seems to confirm that our model slightly anticipates the onset of the spring bloom on this particular experiment. However, it must be underlined that CZCS imagery relies on a satellite

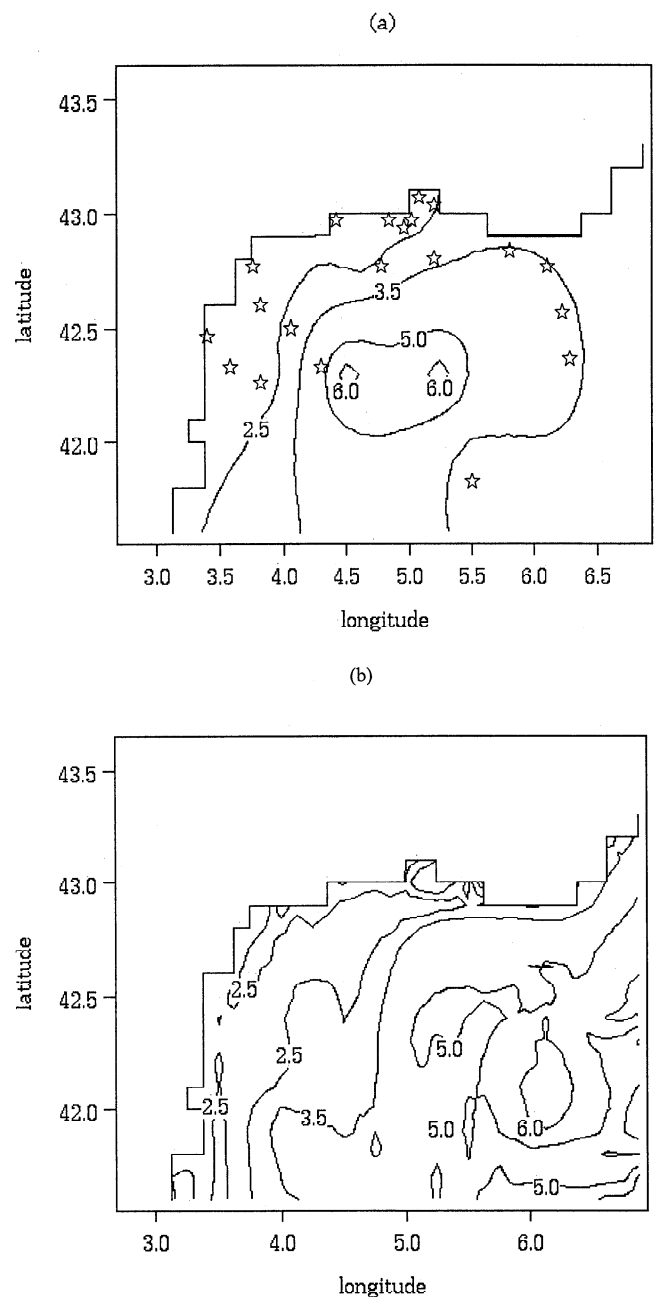


Figure 7. Nitrate fields (mmol m^{-3}) (a) obtained by Cruzado [1991] during the *Rhodiber* cruise (September) at 70-m depth (stars show the location of sampling stations) and (b) simulated at 77-m depth on September 15.

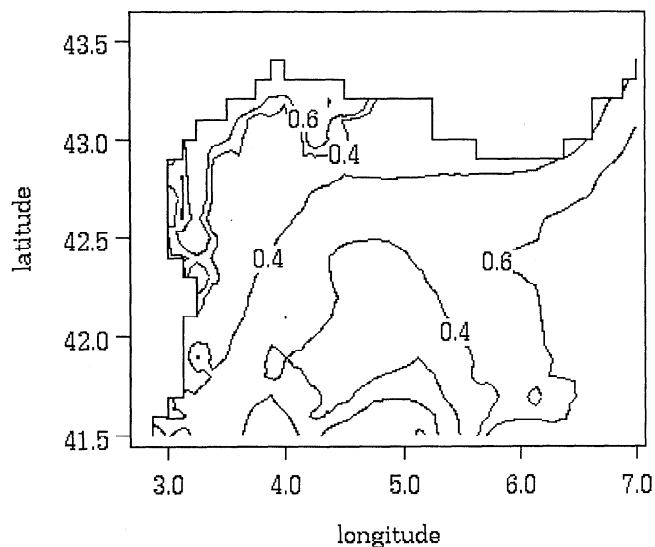


Figure 8. Chlorophyll *a* surface field simulated on December 7 (mg m^{-3}).

passage and are derived from chlorophyll *a* fluorescence, whereas our model computes a daily GPP. Despite the slight spring time lag, model results fit quite well with the CZCS-estimated primary production. It is particularly noticeable that our GPP values reach both the maxima and minima of the CZCS-estimated primary production. Indeed, *Morel and André* [1991] observed that in the Gulf of Lions, the seasonal amplitude of primary production could reach 1 : 20 (from 0.05 to 0.95 $\text{g C m}^{-2} \text{d}^{-1}$). We must keep in mind that the CZCS-derived primary production values are not observational data, but are related to surface chlorophyll concentrations through a production model [*Morel and André*, 1991]. However, it was the most relevant systematic comparison we could make owing to the regional coverage and the number of images.

4. Discussion: Budgets Calculation

4.1. Annual Budgets

It is rather difficult to estimate an annual mean primary production for a complex area like the Gulf of Lions. However, different values are proposed in the literature, sometimes for a more restricted area, and are partly listed and compared with our computations in Table 3.

The punctual data from which these figures are derived are displayed in Figure 9b. The annual primary production estimated by the model ($436 \text{ mg C m}^{-2} \text{y}^{-1}$) fits quite well with most of the observations, except with the very high figures obtained by *Conan* [1996]. Except for this author, in situ data appear generally lower than CZCS or model-derived ones. This could be linked to the partial spatio-temporal coverage of in situ measurements.

The main difference between our results and the previous estimations lies in the relative importance of the new (nitrate based) and regenerated (ammonium based) production. Indeed, we obtain an averaged *f* factor as high as 0.37, which is relatively high for the northwestern Mediterranean [*Minas et al.*, 1988]. However, *Fowler et al.* [1991] obtained, from

sediment-trap data, an *f* factor ranging from 0.17 to 0.42 in the vicinity of Monaco and stated that the coastal zone of the northwestern Mediterranean should not be considered oligotrophic. We come to the same conclusion and discuss below the importance of the various nitrate sources.

4.2. Budgets at the Seasonal Scale

The quasi-equilibrium obtained for all the biogeochemical compartments (Table 2) allows us to analyze the simulated fluxes at the annual scale. We present here the analysis of nitrate fluxes. This chemical species has been chosen for deeper analysis because it is of crucial importance for primary production and is particularly well documented in the Gulf of Lions and in the Rhône River. In the following discussion, we consider a “margin box”, defined as the upper 200 m of the portion of domain where depth is lower than 500 m (Figure 10a, in white). This area is considered representative for the margin of the Gulf of Lions, comprising the shelf and a part of the slope. Within this box, we compute daily-integrated nitrate fluxes along the year.

4.2.1. Seasonal variability of the fluxes. The model allows us to quantify daily-integrated nitrate fluxes due to biological uptake by phytoplankton (Bio), sediments release (sed), Rhône River discharge (Rhône), Vertical turbulent mixing (Mx), zonal (Z), meridional (M) and vertical advection (V) on a seasonal scale. The annual budget of these fluxes is given in Table 4 and in Figure 10b. Bio describes the gross community new production and exhibits a strong seasonal signal with two peaks of nitrate uptake at the beginning of April and in early December. The Rhône River discharge, despite its time-dependent description [*Tusseau and Mouchel*, 1995], appears almost constant throughout the year compared with the biological signal. Mx, which describes the nitrate fluxes due to winter convection, is negligible in the margin box all year long. Sed also exhibits a seasonal signal, as has already been stated by *Soetaert et al.* [1996b], and amounts to 133,000 tons of $\text{NO}_3\text{-N}$ per year. As a matter of comparison, *Middelburg et al.* [1996] estimate nitrate flux from the sediment shelf toward the water column to be $0.62 \mu\text{mol cm}^{-2} \text{d}^{-1}$, which would represent, at the scale of our margin box, about 500,000 tons of $\text{NO}_3\text{-N}$ per year. Note that numerically, the flux we call sed is equal to the quantity of nitrate “added or subtracted” in the bottom layer of the model in order to agree with the observations. Z and M are by far greater than the other fluxes, which underlines the predominance of horizontal transport in terms of mass balance. This transport is 10 times higher in winter than in summer, owing to the seasonality of both the water transport [*Alberola et al.*, 1995] and the nitrate concentrations in the surface layers. Z and M roughly compensate each other, Z being a positive flux entering the Gulf of Lions at the eastern boundary, and M being the negative flux going out of the Gulf at the southern boundary. V is also strongly correlated to the water transport, which is highly seasonal, as shown in Figure 2. This vertical transport is due to the cascading of dense waters which occurs mainly in winter and is directed toward the bottom, as specified above.

4.2.2. Transport versus biogeochemical fluxes. In order to understand the global annual fluxes displayed in Table 4 and Figure 10b, we will focus on three particular cases (Figures 11a, 11b and 11c) that allow us to analyze the interactions and the relative importance of transport and

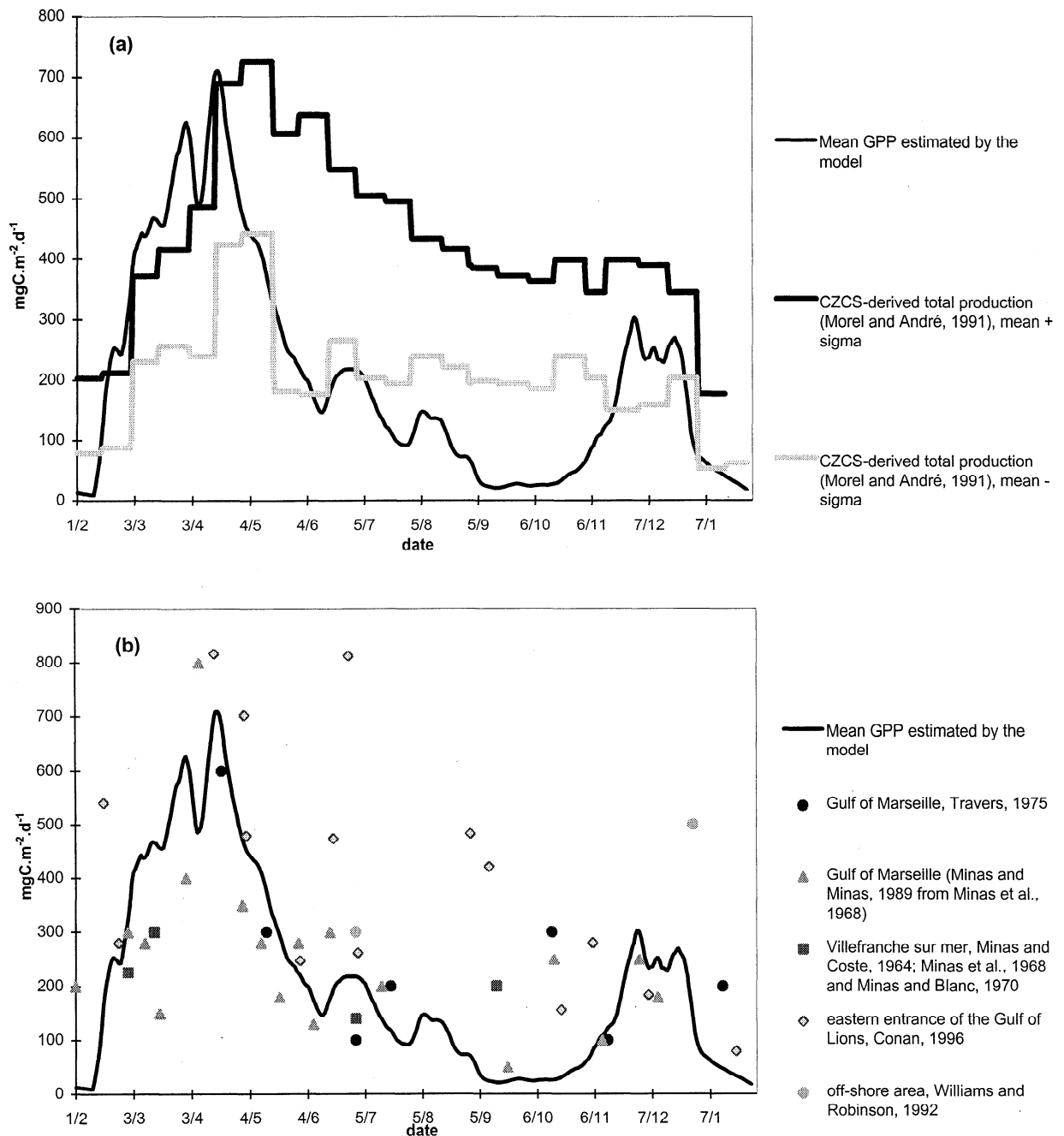


Figure 9. Seasonal variations of spatially averaged gross community production estimated by the model in $\text{mgC} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ (thin solid line) compared with (a) CZCS-derived total production [after *Morel and André, 1991*] (thick solid line : average plus standard deviation, thick gray line : average minus standard deviation) and (b) pinpoint production data obtained in the area of the Gulf of Lions [after *Conan, 1996*; *Minas and Coste, 1964*; *Minas et al., 1968*; *Minas and Blanc, 1970*; *Minas and Minas, 1989* and *Travers, 1976*; *Williams and Robinson, 1992*].

biogeochemical processes. As was mentioned earlier, nitrate transport fluxes (Z , M , V) are by 1 order of magnitude greater than the other fluxes. However, owing to the nondivergence of the flow, the water transport fluxes exactly compensate, i.e., $Z_w + M_w + V_w = 0$. Whenever this is not true for nitrate transport fluxes, this reflects a disequilibrium between the nitrate concentrations inside and outside the margin box.

Figure 11a displays mean daily fluxes of nitrate calculated over the period of April 10-20, during the spring bloom.

($Z + M + V$) is strictly positive (+350 tons of $\text{NO}_3\text{-N}$ per day), which means that the advective exchanges of the margin box with the offshore area result in a gain for the margin box. In other words, the surface nitrate concentrations must be globally higher in the offshore area than in the margin box, despite the local enrichment due to the Rhône River (+260 tons of $\text{NO}_3\text{-N}$ per day). Indeed, during the spring bloom, new primary production is more active in the coastal zone than offshore (436 $\text{mg} \cdot \text{C} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ and 233 $\text{mg} \cdot \text{C} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$,

Table 3. Annual Total and New Primary Production Estimated by Various Authors in the Area of the Gulf of Lions

Area	Minas [1970]. and Minas et al. [1988]	Travers [1975]	Minas and Minas [1989] [from Minas, 1968]	Morel and André [1991]	Conan [1996]	Lefèvre et al. [1997] (Review)	This Study
	Eastern entrance of the Gulf of Lions	Gulf of Marseille	Gulf of Marseille	northwestern Mediterranean Sea	Gulf of Marseille (offshore)	Gulf of Lions	Gulf of Lions
Annual primary production	78 g C m ⁻² y ⁻¹	82 g C m ⁻² y ⁻¹	88 g C m ⁻² y ⁻¹	106 g C m ⁻² y ⁻¹	120-180 g C m ⁻² y ⁻¹	78-106 g C m ⁻² y ⁻¹	76 g C m ⁻² y ⁻¹
Annual new primary production	18 g C m ⁻² y ⁻¹ <i>f</i> = 0.23				36-72 g C m ⁻² y ⁻¹ <i>f</i> = 0.30		45 g C m ⁻² y ⁻¹ <i>f</i> = 0.37

respectively, only 88 mg C m⁻² d⁻¹ being attributed to the Rhône River contribution in the margin box), leading to a stronger depletion of nitrate in the margin box than offshore. For this period, new primary production is sustained in the coastal zone by both the Rhône River discharge and oceanic input. The margin appears as a sink for dissolved oceanic nitrate that is consumed there because of propitious conditions for phytoplankton growth.

Figures 11b and 11c display two different situations occurring in winter. In both cases, new primary production is very low (10 tons of NO₃-N are consumed per day), owing to the season. However, in the first case (Figure 11b, January 1-10), sediment release represents a major source of nitrate to the margin box (+1420 tons of NO₃-N per day), which is not locally consumed by the biology. By this time, cascading of dense waters along the shelf is very important (Figure 2) and washes out this excess of nitrate toward the offshore intermediate waters. Indeed, in this case, the margin box appears as a source of dissolved nitrate to the open sea (+2000 tons of NO₃-N per day). On the contrary, in the second winter case, 10 days later (Figure 11c, January 20-30), winter mixing has occurred in the offshore area, leading to the enrichment of the surface waters advected onto the margin ($Z = 15,000$ tons of NO₃-N per day during winter 1). Average nitrate surface concentrations are now lower in the margin box, and this disequilibrium

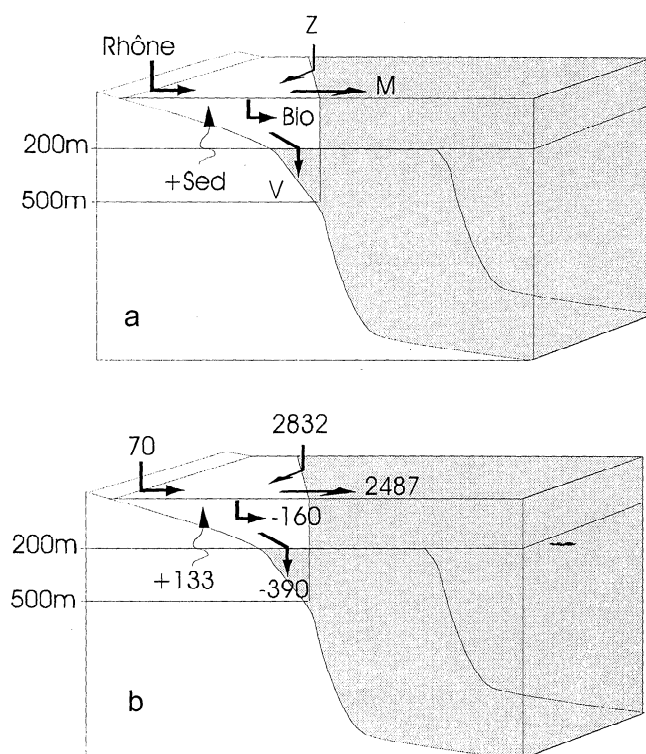


Figure 10. Schematic description of the margin box (200 upper meters where depth is less than 500 m) indicating (a) the nitrate fluxes: biological uptake by phytoplankton (Bio), sediments release (sed), Rhône river discharge (Rhône), and zonal (Z), meridional (M), and vertical advection (V) (b) the annual nitrate budgets integrated for each flux. Vertical turbulent mixing (Mx) flux (0.3 thousands of tons of NO₃-N) is not indicated.

Table 4. Integrated Annual Fluxes of Nitrate Predicted by the Model (Thousands of Tons of $\text{NO}_3\text{-N}$) Through the Margin Box (Figure 8)

Type of Flux	Annual Budget
Bio	- 159
Sed	+ 133
Rhône	+ 71
Mx	(+ 0.3)
Z	+ 2832
M	- 2487
Z + M	+ 345
V	- 390
Z + M + V	- 45
Total	(- 0.1)

The last row displays the global annual budget of nitrate for the margin box, which would be equal to zero if the model would be fully stationary.

tends to compensate the positive transport budget of nitrate. It is interesting to note that the winter convection mixing occurs not in the shallow part of the Gulf of Lions, but offshore, where it brings up about 28,000 tons of $\text{NO}_3\text{-N}$ per year within 2 months. The advective relay is needed before these nitrates can reach the inner shelf.

These three different cases show the complexity and the seasonal variability of the mechanisms responsible for the exchanges between the margin box and the open sea. Yearly integrated fluxes are given in Table 4.

5. Conclusion

In order to get a better understanding of the biogeochemical functioning of the open margin in the Gulf of

Lions, we developed a three-dimensional biogeochemical model. After 1 year of spin-up run, the model has reached quasi steady state for the 13 biogeochemical compartments and has been run another complete year for this study. Chlorophyll, nitrate, and primary production results are shown to fit rather well with the data previously collected in the area. The model may slightly anticipate the onset of the spring bloom, but at this stage it is not clear whether this shortcoming is due to the meteorological forcing we used (winter 1991-1992) or to some of the biogeochemical parameters. Further simulations should allow us to clarify this point. The present simulation was nevertheless used for diagnostic purposes. Total gross primary production is estimated at $76 \text{ g C m}^{-2} \text{ y}^{-1}$ on average over the whole area of simulation ($2.5\text{-}7^\circ\text{E} \times 41.5\text{-}43^\circ\text{N}$), 37% of which being new gross community production. This last figure confirms that the Gulf of Lions should not be considered as oligotrophic as the global northwestern Mediterranean, due to the Rhône River input, the local remineralization in the sediments, and the winter convection mixing, all providing nitrate to the water column.

Daily and annual nitrate fluxes computed through the margin box show the relative importance of transport versus biogeochemical processes. Advective fluxes are huge but tend to compensate each other. Comparing the net advective fluxes to the other ones, we show that, most of the time, the margin acts as a sink of dissolved nitrate for the off-shore Mediterranean. However, during winter, when phytoplankton growth is reduced and the cascading of dense waters is active along the shelf, the margin is shown to be a source of nitrate toward the open sea. These results may apply to other Mediterranean coastal environments that would be isolated enough that primary production would be favored, but also linked to the open sea through the general circulation, so that the coastal excess of nutrients could be exported in winter.

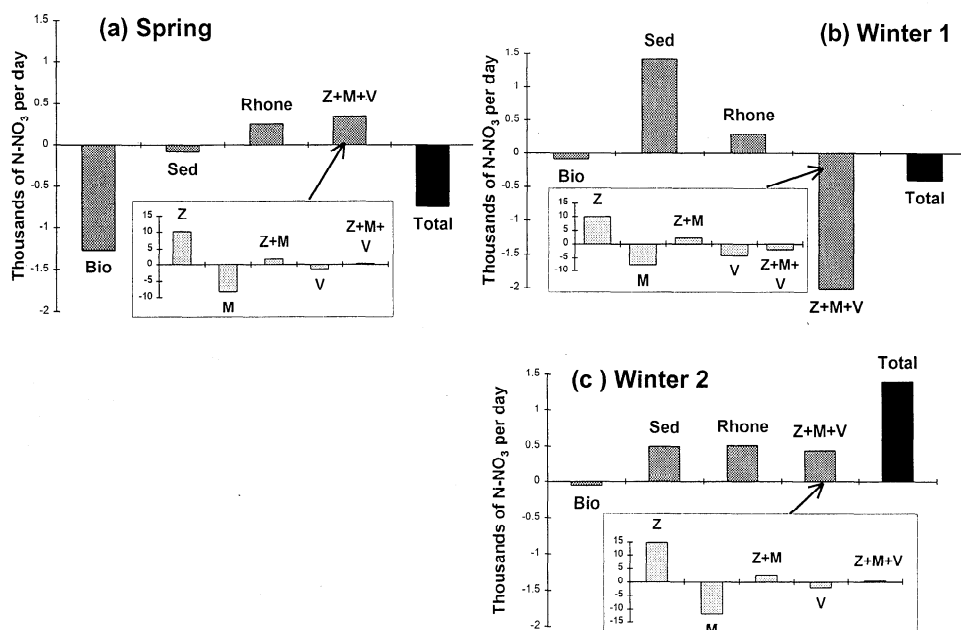


Figure 11. Daily nitrate fluxes through the margin box averaged over (a) April 10-20 (spring), (b) January 1-10 (winter 1), and (c) January 20-30 (winter 2). Fluxes are expressed in thousands of tons of $\text{NO}_3\text{-N}$ per day. Detailed information on the advective fluxes is given in the smaller enclosed frame. Please note the different scales.

Table A1. Biogeochemical Forcings

Parameter	Units
T , temperature	°C
u , zonal velocity	m s^{-1}
v , meridional velocity	m s^{-1}
w , vertical velocity	m s^{-1}
K_{xy} , horizontal diffusion coefficient	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
K_z , vertical diffusion coefficient	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
I , Photosynthetically available irradiance	$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Depending on the characteristics of the region (continental enrichment, sediment response, winter mixing, intensity of the circulation), the fluxes would be more or less pronounced, but we may expect that the coastal zone would also alternatively appear as a source or a sink of nitrate.

Indeed, the importance of the export flux is directly linked to the nutrients released from the sediments, that is, at this stage, roughly parameterized. Additional observational data and modeling developments are now needed in order to understand exchanges at the water/sediment interface. We show that sediment release may have a completely different

fate depending on the season at which it occurs (being either locally consumed or exported toward the open sea). Observation campaigns focusing on these particular periods would greatly help in assessing the global biogeochemical cycles.

As far as modeling efforts are concerned, further development of our model will include (in the framework of the E.U. METRO-Med project) the coupling of the existing pelagic model with a regional early diagenesis model [Soetaert *et al.*, 1996a].

Appendix

The equations for the evolution of phytoplankton compartments are generally similar for diatoms and flagellates, the values of the parameters being different for each group. Whenever possible, these equations are described only once, using the generic names PHY_S, PIY_R and PHY_F instead of Dia_S, Dia_R, Dia_F and Fl_S, Fl_R, Fl_F. The biogeochemical forcings are listed in Table A1.

The compartments evolve according to the following differential equations (the numbering refers to the numbering of the variables given in Table 1).

Table A2. Phytoplankton Parameters

Parameter	Description	Diatoms	Flagellates
Q_S	cellular quota of PHY_S/PHY_F	0.075 (n.d.)	0.075 (n.d.)
$N:C_F$	nitrogen over carbon mass ratio of PHY_F	0.2 (n.d.)	0.23 (n.d.)
$Si:C_F$	silicate over carbon mass ratio of PHY_F	0.4 (n.d.)	0. (n.d.)
amm_{upt}	ammonium fraction of nitrogen uptake $\text{amm}_{\text{upt}} = \text{rpi} + (1 - \text{rpi}) \left[\frac{\text{NH}_4}{\text{NH}_4 + \text{NO}_3} \right]$		
rpi	relative preference index (for ammonium uptake)	0.05 (n.d.)	0.1 (n.d.)
slp	detrital fraction of grazing (« sloppy feeding »)	0.1 (n.d.)	0.1 (n.d.)
g	grazing constant $g = g_{\text{min}}$ for $T < T_1$ $g = g_{\text{min}} \times (1 + C(T - 14/6))$ for $T_1 < T < T_2$ $g = g_{\text{max}}$ for $T_2 < T$		
$g_{\text{min}} - g_{\text{max}}$	extreme grazing constants	0.005-0.01 hour^{-1}	0.0065-0.036 hour^{-1}
T_1, T_2	grazing parametrization temperatures	15°-23°C	15°-23°C
K_{max}	maximum rate of photosynthesis $K_{\text{max}} = K'_{\text{max}} e^{\left(\frac{T - T_{\text{opt}}}{T_{\text{width}}}\right)}$		
K'_{max}	maximum rate of photosynthesis at optimal temperature	0.25 hour^{-1}	0.23 hour^{-1}
α	photosynthetic efficiency $\alpha = K_{\text{max}} / I_{\text{opt}}$		
I_{opt}	optimal irradiance	158 $\mu\text{E m}^{-1} \text{s}^{-1}$	163 $\mu\text{E m}^{-1} \text{s}^{-1}$
ρ_{max}	maximum storage rate $\rho_{\text{max}} = \rho'_{\text{max}} e^{\left(\frac{T - T_{\text{opt}}}{T_{\text{width}}}\right)}$		
ρ'_{max}	maximum storage rate at optimal temperature	0.23 hour^{-1}	0.23 hour^{-1}
μ_{max}	maximum growth rate $\mu_{\text{max}} = \mu'_{\text{max}} e^{\left(\frac{T - T_{\text{opt}}}{T_{\text{width}}}\right)}$		
μ'_{max}	maximum growth rate at optimal temperature	0.052 hour^{-1}	0.052 hour^{-1}
T_{opt}	optimal temperature	13.9°C	13.9°C
T_{width}	sigmoid width	3°C	3.5°C
K_{self}	half-saturation constant regarding S_{eff}	0.075 mg C m^{-3}	0.075 mg C m^{-3}
K_{Si}	half-saturation constant regarding Si	1. mmol m^{-3}	
K_{N}	half-saturation constant regarding nitrogen	1.2 mmol m^{-3}	0.8 mmol m^{-3}
k_1	basal respiration rate	0.0005 hour^{-1}	0.0005 hour^{-1}
k_2	motility respiration rate	0. hour^{-1}	0.00001 hour^{-1}
k_R	catabolism rate	0.06 hour^{-1}	0.06 hour^{-1}
e	exudation rate	0.005 hour^{-1}	0.005 hour^{-1}
l	lysis rate	0.0005 hour^{-1}	0.002 hour^{-1}
sed_Dia	diatoms sedimentation rate	2.2 $\text{E}^{-4} \text{m s}^{-1}$	

Abbreviation n.d. indicates dimensionless.

Table A3. Microbial Loop Parameters

Parameter	Description	Value
$N : C_B$	nitrogen over carbon ratio in bacteria	0.25 (n.d.)
$N : C_{HP}$	nitrogen over carbon ratio in herbivoran protozoa	0.22 (n.d.)
$N : C_{BP}$	nitrogen over carbon ratio in bacterivore protozoa	0.25 (n.d.)
Y_B	bacteria growth yield	0.3(n.d.)
Y_{HP}	herbivoran protozoa growth yield	0.38 (n.d.)
Y_{BP}	bacterivore protozoa growth yield	0.38 (n.d.)
b_{max}	maximum rate of bacterial uptake	
	$b_{max} = b'_{max} e^{-\left(\frac{T-T_{opt}}{T_{width}}\right)}$	
b'_{max}	maximum rate of storage at optimal temperature	0.18 hour ⁻¹
h_{max}	hydrolysis maximum rate	
	$h_{max} = h'_{max} e^{-\left(\frac{T-T_{opt}}{T_{width}}\right)}$	
h'_{max}	maximum rate of hydrolysis at optimal temperature	0.6 hour ⁻¹
T_{opt}	optimal temperature	30.°C
T_{width}	sigmoid width	18.°C
K_{MS}	half saturation constant regarding the uptake of MS	10 mg C m ⁻³
K_H	half saturation constant regarding the hydrolysis of H	150 mg C m ⁻³
m_B	bacteria mortality rate	0.01 hour ⁻¹

A1. NO₃: Nitrate Concentration (Variable 1)

In millimoles per cubic meter,

$\partial_t \text{NO}_3 + u \partial_x \text{NO}_3 + v \partial_y \text{NO}_3 + w \partial_z \text{NO}_3 - K_{xy} (\partial_x^2 \text{NO}_3 + \partial_y^2 \text{NO}_3) - K_z \partial_z^2 \text{NO}_3 = -$ nitrate consumption, where nitrate consumption is $\sum_{Diat.FI} \text{growth} \times N : C_F \times (1 - \text{amm}_{opt})$, (growth is described below). Parameters are given in Table A2.

A2. NH₄: Ammonium Concentration (Variable 2)

In millimoles per cubic meter,

$\partial_t \text{NH}_4 + u \partial_x \text{NH}_4 + v \partial_y \text{NH}_4 + w \partial_z \text{NH}_4 - K_{xy} (\partial_x^2 \text{NH}_4 + \partial_y^2 \text{NH}_4) - K_z \partial_z^2 \text{NH}_4 = -$ ammonium consumption + grazers regeneration + bacterial regeneration + bacterivore protozoa regeneration, where ammonium consumption is $\sum_{Diat.FI} \text{growth} \times N : C_F \times \text{amm}_{opt}$, (growth is described below). Grazers regeneration is $\sum_{Diat.FI} (1 - \text{slp})g \times N : C_F \times \text{PHY}_F(N : C_F - Y_{HP} N : C_B)$. Bacterial regeneration is $b_{max} [MS / (K_{MS} + MS)] B(N : C_{MS} - Y_B N : C_B)$. Bacterivore protozoa regeneration is $m_B (N : C_B - Y_{BP} N : C_{BP})$. Parameters are given in Table A2 and Table A3.

A3. Si: Silicate Concentration (Variable 3)

In millimoles per cubic meter,

$\partial_t \text{Si} + u \partial_x \text{Si} + v \partial_y \text{Si} + w \partial_z \text{Si} - K_{xy} (\partial_x^2 \text{Si} + \partial_y^2 \text{Si}) - K_z \partial_z^2 \text{Si} = -$ silicate consumption + detritic silicate remineralisation, where silicate consumption is $\text{Dia growth} \times \text{Si} : C_F$ (growth is described below) and detritic silicate remineralisation is $\text{rem} \times \text{Dsi}$. Parameters are given in Table A2 and Table A4.

A4. DSi: Detritic Silicate Concentration (Variable 4)

In millimoles per cubic meter,

$\partial_t \text{DSi} + u \partial_x \text{DSi} + v \partial_y \text{DSi} + w \partial_z \text{DSi} - K_{xy} (\partial_x^2 \text{DSi} + \partial_y^2 \text{DSi}) - K_z \partial_z^2 \text{DSi} =$ detritic silicate production - detritic silicate remineralization - sedimentation, where detritic silicate production is $\text{Dia}_F \times \text{Si} : C_F (1 + \text{slp} \times g)$, detritic silicate remineralisation is $\text{rem} \times \text{DSi}$, and sedimentation is $\text{sed}_{DSi} \times \partial_z \text{DSi}$. Parameters are given in Table A2 and Table A4.

A5. Phytoplankton Small Metabolites Concentration (Variables 5 and 8).

In milligrams of carbon per cubic meter,

$\partial_t \text{PHY}_S + u \partial_x \text{PHY}_S + v \partial_y \text{PHY}_S + w \partial_z \text{PHY}_S - K_{xy} (\partial_x^2 \text{PHY}_S + \partial_y^2 \text{PHY}_S) - K_z \partial_z^2 \text{PHY}_S =$ photosynthesis - stock + catabolism - growth - respiration - exudation - lysis - grazing - sedimentation, where photosynthesis is $K_{max} (1 - e^{-\mu/K_{max}}) \text{PHY}_F$, stock is $\rho_{max} [S_{eff} / (K_{seff} + S_{eff})] \text{PHY}_F$, catabolism is $k_r \text{PHY}_R$, growth (for diatoms) is $\mu_{max} [S_{eff} / (K_{seff} + S_{eff})] \min \{ [Si / (K_{Si} + Si)] , [(NH_4 + NO_3) / (K_N + NH_4 + NO_3)] \} \text{Dia}_F$, growth (for flagellates) is $\mu_{max} [S_{eff} / (K_{seff} + S_{eff})] [(NH_4 + NO_3) / (K_N + NH_4 + NO_3)] \text{FI}_F$, respiration is $(k_1 + k_2) \text{PHY}_F + 0.4 \{ 2 - \text{rpi} + (1 - \text{rpi}) [NH_4 / (NH_4 + NO_3)] \} \times \text{growth}$, exudation is $e \times \text{PHY}_S$, lysis is $l \times \text{PHY}_S$, grazing is $g \times \text{PHY}_S$, and sedimentation (diatoms only) is $\text{sed}_{Diat} \times \partial_z \text{PHY}_S$. Parameters are given in Table A2 and Table A4.

A6. Phytoplankton Reserves Concentration (Variables 6 and 9)

In milligrams of carbon per cubic meter,

$\partial_t \text{PHY}_R + u \partial_x \text{PHY}_R + v \partial_y \text{PHY}_R + w \partial_z \text{PHY}_R - K_{xy} (\partial_x^2 \text{PHY}_R + \partial_y^2 \text{PHY}_R) - K_z \partial_z^2 \text{PHY}_R =$ stock - catabolism - lysis - grazing - sedimentation, where stock is $\rho_{max} [S_{eff} / (K_{seff} + S_{eff})] \text{PHY}_F$, catabolism is $k_r \text{PHY}_R$, lysis is $l \times \text{PHY}_R$, grazing is $g \times \text{PHY}_R$, and sedimentation (diatoms only) is $\text{sed}_{Diat} \times \partial_z \text{PHY}_R$. Parameters are given in Table A2 and Table A4.

Table A4. Other Parameters

Parameter	Description	Value
rem	silicate remineralization rate	0.016 hour ⁻¹
sed-Dsi	sedimentation of detritic silica	0.00022 hour ⁻¹

A7. Phytoplankton Functional Molecules Concentration (Variables 7 and 10)

In milligrams of carbon per cubic meter,

$$\partial_t \text{PHY_F} + u \partial_x \text{PHY_F} + v \partial_y \text{PHY_F} + w \partial_z \text{PHY_F} - K_{xy} (\partial_x^2 \text{PHY_F} + \partial_y^2 \text{PHY_F}) - K_z \partial_z^2 \text{PHY_F} = \text{growth} - \text{lysis} - \text{grazing} - \text{sedimentation}$$
, where growth (for diatoms) is $\mu_{\max} [S_{\text{eff}} / (K_{\text{seff}} + S_{\text{eff}})] \min\{[Si / (K_{Si} + Si)], [(NH_4 + NO_3) / (K_N + NH_4 + NO_3)]\} \text{Dia_F}$, growth (for flagellates) is $\mu_{\max} [S_{\text{eff}} / (K_{\text{seff}} + S_{\text{eff}})] [(NH_4 + NO_3) / (K_N + NH_4 + NO_3)] \text{Fl_F}$, lysis is $l \times \text{PHY_F}$, grazing is $g \times \text{PHY_F}$, and sedimentation (diatoms only) is $\text{sed_Dia} \times \partial_z \text{PHY_F}$. Parameters are given in Table A2 and Table A4.

A8. MS : Monomeric Dissolved Organic Matter (Variable 11)

In milligrams of carbon per cubic meter,

$$\partial_t \text{MS} + u \partial_x \text{MS} + v \partial_y \text{MS} + w \partial_z \text{MS} - K_{xy} (\partial_x^2 \text{MS} + \partial_y^2 \text{MS}) - K_z \partial_z^2 \text{MS} = \text{hydrolysis} - \text{uptake} + \sum_{\text{Din.FI}} (\text{lysis} + \text{exudation})$$
, where hydrolysis is $h_{\max} [H / (K_H + H)] B$, uptake is $b_{\max} [MS / (K_{MS} + MS)] B$, and $\sum_{\text{Din.FI}} (\text{lysis} + \text{exudation})$ is $\sum_{\text{Din.FI}} \text{PHY_S} \times (e + l)$. Parameters are given in Table A2 and Table A3.

A9. Polymeric Dissolved Organic Matter (Variable 12)

In milligrams of carbon per cubic meter,

$$\partial_t H + u \partial_x H + v \partial_y H + w \partial_z H - K_{xy} (\partial_x^2 H + \partial_y^2 H) - K_z \partial_z^2 H = - \text{hydrolysis} + \sum_{\text{Din.FI}} \sum_{(\text{PHY_R, PHY_F})} (\text{lysis} + \text{slp} + \text{grazing})$$
, where hydrolysis is $h_{\max} [H / (K_H + H)] B$, $\sum_{\text{Din.FI}} \sum_{(\text{PHY_R, PHY_F})} (\text{lysis} + \text{slp} + \text{grazing})$ is $\sum_{\text{Din.FI}} (\text{PHY_R} + \text{PHY_F}) \times (l + \text{slpg})$. Parameters are given in Table A2 and Table A3.

A10. Bacteria Biomass (Variable 13)

In milligrams of carbon per cubic meter,

$$\partial_t B + u \partial_x B + v \partial_y B + w \partial_z B - K_{xy} (\partial_x^2 B + \partial_y^2 B) - K_z \partial_z^2 B = Y_B \text{uptake} - \text{bacterial mortality}$$
, where uptake is $b_{\max} [MS / (K_{MS} + MS)] B$, and mortality is $m_B \times B$. Parameters are given in Table A3.

Acknowledgments. Antonio Cruzado and Lei Chou are greatly acknowledged for their help in gathering the nutrient and chlorophyll data collected during the E.U. EROS 2000 project (MAST-0016-C and STEP-CT90-0080). Alain Thomas, Roland Wollast, and three anonymous reviewers are kindly acknowledged for their comments on an earlier version of this manuscript. Cathy O'Riordan was kind enough to help with revising the English of the paper, and Philippe Prat to help with designing the Figures. Computations have been realized thanks to the supercomputing facilities available at I.D.R.I.S (France). This work is a contribution to the ELOISE program (ELOISE #57) in the framework of the METRO-Med project carried out under contract MAST3-CT96-0049, and it was also partially supported by MATER MAST3-CT960051.

References

Aksnes, D. L., and U. Lie, A coupled physical-biological pelagic model of a shallow sill fjord, *Estuarine Coastal Shelf Science*, **31**, 459-486, 1990.
 Albérola, C., C. Millot, and J. Font, On the seasonal and mesoscale variabilities of the Northern Current during the PRIMO-0 Experiment in the western Mediterranean. *Oceanol. Acta*, **18**, 163-192, 1995.
 Baretta, J. W., P. Ruardij, H. J. Vested, and J. G. Baretta-Bekker, Eutrophication modelling of the North Sea: Two different approaches, *Ecol. Modell.*, **75-76**, 471-484, 1994.

Billen, G. et P. Servais, Modélisation des processus de dégradation de la matière organique en milieu aquatique, in *Micro-organismes dans les Ecosystèmes Océaniques*, edited by M. Bianchi et al., pp. 219-245, Masson, Paris, 1989.
 Billen, G., Protein degradation in aquatic environment, in *Microbial enzymes in Aquatic Environment*, edited by R. Chrost, Springer Verlag, pp. 123-143, 1991.
 Blanke, B., and P. Delecluse, Variability of the tropical Atlantic Ocean simulated by a general circulation model with two different mixed-layer physics, *J. Phys. Oceanogr.*, **23**, 1363-1388, 1993.
 Conan, P., Variabilité et bilan de la production primaire en zone côtière (Méditerranée nord-occidentale; entrée du Golfe du Lion) en relation avec les systèmes biologique, chimique et hydrodynamique (courant Nord Méditerranée), thèse de doctorat, 185 pp., Université de la Méditerranée, Marseille, 1996.
 Crépon, M., M. Boukthir, B. Barnier, and F. Aikman, Horizontal ocean circulation forced by deep-water formation. Part I, Analytical study, *J. Phys. Oceanogr.*, **19**, 1781-1792, 1989.
 Cruzado, A., Results of nutrients analysis in the NW Mediterranean Sea, "Rhodiber" Cruise Preliminary Report (Leg II: 15-30 September 1990), edited by A. Cruzado, pp. 67-77, Centre d'Etudes Avancés de Blanes, Blanes, 1991.
 Cruzado, A., and Z. R. Vclasquez, Nutrients and phytoplankton pigments in the northwestern Mediterranean during "Cybele" cruise (12-29 April 1990), in *Waters Pollut. Res. Rep. 28, 3rd EROS 2000 Workshop*, edited by J.-M. Martin and H. Barth, pp. 139-150, Commission of the European Communities, Brussels, 1992.
 Dortch, Q., and J.R. Postel, Phytoplankton-nitrogen interactions, in *Coastal Oceanography of Washington and Oregon*, edited by M. R. Landry and B. M. Hickey, pp. 139-173, Elsevier, New York, 1989.
 Estrada, M., Primary production at the deep chlorophyll maximum in the western Mediterranean, in *Proceedings of the 19th Marine Biology Symposium*, edited by P. E. Gibbs, pp. 109-121, Cambridge Univ. Press, New York, 1985.
 Fasham, M. J. R., J.L. Sarmiento, R.D. Slater, H.W. Ducklow, and R. Williams, Ecosystem behavior at station "S" and ocean weather station "India": A general circulation model and observational analysis, *Global Biogeochem. Cycles*, **7**, 379-415, 1993.
 Fioux, M., Contribution à l'étude hydrologique et dynamique du Golfe du Lion en période hivernale, 90 pp., thèse de la Faculté des Sci. de Paris, Paris, 1972.
 Fowler, S., L. F. Small, and J. La Rosa, Seasonal particulate carbon flux in the coastal northwestern Mediterranean Sea, and the role of phytoplankton fecal matter, *Oceanol. Acta*, **14**, 77-85, 1991.
 Gascard, J. C., Mediterranean deep waters formation, baroclinic instabilities and oceanic eddies, *Oceanol. Acta*, **3**, 315-330, 1978.
 Herbaut, C., Etude de la circulation océanique en Méditerranée Occidentale, thèse de doctorat, 108 pp., Univ. Paris VI, Paris, 1994.
 Herbaut, C., L. Mortier, and M. Crépon, A sensitivity study of the general circulation of the western Mediterranean Sea, Part I, The response to density forcing through the straits, *J. Phys. Oceanogr.*, **26**, 65-84, 1996.
 Herbaut, C., F. Martel, and M. Crépon, A sensitivity study of the general circulation of the western Mediterranean Sea, Part II, The response to atmospheric forcing, *J. Phys. Oceanogr.*, **27**, 2126-2145, 1997.
 Imbard, M., and M. Joly, The Périodot, fine-mesh numerical weather prediction system description, evaluation and experiments, oral presentation at WMO/IUGG NWP Symposium, Tokyo, 1986.
 Kokkinakis, S. A., and P. A. Wheeler, Up-take of ammonium and urea in the northeast Pacific: Comparison between ret and nanophytoplankton, *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, **43**, 113-124, 1988.
 Lancelot, C., and S. Mathot, Biochemical fractionation of primary production by phytoplankton coastal waters during short and long term incubations with ¹⁴C-bicarbonate, I, Mixed diatom population, *Mar. Biol.*, **86**, 219-226, 1985.
 Lancelot, C., D. Le Roy, and G. Billen, The dynamics of *Phaeocystis* blooms in nutrient enriched coastal zones of the Channel and the North Sea, *3rd Annual Progress Report*, 62 pp., Univ. Libre de Bruxelles, Brussels, 1991a.
 Lancelot, C., C. Veth, and S. Mathot, Modelling ice-edge

- phytoplankton bloom in the Scotia-Weddel Sea sector of the Southern Ocean during spring 1988, *J. Mar. Syst.*, 2, 333-346, 1991b.
- Lefevre, D., H.-J. Minas, M. Minas, R. Robinson, P.J. le B. Williams, and E.M.S. Woodward, Review of gross community production, primary production, net community production and dark community respiration in the Gulf of Lions, *Deep Sea Res.*, 44, 801-832, 1997.
- Lévy, M., L. Mémy, and J.-M. André, Validation et simplification d'un modèle biogéochimique 1D en Méditerranée, in Joint Workshop JGOFS-PNEDC, *Rep.* 22, edited by C. Rabouille, pp. 43-46, Université Paris VI, Paris, 1995.
- Mackenzie, F. T. et al., What is the importance of ocean margin processes in global change?, in *Ocean Margin Processes in Global Change*, edited by R. F. C. Mantoura, J.-M. Martin, and R. Wollast, pp. 433-454, John Wiley & Sons Ltd, New York, 1991.
- Madec, G., M. Chartier, and M. Crépon, Effect of thermohaline forcing variability on deep water formation in the western Mediterranean Sea: a high resolution three dimensional numerical study, *Dyn. Atmos. Oceans*, 15, 301-332, 1991a.
- Madec, G., M. Chartier, P. Delecluse, and M. Crépon, A three-dimensional numerical study of deep water formation in the northwestern Mediterranean Sea, *J. Phys. Oceanogr.*, 21, 1349-1371, 1991b.
- Malone, T. C., Algal size, in *The Physiological Ecology of Phytoplankton*, edited by I. Morris, pp. 433-463, Blackwell Sci., Cambridge, Mass., 1980.
- Middelburg, J., K. Soetaert, P. Hermann, and C. Heip, Denitrification in sediments: A model study, *Global Biogeochem. Cycles*, 10, 661-673, 1996.
- Millero, F. S., and A. Poisson, An international one-atmosphere equation of state of sea water, *Deep Sea Res.*, 28A, 625-629, 1981.
- Millot, C., Some features of the Algerian current, *J. Geophys. Res.*, 90, 7169-7176, 1985.
- Millot, C., The Gulf of Lions' hydrodynamics, *Cont. Shelf Res.*, 10, 885-894, 1989.
- Minas, H. J., La distribution de l'oxygène en relation avec la production primaire en Méditerranée nord-occidentale, *Mar. Biol.*, 7, 181-204, 1970.
- Minas, H. J., and F. Blanc, Production organique primaire au large des côtes Méditerranéennes françaises (juin-juillet 1965), influence de la zone de divergence, *Tethys*, 2, 299-316, 1970.
- Minas, H. J. and B. Coste, Etude de la structure hydrologique et de quelques aspects de la productivité de la zone euphotique en fin d'été au niveau d'une station fixe (Bouée-Laboratoire du COMEXO) en rade de Villefranche ^Smer, *Recueil Travaux Station Mar. Endoume*, 34, fasc. 50, 133-155, 1964.
- Minas, H. J., A. Travers, M. Travers, and S. Maestrini, Première utilisation à Villefranche sur mer de la Bouée-Laboratoire du COMEXO pour l'étude du microplancton et de certains facteurs écologiques, *Recueil Travaux Station Mar. Endoume*, 44, fasc. 60, 13-48, 1968.
- Minas, H. J., M. Minas, B. Coste, J. Gostan, P. Nival, and M. C. Bonin, Production de base et recyclage; une revue de la problématique en Méditerranée nord-occidentale, *Oceanol. Acta*, 9, 155-162, 1988.
- Minas, H. J., R.C. Dugdale, and M. Minas, New production in the Mediterranean Sea: An overview of history, problems and future objectives, in 4th EROS 2000 Workshop, *Water Pollution Research Report 30*, edited by J.-M. Martin and H. Barth, pp. 51-60, Commission of the European Communities, Brussels, 1993.
- Minas, M., and H. J. Minas, Primary production in the Gulf of Lions, with consideration to the Rhône River input, in EROS 2000 1st Workshop, *Water Pollution Research Report 13*, edited by J.-M. Martin and H. Barth, pp. 112-125, Commission of the European Communities, Brussels, 1989.
- Morel, A., and J.-M. André, Pigment distribution and primary production in the western Mediterranean as derived and modeled from coastal zone color scanner observations, *J. Geophys. Res.*, 96, 12685-12698, 1991.
- Nihoul, J.C.J., P. Adam, P. Brasseur, E. Deleersnijder, S. Djenidi, and Haus J., Three-dimensional general circulation model of the northern Bering Sea's summer ecohydrodynamics, *Cont. Shelf Res.*, 13, 509-542, 1993.
- Pinazo, C., P. Marsaleix, B. Millet, C. Estournel, and R. Vêhil, Spatial and temporal variability of phytoplankton biomass in upwelling areas of the north-western Mediterranean: A coupled physical and biogeochemical approach, *J. Mar. Syst.*, 7, 161-191, 1996.
- Press, W.H., S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling, and B. P. Flannery, *Numerical Recipes in Fortran*, 2nd ed., pp. 708-716, Cambridge Univ. Press, New York, 1992.
- Redfield A.C., B. Ketchum, and F.A. Richards, The influence of organisms on the composition of sea water, in *The Sea*, edited by M. Hill, vol. 2, pp. 26-77, Wiley Interscience, New York 1963.
- Six, K.D., and E. Maier-Reimer, Effects of phytoplankton dynamics on seasonal fluxes in an ocean general circulation model, *Global Biogeochem. Cycles*, 10, 559-584, 1996.
- Smolarkiewicz, P.K., A fully multidimensional positive definite advection transport algorithm with small implicit diffusion, *J. Comput. Phys.*, 54, 325-362, 1984.
- Soetaert K., P.M.J. Hermann, and J.J. Middelburg, A model of early diagenetic processes from the shelf to abyssal depths, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 60, 1019-1040, 1996a.
- Soetaert K., P. M. J. Hermann, and J. J. Middelburg, Dynamic response of deep-sea sediments to seasonal variations: a model, *Limnol. Oceanogr.*, 41, 1651-1668, 1996b.
- Sournia, A., J.-M. Brylinski, S. Dallot, P. Le Corre, M. Leveau, L. Prieur, and C. Forget, Fronts hydrologiques au large de côtes Françaises: Les sites-ateliers du programme Frontal, *Oceanol. Acta*, 13, 413-438, 1990.
- Stommel, H., Deep winter-time convection in the western Mediterranean Sea, in *Studies in Physical Oceanography: A tribute to Georg Wüst on His 80th Birthday*, vol. 2, pp. 207-218, Gordon and Breach, New-York, 1972.
- Tamsalu, R., and P. Ennet, Ecosystem modelling in the Gulf of Finland, II, *Estuarine Coastal Shelf Sci.*, 41, 429-458, 1995.
- Travers, M., Le microplancton du Golfe de Marseille, schéma du cycle annuel, répartitions horizontale et verticale, *Tethys*, 6, 713-726, 1975.
- Tusseau, M.-H., Modélisation des variations saisonnières des cycles biogéochimiques du Golfe du Lion, thèse de doctorat, 283 pp., Université Paris VI, Paris, 1996.
- Tusseau, M.-H., and J.-M. Mouchel, Nitrogen inputs to the Gulf of Lions via the Rhône river, in EROS 2000 5th workshop, *Water Pollut. Res. Rep.* 32, edited by J.-M. Martin and H. Barth, pp. 49-59, Commission of the European Communities, Brussels, 1995.
- Tusseau, M.-H., C. Lancelot, J.-M. Martin, and B. Tassin, 1-D coupled physical-biological model of the north western Mediterranean Sea, *Deep Sea Res.*, 44, 851-880, 1997.
- Walsh, J. J., Importance of continental margins in the marine biogeochemical cycling of carbon and nitrogen, *Nature*, 350, 53-55, 1991.
- Williams, P. J., and C. Robinson, Analysis of oxygen-based productivity measurements through phase I of the EROS 2000 programme, in 3rd EROS 2000 workshop, *Water Poll. Res. Rep.* 28, edited by J.-M. Martin and H. Barth, pp. 151-162, Commission of the European Communities, Brussels, 1992.
- Zakardjian, B., and L. Prieur, A numerical study of primary production related to vertical turbulent diffusion with special reference to vertical motions of the phytoplankton cells in nutrient and light fields, *J. Mar. Syst.*, 5, 267-295, 1994.

C. Herbaut, Center for Meteorology and Physical Oceanography, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139. (e-mail: ch@gulf.mit.edu)

L. Mortier, Ecole Nationale Supérieure des Techniques Avancées, 32, Bd Victor, F-75 015 Paris, France. (e-mail: mortier@lodyc.jussieu.fr)

M.-H. Tusseau-Vuillemin, Cemagref, division QHAN, Parc de Tourvoie, B. P. 44, F-92 163 Antony Cedex, France. (e-mail: marie-helene.tusseau@cemagref.fr)

(Received June 27, 1997; revised November 28, 1997; accepted December 23, 1997.)



Technical note

Biodegradable fraction of organic carbon estimated under oxic and anoxic conditionsMarie-Hélène Tusseau-Vuillemin^{a,*}, Jérôme Dispan^b, Jean-Marie Mouchel, Pierre Servais^c^a Cemagref, U.R. *Qualité et Fonctionnement Hydrologique des Systèmes Aquatiques*, Parc de Tourvoie, BP 44, F-92 163 Antony Cedex, France^b Cereve, *Ecole Nationale des Ponts et Chaussées*, 6 et 8 Avenue Blaise Pascal, Cité Descartes–Champs-sur-Marne, F-77 455 Marne-La-Vallée Cedex 2, France^c *Ecologie des Systèmes Aquatiques*, Université Libre de Bruxelles, Campus Plaine, CP 221, B-1050 Brussels, Belgium

Received 24 October 2001; received in revised form 8 November 2002; accepted 15 November 2002

Abstract

The biodegradability of water samples is usually estimated with bioassays under oxic conditions. In order to overcome some of the drawbacks linked to the incubation of the samples in aerobic batches, a new protocol is proposed and tested, which is based on an organic carbon (OC) balance after a 45 days incubation under anoxic conditions with excess nitrate. The biodegradable fractions of organic matter obtained with the anoxic protocol are slightly lower than those obtained under oxic conditions. Several possible reasons for a systematic underestimation of the biodegradable organic matter under anoxic conditions are evaluated and discussed: a reduced microbial metabolic potential, significantly reduced degradation rates for the slowly biodegradable organic matter, an additional production of refractory organic compounds during the incubation, or the inhibition of the recycling of the organic matter stored in bacterial biomass. Nevertheless, the 7% difference observed on the biodegradable total OC estimations keeps low enough so that the anoxic protocol can be proposed as a convenient alternative to the oxic one.

© 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Biodegradable organic carbon; Oxic conditions; Anoxic conditions; Wastewaters; Water test method**1. Introduction**

The biodegradable fraction of organic carbon (OC) is of importance both in natural waters and in wastewaters. In natural aquatic systems, the biodegradable OC controls bacterial activity and thus oxygen consumption; in wastewaters only the biodegradable fraction of OC can be removed by biological treatment as activated sludge. The estimation of the biodegradability is usually performed with bioassays in oxic conditions

(biochemical oxygen demand, for example). However, as the denitrifying process deserved growing attention in wastewater treatment, anoxic bioassays based on nitrate consumption were proposed for estimating the biodegradable organic matter [1].

Servais et al. [2] proposed a simple procedure based on carbon balances to estimate the biodegradable fraction of dissolved organic carbon (DOC) and particulate organic carbon (POC) in batch experiments. This procedure was successfully applied to study the biodegradable fraction of organic matter in samples collected in sewers [3], in raw and treated wastewaters [4,5] and in natural waters [2].

In this procedure, the sample is incubated during 45 days under oxic conditions. The batch is intermittently

*Corresponding author. Tel.: +33-1-40-96-61-98; fax: +33-1-40-96-61-99.

E-mail address: marie-helene.tusseau@cemagref.fr (Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin).

Nomenclature	
OC	organic carbon
DOC	dissolved organic carbon
POC	particulate organic carbon
TOC	total organic carbon
BDOC _{O2} , BDOC _{NO3}	Biodegradable DOC measured in oxic or anoxic conditions, respectively.
BPOC _{O2} , BPOC _{NO3}	Biodegradable POC measured in oxic or anoxic conditions, respectively.
BTOC _{O2} , BTOC _{NO3}	Biodegradable TOC measured in oxic or anoxic conditions, respectively.

oxygenated by air bubbling and any carbon contamination through the aeration is avoided by pre-cleaning the air in two successive bathes of sulfochromic mixture and distilled water. This procedure is not very convenient as it requires to use dangerous chemicals and does not allow to manage in parallel a large number of samples. In this paper, we explore an alternative way of performing those biodegradation incubations under anoxic conditions, i.e. based on denitrification process. This procedure would allow to avoid the air bubbling and its drawbacks.

2. Material and methods

2.1. Samples collection

Eighteen samples were collected from either raw wastewaters (12 samples from 9 wastewater treatment plants of various size and type of process), treated wastewaters (2 samples from one activated sludge wastewater treatment plant) or river waters (4 samples from 4 rivers exposed to different levels of urban pressure). After collection and before the beginning of the analysis, special care was taken to keep the samples refrigerated ($T < 4^{\circ}\text{C}$) to prevent an early biodegradation. In order to avoid any organic contamination, all material was carefully rinsed with a sulfochromic mixture or cleaned by combustion (4 h at 550°C).

2.2. Dissolved and particulate organic carbon analysis

Water samples (30–100 mL, depending on the turbidity) were filtered through pre-combusted (4 h at 550°C) fiberglass filter (Whatman GF/F). DOC concentration was determined on the filtrate with either a Dohman DC 180 total carbon analyser (UV persulfate oxidation of OC followed by infrared spectrophotometric detection of the produced CO_2) or a OI-Analytical 1100 total carbon analyser (similar principle but hot oxidation without UV). With both apparatus, the accuracy of DOC determinations was approximately 0.05 mg C L^{-1} . Triplicates were performed for each sample. POC was

determined on several calibrated pieces stamped out of the filter [3]. The organic matter retained on the filter was oxidized by catalytic combustion and the carbon dioxide produced was analyzed using the same detector as for DOC measurements. The accuracy of POC determination was approximately 0.05 mg C L^{-1} . Triplicates at least were performed for each sample.

2.3. Biodegradable dissolved and particulate organic carbon (BDOC_{O2} and BPOC_{O2}, BDOC_{NO3} and BPOC_{NO3})

BDOC_{O2} and BPOC_{O2} were determined according to Servais et al. [2]. The samples (at least 250 mL) were incubated at $20^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ in the dark during 45 days. They were intermittently oxygenated by air bubbling to maintain aerobic conditions, and continuously agitated. In order to avoid carbon contamination through the aeration, air was previously bubbled in two successive bathes, the first of sulfochromic mixture and the second of distilled water, before injection into the batch. Under these conditions, the DOC concentration in a MilliQ water reference batch was shown to keep lower than 0.4 mg C L^{-1} after 10 days of incubation [6]. Sub-samples were collected in the batch at the beginning and at the end of the incubation and analyzed for dissolved and particulate OC. BDOC_{O2} and BPOC_{O2} were determined as the difference between the concentrations of DOC and POC, respectively, at the beginning and at the end of incubation. Previous experiments have shown that, by the end of 45 days of incubation, DOC and POC had reached stable values that are defined as the refractory part of dissolved and particulate OC [2]. The biodegradable total organic carbon (BTOC) was calculated as the sum of BDOC and BPOC. The average difference between BDOC_{O2}, BPOC_{O2} and BTOC_{O2} duplicates was estimated during previous experiments to amount less than 5% [6].

BDOC_{NO3} and BPOC_{NO3} were determined with the same procedure as BDOC_{O2} and BPOC_{O2} excepted that the incubation was performed at 20°C under anoxic condition. A few mL of a concentrated Na-NO₃ solution (100 g N L^{-1}) were added to the samples so that

nitrate concentration could be considered as a non-limiting oxidant for the biodegradation of organic matter in denitrifying conditions. At the beginning of the incubation, nitrogen gas was bubbled into the batch during a few minutes in order to remove any trace of dissolved oxygen. N₂ gas was also passed over the liquid before closing of the vessels in order to prevent O₂ introduction from the overlying gas during the incubation. This procedure was followed every time the vessel happened to be opened during the incubation. Sub-samples were collected in the batch at the beginning and at the end of the incubation and analyzed for dissolved and particulate OC.

In some occasions, additional sub-samples were also collected in both anoxic and oxic batches and analyzed during the incubation in order to study the kinetics of the organic matter biodegradation.

3. Results and discussion

The OC concentrations measured in all the samples span over a wide range of concentrations (Table 1), reflecting their various origins. The biodegradable fractions measured either under oxic or anoxic conditions in these samples display also a great variability, being very small in river waters, intermediate in treated

wastewaters and much more important in raw wastewaters.

BDOC, BPOC and BTOC concentrations resulting from an oxic incubation were plotted against those obtained under anoxic conditions (Fig. 1). Very significant correlations were obtained between both estimations, the regressions expressing a slightly but significantly lower estimation of the BDOC, BPOC and BTOC concentrations (respectively, 17%, 7% and 7%) under anoxic conditions (slopes <1; $\alpha < 0.05$). These data show that anoxic incubations can be used for the determination of BDOC and BPOC within the precision range mentioned above.

Indeed, substrates microbial availability in natural waters is generally believed to be reduced under anoxic conditions, since many enzymatic processes (typically those catalyzed by oxygenases) cannot be activated [7] and the full metabolic potential of an oxic culture may no longer be available under anoxic conditions. It might also happen that some very stable compounds (such as lignins or aliphatic structures) need a chemical oxidation prior to their biodegradation. However [8], recently observed in lake water cultures under carbon-limited conditions that the availability of dissolved organic matter under anoxic conditions was equal to (or even greater than) that under oxic conditions. The fact that the microbial availability of organic matter is the same

Table 1
Organic carbon concentrations measured in the samples, expressed in mg CL⁻¹

	Initial characterization			Biodegradable fractions (oxic conditions)			Biodegradable fractions (anoxic conditions)		
	DOC	POC	TOC	BDOC _{O2}	BPOC _{O2}	BTOC _{O2}	BDOC _{NO3}	BPOC _{NO3}	BTOC _{NO3}
Raw wastewaters	21.9	18.2	40.1	16.7	8.0	24.7	13.4	10.2	23.6
	25.2	65.6	90.8	15.8	37.2	53.0	15.9	33.5	49.4
	21.1	56.0	77.1	14.3	39.4	53.7	14.3	30.8	45.1
	29.7	144.9	174.6	24.1	108.7	132.8	21.1	109.3	130.5
	82.4	511.1 ^a	593.5 ^a	73.6	442.8 ^a	516.4 ^a	62.4	410.4 ^a	472.8 ^a
	73.1	53.5	126.6	63.1	32.5	95.6	52.5	22.5	75.0
	44.5	73.6	118.1	35.3	36.4	71.7	26.5	45.8	72.3
	20.7	21.1	41.8	15.7	14.7	30.4	14.1	9.0	23.1
	57.8	101.9	159.7	49.3	73.1	122.4	39.3	70.9	110.2
	35.2	31.9	67.1	30.8	7.2	38.0	22.2	10.0	32.2
73.5	92.4	165.9	66.8	60.9	127.7	56.3	50.4	106.7	
10.6	66.8	77.5	5.9	55.7	61.6	5.1	50.3	55.4	
Treated wastewaters	9.7	10.1	19.8	5.8	4.3	10.0	5.4	4.1	9.5
	10.3	7.4	17.7	6.0	0.6	6.5	4.9	2.3	7.2
River waters	31.2			23.5			23.7		
	8.9			1.1			3.0		
	7.9			1.0			3.0		
	5.2	17.2	22.4	1.1	4.4	5.5	1.0	2.7	3.7

Initial characterization, biodegradable fractions as obtained from oxic and anoxic procedures.

^aThese exceptionally high data were not included on the graphs, nor used for regressions. However, the ratio between anoxic and oxic biodegradable fractions are highly similar to the other ones.

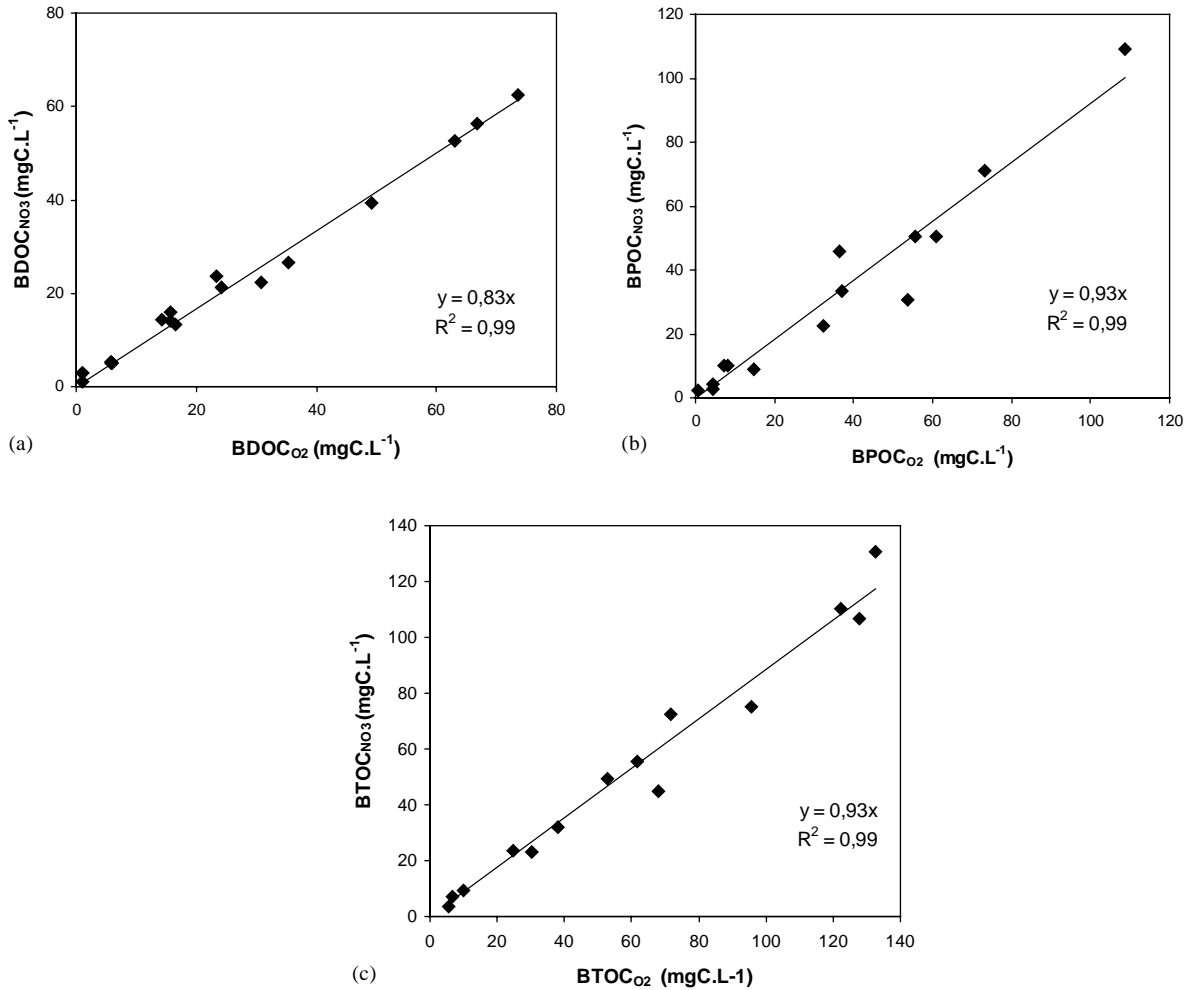


Fig. 1. Comparison of BDOC (a), BPOC (b) and BTOC (c) obtained either under oxic or anoxic conditions, all expressed in mg C L^{-1} .

under oxic or anoxic conditions has long been admitted in the case of wastewaters submitted to an activated sludge [9] and this statement actually provides the basis for the wastewater treatment numerical modeling [16]. However, most of these earlier studies are based on bacterial growth measurements, the precision of which cannot be considered better than 10%.

No clear agreement is found neither in the literature on the comparison of the organic matter degradation rates under anoxic or oxic conditions. According to Dold [10] and Sözen et al. [11], both the rates of hydrolysis of slowly degradable organic matter and of bacterial uptake of readily biodegradable substrate of wastewaters were reduced under anoxic conditions. We observed a similar tendency on several kinetics records, a representative example of which is given in Fig. 2. Conversely, Lee [12] reported that the intrinsic degradation rates of organic matter from natural waters were

similar under oxic or anoxic conditions. In the example of Fig. 2, the delay clearly appeared on the initial phase of POC anoxic kinetics but was equalized by a period of 10 days. DOC initial kinetics exhibited a minor difference, which increased by the end of the incubation.

Beyond the initial availability of the organic matter or its degradation kinetics, the difference between the 45 days balances could arise from an additional production of refractory organic matter during the anoxic incubation. Two main pathways are discussed here-below. The anoxic regime is likely to induce the decay not only of the heterotrophic bacteria that are not capable of adapting to anoxia, but also of most of the bacterial grazers. Firstly, the decay of 40–60% of the initial biomass in wastewater in anoxic conditions (percentages according to Kirstensen et al. [1]) can produce a significant amount of organic matter, since the whole initial biomass is expected to be less than 10% of the

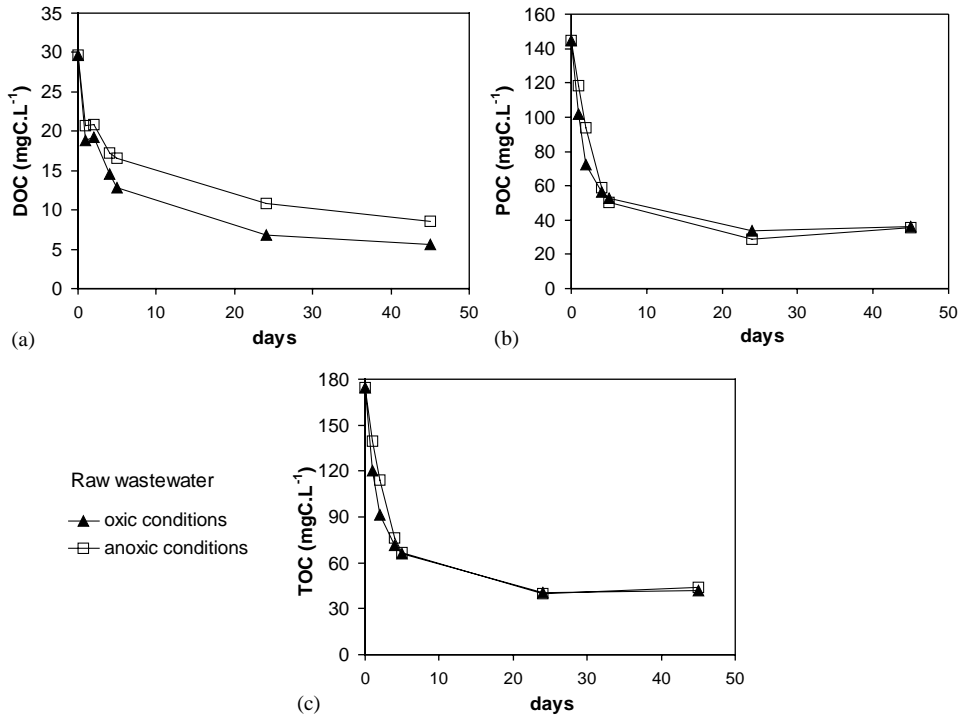


Fig. 2. Raw wastewater DOC (a), POC (b) and TOC (c) kinetics of biodegradation during oxic (black triangles) and anoxic (empty squares) 45 days incubations, all expressed in mg C L⁻¹.

BTOC in wastewater [3,13] or up to 20% of the biodegradable COD [14]. However, this decaying biomass produces partly degradable matter, and cannot totally account for the difference between BTOC_{O2} and BTOC_{NO3}. Secondly, a reduction of the grazing pressure under anoxic conditions could considerably slow down the recycling of the organic matter stored in the biomass. Under such a reasonable hypothesis, the behavior of the biomass produced during the degradation process would also be significantly different under oxic and anoxic situations. Bacterial growth yields found in the literature greatly vary (from 0.2 e.g. by Servais and Garnier [15] to 0.67 for [16], depending on the techniques and on the conceptual definitions. Taking a consensual value of bacterial growth yield equal to 0.4 means that 40% of the biodegradable organic matter is temporarily stored as bacterial biomass. Its further recycling relies on various bacterial mortality processes, among which the spontaneous lysis and the grazing. Whenever this latter process is partially inhibited, part of 40% of the biodegradable organic matter would be kept in the system as bacterial biomass instead of being respired and further recycled, then only a small change in the grazing pressure could account for the observed 7% difference between oxic and anoxic conditions. Lee [12] and Cole and Pace [17] argue that this reduction of the grazing pressure is responsible of the preservation of

organic matter in anoxic sediments. We suggest that this process could induce up to 7% preservation of BTOC during a 45 days incubation.

4. Conclusion

An alternative method for the measurement of the biodegradable fraction of OC in water samples has been proposed, based on the carbon balance resulting of a 45 days anoxic incubation. The greatest advantage of this method is that it does not require a continuous aeration of the batches. When tested on a variety of water samples, this method is shown to under-evaluate by 17%, 7% and 7%, the fractions of biodegradable dissolved, particulate and total organic carbon, respectively, as compared with the results obtained with a similar aerobic incubation. One hypothesis for this lower biodegradability might stand in the reduced metabolic potential of aerobic microbes facing anoxic conditions and a reduced bioavailability of substrates. Another hypothesis is that the recycling of bacterial biomass (mainly through grazing) would be inhibited under anoxic conditions, leading to an increased preservation of organic matter as bacterial biomass. Nevertheless, the 7% difference observed on the BTOC estimations keeps low enough so that the anoxic

protocol can be proposed as a convenient alternative to the oxic one.

Acknowledgements

Part of the work presented in this paper was performed within the scope of the PIREN Seine program of the Centre National de la Recherche Scientifique (France). The authors thank Adriana Anzil, Nadine Derlet, Daniel Stadtmüller and Mohammed Saad for their excellent technical assistance.

References

- [1] Kristensen GH, Jorgensen PE, Henze M. Characterization of functional micro-organisms groups substrate in activated sludge wastewater by AUR, NUR OUR. *Water Sci Technol* 1992;25(6):43–57.
- [2] Servais P, Barillier A, Garnier J. Determination of the biodegradable fraction of dissolved and particulate organic carbon in waters. *Ann Limnol* 1995;31:75–80.
- [3] Seidl M, Servais P, Martaud M, Gandouin G, Mouchel J-M. Organic carbon biodegradability and heterotrophic bacteria along a combined sewer catchment during rain events. *Water Sci Technol* 1998;37:25–33.
- [4] Servais P, Garnier J, Demarteau N, Brion N, Billen G. Supply of organic matter and bacteria to aquatic ecosystems through waste water effluents. *Water Res* 1999; 33:3521–31.
- [5] Tusseau-Vuillemin M-H, et Le Réveillé G. Le carbone organique biodégradable dans les eaux traitées du bassin de la Seine. *Ing Eau et Territoire* 2001;25:3–12.
- [6] Le Réveillé G, Tusseau-Vuillemin M-H, Biodegradable Organic Matter in treated wastewaters of the Seine river basin. Proceedings of the first World Congress of the IAWQ, Paris, 2000.
- [7] Zehnder AJB, Colberg PJ. Anaerobic biotransformation of organic carbon compounds. In: Jensen V, Kjoller A, Sorensen LH, editors. *Microbial communities in soil*. London: Elsevier, 1986. p. 275–91.
- [8] Bastviken D, Ejlerstsson J, Tranvik L. Similar bacterial growth on dissolved organic matter in anoxic and oxic lake water. *Aquat Microb Ecol* 2001;24:41–9.
- [9] Van Haandel AC, Ekama GA, Marais GvR. The activated sludge process-3. Single sludge denitrification. *Water Res* 1981;15:1135–52.
- [10] Dold PL, Ekama GA, Marais GvR. A general model for the activated sludge process. *Prog Water Technol* 1980;12:47–77.
- [11] Sözen S, çokgör U. Orhon, D, Henze M, Respirometric analysis of activated sludge behaviour-II. Heterotrophic growth under aerobic and anoxic conditions. *Water Res* 1998;32(2):476–88.
- [12] Lee C. Controls on organic-carbon preservation—the use of stratified water bodies to compare intrinsic rates of decomposition in oxic and anoxic systems. *Geochim Cosmochim Acta* 1992;56:3323–35.
- [13] Servais P, Seidl M, Mouchel J-M. Comparison of parameters characterizing organic matter in a combined sewer during rain events and dry weather. *Water Environ Res* 1999;71:408–17.
- [14] Henze M. Characterization of wastewater for modelling of activated sludge processes. *Water Sci Technol* 1992; 25(6):1–17.
- [15] Servais P, Garnier J. Contribution of heterotrophic bacterial production to the carbon budget of the River Seine (France). *Microb Ecol* 1993;25:19–33.
- [16] Henze M, Grady C, Gujer W, Marais GvR, Matsuo T, Activated sludge Model No. 1, Scientific and Technical Reports No. 1, IAWPRC, available from IWA Publishers, London, 1986. 33pp.
- [17] Cole JJ, Pace ML. Bacterial secondary production in oxic and anoxic freshwaters. *Limnol Oceanogr* 1995;40: 1019–27.

Variability estimation of urban wastewater biodegradable fractions by respirometry

Water Research, in press.

Fabienne Lagarde¹, Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin¹, Paul Lessard², Alain Héduit¹, François Dutrop¹, Jean-Marie Mouchel³.

¹ Cemagref, QHAN, BP 44 Parc de Tourvoie, 92163 Antony Cedex, France.

² Département de Génie Civil, Université Laval, Québec, G1K 7P4, Canada.

³ CEREVER, 6-8, avenue B. Pascal, cité Descartes, 77 455 Marne la vallée cedex 2

ABSTRACT

This paper presents a methodology for assessing the variability of biodegradable COD fractions in urban wastewaters. Thirteen raw wastewater samples from combined and separate sewers feeding the same plant were characterized and two optimisation procedures were applied in order to evaluate the variability in biodegradable fractions and related kinetic parameters. Through an overall optimisation on all the samples, a unique kinetic parameter set was obtained with a three-substrate model including an adsorption stage. This method required powerful numerical treatment, but improved the identifiability problem compared to the usual sample-to-sample optimisation. The results showed that the fractionation of samples collected in the combined sewer was much more variable (standard deviation of 70% of the mean values) than the fractionation of the separate sewer samples, and the slowly biodegradable COD fraction was the most significant fraction (45% of the total COD on average). Because these samples were collected under various rain conditions, the standard deviations obtained here on the combined sewer biodegradable fractions could be used as a first estimation of the variability of this type of sewer system.

INTRODUCTION

The increasing use of treatment plant simulation models (e.g. for activated sludge with the ASM models developed by IWA, Henze *et al.* (1987)) gradually generalised a finer description of wastewater organic matter into distinct homogeneous compartments (Vanrolleghem *et al.* (1999)). This fractionation, based on the differences between biodegradation kinetics, simulates nitrogen and carbon pollution removal in treatment plants (Spanjers *et al.* (1998)). It also predicts organic matter behaviour in the receiving water body (Even *et al.* (1998); Garnier *et al.* (2001)). Consequently, respirometry has become a widely used tool, despite problems interpreting results (e.g. Spanjers *et al.* (1998); Brouwer *et al.* (1998); Spanjers *et al.* (1999)). The fractions corresponding to the various kinetics of degradation are only indirectly obtained by optimising the initial conditions and the model's parameters on experimental data. This model is selected to reproduce the bacterial degradation dynamics occurring during a biotest, in which the measured variable is generally the dissolved oxygen concentration. Modelling makes it possible to reproduce respiration rates, i.e. the derivative of oxygen versus time. Determining the fractions thus depends both on the model used and on the criteria of the implemented optimisation procedure, unless the

characteristics of the respirogram provide for direct parameter extraction (Spanjers *et al.* (1999)).

Meanwhile, the fractionation of the wastewater Chemical Oxygen Demand (COD) in classes of biodegradability is known to be highly variable with time and sampling point (Orhon *et al.* (1995); Sperandio *et al.* (2001)). The dilution of domestic wastewater by runoff waters, the contribution of industrial water, the retention time in the sewer system will all contribute to modifying the biodegradable potential of an urban wastewater (Henze (1992); Gromaire-Mertz *et al.* (1998)). Sperandio *et al.* (2001) collected and compared some twenty samples. The numerical exploitation of their experiments produced highly variable kinetic parameters from one sample to another (Sperandio and Paul (2000)). This variability related to the optimisation procedure is likely to either amplify or minimise the intrinsic variability of the samples. Moreover, the fractions are not *stricto-sensu* comparable because their definition is based on their biodegradation kinetics.

A methodology for assessing the variability of biodegradable COD fractions of wastewaters was developed and evaluated here. The variability of the kinetic parameters resulting from the analysis of the respirograms was investigated by implementing the optimisation procedure using dedicated software on a set of thirteen raw wastewater samples.

MATERIAL AND METHODS

Experimental procedure

The wastewater treatment plant studied (130 000 p.e.) is fed by two distinct sewer systems, one combined and one separate, accounting for 70% and 30%, respectively, of the total flow entering the plant during dry weather. The collected wastewater is mainly of domestic origin but some industries (a laundry, a slaughter-house, etc.) are also connected on the sewers, particularly on the separate one. Between March and May 2001, 13 samples were taken at the end of each sewer before any treatment (Table 1): seven in the combined sewer (six grab samples and one composite over 24 hours) and six in the separate sewer (five grab samples and one composite over 24 hours). Samples were taken regularly around 10 a.m. Rainfall data (mm/day) were collected on the site during the sampling period. The total COD was measured on each sample according to the standard ISO 6060 (International Organisation for Standardisation). Respirometric measurements were taken on each sample, using two continuously mixed batch reactors of 7 L each. The first reactor was filled with wastewater only (high S/X ratio) while in the second one, the wastewater was mixed with activated sludge with a 4:6 volume ratio (low S/X ratio). The sludge was taken in the aerated basin of the plant and aerated for several hours before use. The temperature was maintained at 20°C with a water-jacket. Step aeration was provided by an air pump in the first reactor and by hydrogen peroxide injection (Tusseau-Vuillemin *et al.* (2001)) in the second one (wastewater + activated sludge). In each reactor, the aeration system was controlled to maintain oxic conditions ($[O_2] > 3 \text{ mgO}_2/\text{L}$). Nitrification was inhibited by addition of allylthiourea 98% (ATU). Dissolved oxygen concentrations were measured and recorded in the two batches every 5 seconds during the non-aerated periods. Oxygen Uptake Rates (OURs) were calculated by deriving the concentrations of dissolved oxygen according to time. These instantaneous OURs were averaged over 1 minute (every twelve values).

Since all the experiments could not be launched simultaneously, the samples from the combined sewer, with a lower COD concentration, were preserved at 4°C for 1 day. The samples from the separate sewer were immediately processed.

Model presentation

Because the samples were not settled before analysis, our analysis of the experimental data relies on a three-substrate model derived from Sollfrank and Gujer (1991) and Spanjers and

Vanrolleghem (1995) with an additional distinction between adsorbed and free substrates according to Sperandio and Paul (2000). In this model, the fractions were: S_S , readily biodegradable COD, X_R , readily hydrolysable COD (adsorbed on biomass), X_S , slowly hydrolysable COD (adsorbed on biomass), $X_{R,NA}$ and $X_{S,NA}$ non-adsorbed COD that was readily and slowly hydrolysable, respectively. The model included two other variables: dissolved oxygen and heterotrophic biomass $X_{B,H}$ concentrations. The ASM1 model (Henze et al, 1987) was also used as a reference one for the respirograms simulations.

The initial COD is considered as not adsorbed ($X_{R,NA}$ and $X_{S,NA}$) or under readily biodegradable form (S_S), i.e. fractions X_R and X_S are initially equal to zero. Both substrates $X_{R,NA}$ and $X_{S,NA}$ progressively adsorb on the biomass and only the resulting fractions, X_R and X_S , respectively, can be hydrolysed, assuming the mediation of bound exoenzymes. Figure 1 presents the mass transfers involved in the COD degradation, and the kinetic equations governing the successive steps of degradation are given as a matrix in Table 2 ([j] = process j in Table 2). The growth of heterotrophic biomass [process #1] is the same as in ASM1 (Henze *et al.* (1987)) and relies on S_S and oxygen uptake. Second-order kinetics are used for the adsorption processes of X_R [process #2] and X_S [process #3]. They are proportional to the non-adsorbed substrate concentrations and to the fraction of free sorption sites computed as the total number of sites ($f_{ma} \times X_{B,H}$) minus the total adsorbed amounts ($X_R + X_S$). The adsorption process kinetics constant K_a is the same for both substrates. The differentiation between both readily and slowly hydrolysable substrates relies also on the first-order hydrolysis kinetics constants (k_H and k'_H). This formulation was used for the sake of simplicity, despite the recent evidence that the hydrolysis of settleable COD might be dependent on the biomass (Okutman *et al.* (2001)). Heterotrophic biomass decay is represented by means of the endogenous respiration concept [process #6]. A constant portion of biomass decay ($1-f_{XI}$) thus generates immediate oxygen consumption. Note that the aim of the study was not to add another respirometric model to the already well-diversified literature collection, but rather to illustrate methodological means related to the evaluation of the variability of the respirometric results. The expression of the respiration simulated by the model ($OUR_{sim,C1}$) is thus (equation 1):

$$OUR_{sim,C1} = -\frac{dO_2}{dt} = \frac{1-Y_H}{Y_H} \mu_H \frac{S_S}{S_S + K_S} X_{B,H} + b_H X_{B,H} (1 - f_{XI}) \quad (1)$$

Obtaining the COD fractions

In order to limit the number of parameters to be optimised, the respirograms obtained with activated sludge (low S/X) were not fully simulated, but were used to determine the sum of the biodegradable COD fractions and to evaluate their degradation kinetics in the presence of activated sludge. Indeed, after some 20 hours of incubation with low S/X, the respiration rate returns to its initial endogenous level (taking into account the dilution of the sludge with the sample). The sum of the three fractions S_S , $X_{S,NA}$ and $X_{R,NA}$ could thus be evaluated as the integral of the observed respiration (equation 2), minus the endogenous respiration (OUR_{end}) measured at the beginning and the end of the experiment (Figure 2).

$$(S_{S,0} + X_{R,0} + X_{S,0}) = \frac{1}{d(1-Y_H)} \int_{t_0}^{t_f} \left(-\frac{dO_2}{dt} - OUR_{end} \right) dt \quad (2),$$

where d is the dilution factor of water in sludge and Y_H is the heterotrophic yield.

It is known that the respirometric characterization with a high S/X ratio has been criticized in that more energy is spent for cell multiplication and because the population may be significantly modified during the experiment (Chudoba *et al.* (1992) ; Spanjers and Vanrolleghem (1995)). However, the aim being to obtain a consistent data set on the

biodegradable COD fractions of a given sewer, we chose to perform both batch incubations (low and high S/X ratios) because this combined procedure has been shown to improve the identifiability of the system (Sperandio and Paul (2000) ; Spanjers *et al.* (1999)). Sperandio and Paul (2000) previously showed that the experiment carried out with a low S/X ratio can monitor the total degradation of the slowly hydrolysable substrate, while it is only partially removed in the case of a high S/X ratio incubation. The percentage of COD degraded during the first hour of the low-S/X-ratio experiments was also estimated on the basis of these respirograms, as a surface ratio (Figure 2). The sum of the inert and biodegradable COD fractions is equal to the COD initially measured in each sample (equation 3).

$$COD = S_I + X_I + S_S + X_{R,NA} + X_{S,NA} + X_{B,H} \quad (3)$$

The values of the stoichiometric parameters Y_H and f_{XI} were fixed at the usual values reported in the literature ($Y_H = 0.63$ and $f_{XI} = 0.2$, Gujer *et al.* (1999)). The values of the initial COD fractions and of the kinetic parameters characterising the biomass of the samples were estimated by minimising a cost function, either defined as $F_i(p_i)$ (equations 4 and 5), under the constraints involved by equations 2 and 3. Minimising every single $F_i(p_i)$ implies that an optimal parameter set p_i will be obtained for each sample, whereas minimising $F(p^*)$ implies that a unique optimal parameter set p^* will be obtained for all the samples.

$$F_i(p_i) = \sum_{j=1}^{N_i} (OUR_{sim,ij} - OUR_{exp,ij})^2 \quad (4)$$

where N_i is the number of data points obtained during high-S/X incubation of sample i , *sim* refers to the model simulation and *exp* refers to the experimental data.

$$F = \sum_{i=1}^{13} F_i \quad (5)$$

An original program specifically developed for such applications by Dispan *et al.* (submitted) was used to solve the optimisation problem. This program minimises functions F_i and F under various types of constraints. It is based on the L-BFGS-B low-memory quasi-Newton algorithm proposed by Zhu *et al.* (1997). The required gradients of the objective function are derived from a secondary piece of code generated by automated differentiation based on Odyssee software, described by Faure and Papegay (1998). Moreover, a second application of automated differentiation computes the matrix of second derivatives (the Hessian matrix) at the optimum; its inverse is the covariance matrix of the estimated parameters. Fifty-two COD fractions (four fractions per sample) were determined, with either a unique optimal parameter set or thirteen optimal parameter sets. Due to the optimisation constraints (among which computing time), the overall estimation procedures with both ASM 1 and three-substrate models were done with only three of the parameters being optimised as indicated in Table 3 and Table 4 respectively. The non-optimised parameters were set either to default values (ASM 1, Table 3) or based on the work of Sperandio and Paul (2000) and Brouwer *et al.* (1998) for the three-substrate model (Table 4). For example, the value of K_S is low compared to the default value of the ASM1. Actually, these default values were established from full-scale studies that might be influenced by an imperfect mixing of the reactors (Henze *et al.* (1987)) and where the rapid breakdown after a biomass growth cannot be observed. The constants of hydrolysis of the readily and the slowly hydrolysable substrates were defined to differ by two orders of magnitude in order to reflect the difference experimentally observed between the substrate behaviours. Finally, the parameters linked to the adsorption processes were taken similar to those proposed by Sperandio and Paul (2000).

RESULTS AND DISCUSSION

Experimental results and typology of the respirometric curves

All samples are presented in Table 1. Total COD concentrations lie between 275 and 510 mg COD/L in the combined sewer, while they are much higher in the separate sewer (610–1013 mg COD/L). Two types of respirometric curves (A and B) were typically obtained from the high-S/X-ratio experiment and are illustrated in Figure 3a and Figure 3b,c, respectively. Most of the curves were type A curves (nine out of thirteen samples including the six samples collected in the separate sewer). The corresponding simulated changes in S_S , X_R , X_S and $X_{B,H}$ are shown on Figure 3d. The first phase of OUR growth results from biomass growth and the degradation of the readily biodegradable substrate. Such a growth phase is characteristic of a very high S/X ratio. It usually lasts between 1 and 2 hours and is followed by an abrupt decrease. A second rise in respiration, referred to as shoulder respiration (Spanjers *et al.* (1999); Sperandio and Paul (2000)), occurs between 3 and 5 hours. The shoulder effect could not be obtained using the standard ASM1 model (Figure 3a, b and c) and the cost function obtained with this model is quite high (Table 3). The only way to obtain proper simulations was to add an adsorption process, as previously discussed by Sperandio and Paul (2000). The changes in the COD fractions in the systems show that the shoulder results from the degradation of the readily hydrolysable substrate X_R (see Figure 3d). Moreover, a very slow degradable substrate (X_S) had to be considered because the OUR was always significantly higher than 2 mg O₂/L/h after approximately 20 hours of incubation. These two aspects were reproduced thanks to the progressive availability of X_S and X_R , as illustrated in Figure 3d, and led to the correct simulation of the respirograms. Type B respirograms were observed for four samples collected in the combined sewer and are illustrated in Figure 3b and c. On these respirograms, the first phase of growth does not occur, because of a very low concentration of readily biodegradable substrate (S_S) compared to the concentration of biomass ($X_{B,H}$). This is interesting to note since the four samples correspond to wet weather samples, when dilution of soluble characteristics can occur (Rouleau *et al.* (1997)). Figure 3c represents an extreme case with no readily biodegradable substrate. In case of type A respirograms, the different COD fractions appear successively dominant and are therefore easy to identify, even with direct methods (Spanjers *et al.* (1999)). Conversely, type B respirograms correspond to samples where at least one COD fraction is negligible.

Kinetic parameters

With the ASM 1 model, the optimisation of the thirteen samples fractions with the default set of parameters (Henze *et al.*, 1987) led to a very high cost function of $F(p^*)/N = 9.6$ (mg O₂L⁻¹h⁻¹)² (with $N = 3636$). Optimising three of the parameters (μ_H , k_H and K_X) led to a sensitively lower cost function of $F(p^*)/N = 8.7$ (mg O₂L⁻¹h⁻¹)² (with $N = 3636$). The optimised values of these parameters are given in Table 3. The OUR curves obtained with these parameters and the optimised ASM 1 fractions for three of the samples are given in Figure 3a, b, c as examples of the bad results related to the use of this model. With the three-substrate model, the set of parameters leading to the minimal cost function $F(p^*)$ ($F(p^*)/N = 1.2$ (mg O₂L⁻¹h⁻¹)², $N = 3636$) and globally characterising the biomass of all the wastewater samples is given in Table 3. Most of the kinetic parameters of this model are not directly comparable with those usually reported in the literature. The adsorption processes and the slowly hydrolysable substrate are not described in the ASM1 (Activated Sludge Model 1, Henze *et al.* (1987)). The hydrolysis kinetics of the slowly hydrolysable substrate is not a first-order reaction since the biomass concentration is taken into account. Finally, the formulation of endogenous respiration is different. Moreover, the model differs also from the one proposed by Sperandio and Paul (2000) in that a slowly hydrolysable substrate was added, and the three-substrate model used by Sollfrank and Gujer (1991) has no preliminary stage of adsorption. The comparison of the optimised parameters with those of the literature could then hardly be done. The quality of the simulations obtained with these parameters is illustrated for three examples in Figure 3. The cost function is obviously lower with a sample-by-sample optimisation

procedure than with an overall optimisation (eq. 6). An example of the fits obtained with both procedures is shown in Figure 4. The averaged parameters obtained by individually minimising the $F_i(p_i)$ cost functions are different from those obtained by minimising $F(p^*)$, and their standard deviations are very large. The greatest differences are observed for the half-saturation constant K_S and the adsorption parameters K_a and f_{ma} . Moreover, K_S appears highly variable (from 0.3 to 14.0 mg/L). The average values of the adsorption parameters are closer to those reported in the literature (Kappeler and Gujer, 1992; Sollfrank and Gujer, 1991) than the values obtained with the overall optimisation, but the individual values are rather dispersed. A particularly strong variability of f_{ma} is obtained, the maximum value being 13.6.

The low value of the global cost function ($\frac{1}{N} \sum_{i=1}^{13} F_i(p_i) = 0.8 \text{ (mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1})^2$) seems to be

related to substantial dispersion of the values of the parameters from one experiment to another, which is difficult to explain for a wastewater collected in the same sewers over only a few weeks, at a similar time of the day. Brouwer *et al.* (1998) also obtained a 100% variability on the optimised K_S values among six samples collected within 9 days on the same site. Moreover, the COD fractions obtained with those different sets of kinetic parameters are not exactly comparable from one sample to the other, because they correspond to different dynamics of degradation. Conversely, the standard deviations associated to the three parameters optimised on the overall dataset are much smaller (Table 4). The simultaneous use of all the datasets thus allows to improve the optimisation. Lastly, although the structural identifiability of this type of problem has been investigated in detail on slightly different models (Dochain *et al.* (1995), Sperandio and Paul (2000)) and under particular conditions, it is still unclear whether a structurally identifiable parameter is identifiable with experimental data from a practical point of view. Indeed, quite similar cost functions are obtained with significantly different parameters and COD fractions (Table 5). The example illustrated in Figure 5 and Table 5 relates to sample 12 and shows that with variations for k_h , k'_h and K_S of 8, 21 and 36%, respectively, and variations for S_S and $X_{R, NA}$ of about 6%, one obtains a difference in cost functions of about 1% of the average value of measured respiration, which is certainly lower than the experimental data scattering.

COD fractions

The average fractions for the thirteen samples obtained with both models and the overall optimisation procedure are shown on Figure 6. The fractions are not strictly comparable but range from readily biodegradable to inert compounds. These latter are rather similar with both models, whereas major differences arise in the biodegradable fractions. The ASM 1 sum of the fractions S_S and X_S is considerably lower than the sum of the biodegradable fractions of the three-substrate model. This leads to a very large biomass fraction (more than 50 % of the total COD in average) with the ASM 1 model, which is not in agreement with the literature data. Because the ASM 1 simulations do not really fit the data, we only discuss the three-substrate model results hereafter.

Figure 7 shows the average results of the thirteen fractionations carried out with a common set of kinetic parameters, as well as the standard deviations corresponding to each fraction in both sewers. The variability of the fractions among the samples is very high (σ varying from 30 to 100% of the average values). Nevertheless, the fractions of the separate sewer samples are less variable (σ varying from 38 to 55% of the average values). The sampling was indeed carried out under varied rainfall conditions (Table 1) and reflects the possible variations in the combined sewer wastewater composition. The readily biodegradable fraction S_S is low for both types of sewer, less than 5% of the total COD, this percentage being weaker for the combined sewer samples. Although these samples were preserved at 4°C before their analysis, it is possible that they underwent a beginning of degradation or physicochemical modification (Sperandio and Paul (2000)). The predominance of the slowly and very slowly hydrolysable

substrates ($X_{R, NA}$ and $X_{S, NA}$) is reversed between the separate sewer, where $X_{R, NA}$ represents on average about 40% of the total COD, and the combined sewer, where $X_{S, NA}$ represents on average more than 35% of the total COD. On the whole, the slowly biodegradable fractions dominate in the combined sewer COD, which confirms the general tendency of a longer-term biodegradability of the combined sewer samples. Moreover, the significant percentages of the readily and slowly hydrolysable fractions, characterized by kinetics differing by two orders of magnitude, underline the need to use a model with three biodegradable substrates to account for the experimental data. Nevertheless, the use of these data for ASM1 formalism requires aggregating them in coherence with the degradation and hydrolysis kinetics of this model. With activated sludge, the preliminary phase of adsorption is very fast because the biomass is highly concentrated. The distinction between the adsorbed or non-adsorbed substrates is thus not necessary. However, as previously mentioned, the direct comparison of k_h and k_h' with the hydrolysis kinetic parameter of ASM1 is not relevant. The respirograms obtained by mixing the wastewater with sludge were used in order to evaluate the amount of COD that can be degraded by activated sludge during the first hour of incubation (see example with sample 12 in Figure 2). The first-hour degradation accounts on average for 28% and 46%, respectively, of the biodegradable COD of waste water from the combined and separate sewers. More precisely, the COD degraded during the first hour accounts on average for 74% and 83%, respectively, of the sum of fractions $S_S + X_{R, NA}$ initially present in both sewers' wastewater. This leads to the conclusion that, in order to be consistent with ASM1 representation, these two fractions should be lumped into a readily biodegradable fraction, and the slowly hydrolysable fraction $X_{S, NA}$ should be linked to the slowly biodegradable ASM1 fraction. The results are presented in this formalism in Figure 8. The variability of the fractionation is slightly reduced because of the merging of fractions S_S and $X_{R, NA}$, but the differences between the sewers are preserved. Henze *et al.* (1987) recommend a range of values for the COD fractions to be used in the ASM1 model. These values were established for samples with total COD concentrations varying from 220 to 515 mg/L. The readily biodegradable fraction is assumed to range between 24 and 32% of the total COD, while the slowly biodegradable fraction ranges from 40 to 49%. These percentages were later refined into 25–40% as the sum of the readily biodegradable and rapidly hydrolysable COD fractions (Henze (1992)). The average fractions of $(S_S + X_{R, NA})$ and $X_{S, NA}$ obtained here for the combined sewer (28% and 36% of the total COD, respectively) are within this recommended range. Conversely, the average values obtained for the separate sewer samples are higher for the readily biodegradable fraction (more than 40% of the total COD on average) and weaker for the slowly biodegradable fraction (about 18%) than the previously quoted values. These samples are more concentrated (COD concentrations from 610 to 1013 mg/L) and *a priori* less representative of the domestic effluents because of the presence of industrial wastes in the sewer.

CONCLUSION

The question of how to evaluate the variability of biodegradable COD fractions obtained with respirometric data raises a number of methodological problems. With a three-substrate model including an adsorption stage, adapted to our 13-sample data set, a unique kinetic parameter set can be obtained through an overall optimisation of COD fractions and parameters. This method requires a powerful numerical treatment, but is likely to improve the identifiability of the problem, compared to the usual sample-to-sample optimisation. This is based on the assumption that the biomass naturally present in the samples had comparable characteristics that cannot easily be checked. However, it is possibly the only way to estimate the variability of the COD fractions, since they are based on the same definition. The results show that the

composition of urban wastewater collected in the combined sewer, under various rainfall conditions, is much more variable than that of the separate sewer samples and the slowly biodegradable COD fraction is greater. The respirogram analysis performed with activated sludge results in considering that the sum of fractions S_S and $X_{R,NA}$ is generally representative of the ASM1 readily biodegradable fraction. Because the samples were collected under various rain conditions, the standard deviations obtained on the COD fractions of the combined sewer could be used as an estimate of the variability of such a sewer system.

Acknowledgements. Catherine Safronieva and Virginie Durand are kindly acknowledged for their technical assistance.

References

- Brouwer, H., Klapwijk, A. and Keesman, K. J. (1998) Identification of activated sludge wastewater characteristics using respirometric batch experiments. *Water Research* **32**(4), 1240-1254.
- Chudoba, P., Capdeville, B. and Chudoba, J. (1992) explanation of biological meaning of the S_0/X_0 ratio in batch cultivation. *Water Science and Technology* **26**(3-4), 743-751.
- Dispan, J., Mouchel, J.-M., Charpentier, I. and Servais, P. (submitted) Acetate degradation by a non-cultivated primary sludge, I. A methodology to assess model parameters. *Water Research*.
- Dochain, D., Vanrolleghem, P. A. and Van Daele, M. (1995) Structural identifiability of biokinetics models of activated sludge respiration. *Water Research* **11**, 2571-2578.
- Even, S., Poulin, M., Garnier, J., Billen, G., Servais, P., Chesterikoff, A. and Coste, M. (1998) River ecosystem modelling: application of the PROSE model to the Seine river (France). *Hydrobiologia* **374**, 27-45.
- Faure, C. and Papegay, Y. (1998) *Odyssee user's guide. Rep. 0224*, INRIA, Versailles.
- Garnier, J., Servais, P., Billen, G., Akopian, M. and Brion, N. (2001) Lower Seine river and estuary (France) carbon and oxygen budgets during low flow. *Estuaries* **24**(6B), 964-976.
- Gromaire-Mertz, M.-C., Chebbo, G. and Saad, M. (1998) Origins and characteristics of urban wet weather pollution in combined sewer systems : the experimental water catchment "Le Marais" in Paris. *Water Science and Technology* **37**(1), 35-43.
- Gujer, W., Henze, M., Mino, T. and Van Loosdrecht, M. (1999) Activated sludge Model n°3. *Water Science and Technology* **39**(1), 183-193.
- Henze, M., Grady, C., Gujer, W., Marais, G. and Matsuo, T. (1987) Activated Sludge Model n°1. *Rep. 1*, IWA.
- Henze, M. (1992) Characterization of wastewater for modelling of activated sludge process. *Water Science and Technology* **25**(6), 1-15.
- Kappeler, J. and Gujer, W. (1992) estimation of heterotrophic parameters under aerobic conditions and characterization of wastewater for activated sludge modelling. *Water Science and Technology* **25**, 125-139.
- Okutman, D., Ovez, S. and Orhon, D. (2001) Hydrolysis of settleable substrate in domestic sewage. *Biotechnology Letters* **23**(23), 1907-1914.
- Orhon, D., Yildiz, G., Cokgör, E. and Sözen, S. (1995) Respirometric evaluation of the biodegradability of confectionary wastewaters. *Water Science and Technology* **32**(12), 11-19.
- Rouleau, S., Lessard, P. and Bellefleur, D. (1997) Behaviour of a small wastewater treatment plant during rain events. *Revue Canadienne de Génie Civil* **24**(5), 790-798.

- Sollfrank, U. and Gujer, W. (1991) Characterization of domestic wastewater for mathematical modelling of the activated sludge process. *Water Science and Technology* **23**, 1057-1066.
- Spanjers, H. and Vanrolleghem, P. A. (1995) Respirometry as a tool for rapid characterization of waste-water and activated-sludge. *Water Science and Technology* **31**(2), 105-114.
- Spanjers, H., Vanrolleghem, P. A., Olsson, G. and Dold, P. L. (1998) Respirometry in control of the activated sludge process : principles. *Rep. 7*, International Water Association, London.
- Spanjers, H., Takacs, I. and Brouwer, H. (1999) Direct parameter extraction from respirograms for wastewater and biomass characterization. *Water Science and Technology* **39**(4), 137-145.
- Sperandio, M. and Paul, E. (2000) Estimation of wastewater biodegradable COD fractions by combining respirometric experiments in various S0/X0 ratios. *Water Research* **34**(4), 1233-1246.
- Sperandio, M., Urbain, V., Ginestet, P., Audic, M. and Paul, E. (2001) Application of COD fractionation by a new combined technique: comparison of various wastewaters and sources of variability. *Water Science and Technology* **43**(1), 181-189.
- Tusseau-Vuillemin, M.-H., Lagarde, F., Chauvière, C. and Héduit, A. (2001) Hydrogen peroxyde (H₂O₂) as a source of dissolved oxygen in COD-degradation respirometric experiments. *Water Research* **36**, 793-798.
- Vanrolleghem, P. A., Spanjers, H., Petersen, B., Ginestet, P. and Takacs, I. (1999) Estimating (combinations of) Activated Sludge Model No. 1 parameters and components by respirometry. *Water Science and Technology* **39**(1), 195-214.
- Zhu, C. Y., Byrd, R. H., Lu, P. H. and Nocedal, J. (1997) Algorithm 778: L-BFGS-B: Fortran subroutines for large-scale bound-constrained optimization. *Acm Transactions on Mathematical Software* **23**(4), 550-560.

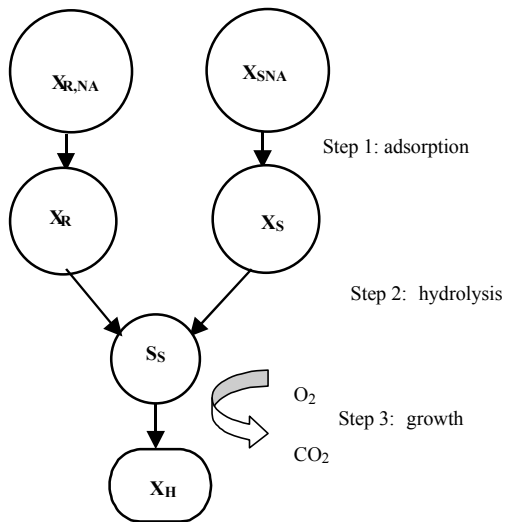


Figure 1. Diagram of the mechanisms of the COD degradation according to the selected model.

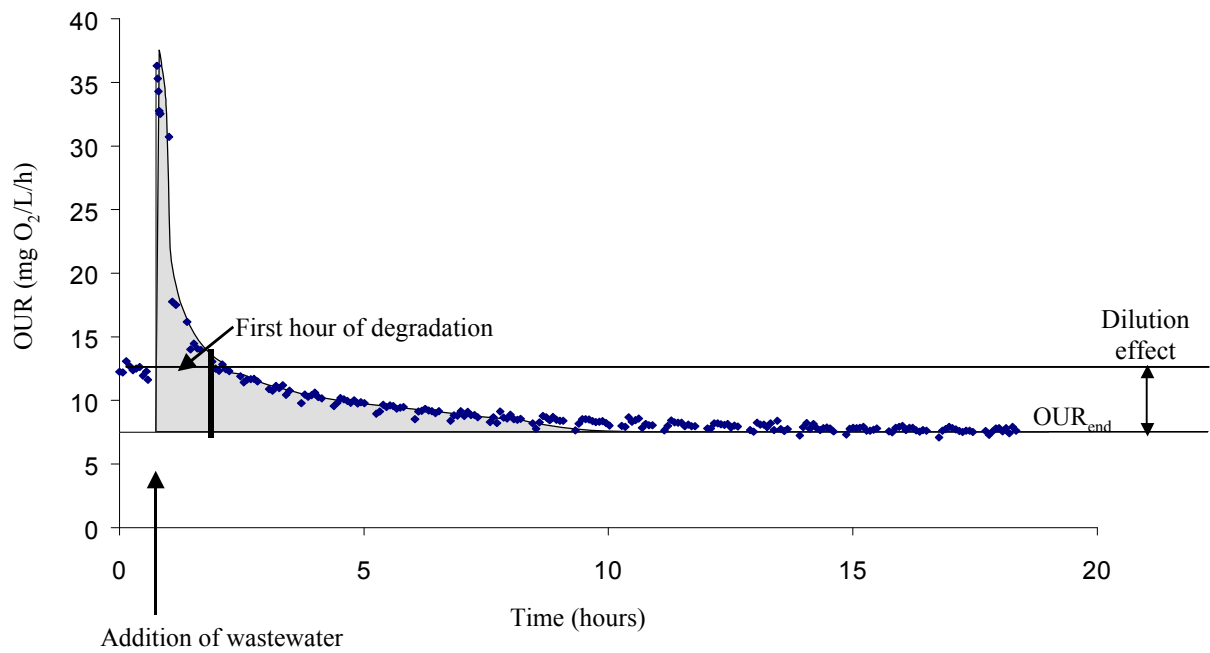


Figure 2. Respirometric curve with low S/X ratio of sample 12 (the hatched surface under the curve corresponds to OUR_{exp} , equation 2).

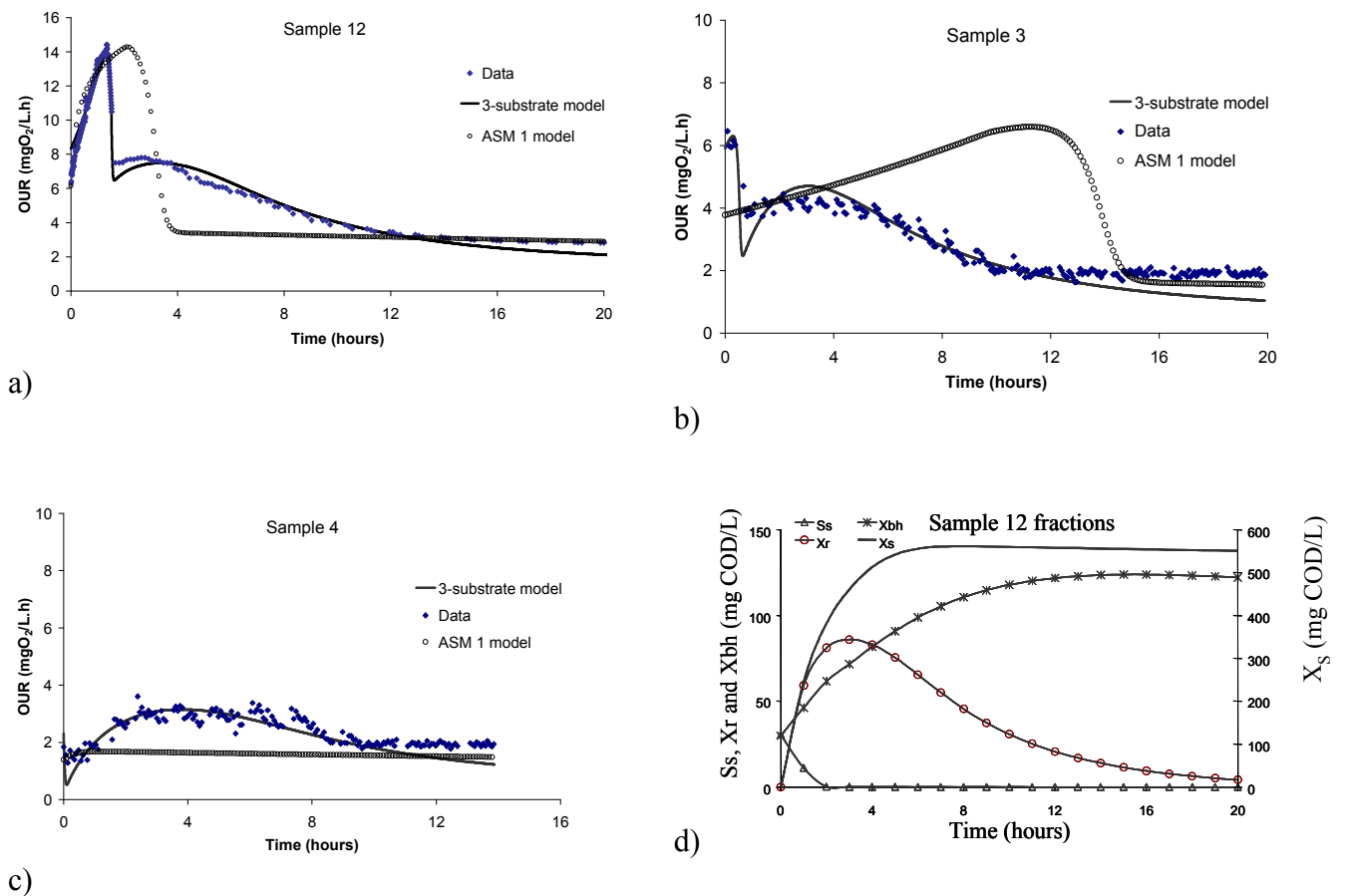


Figure 3. Typical respirometric curves of wastewater degradation (a: Type A; b and c: Type B). Simulated biodegradable fractions (d) are corresponding to the three-substrate model respirogram displayed in a).

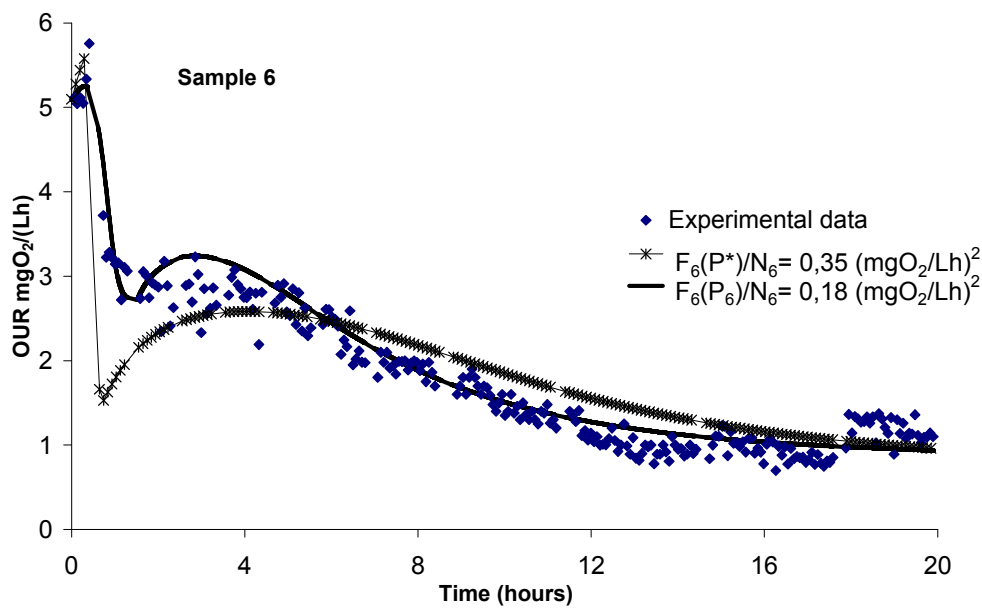


Figure 4. Simulations obtained with the sets of parameters resulting from the two optimisation procedures for sample 6.

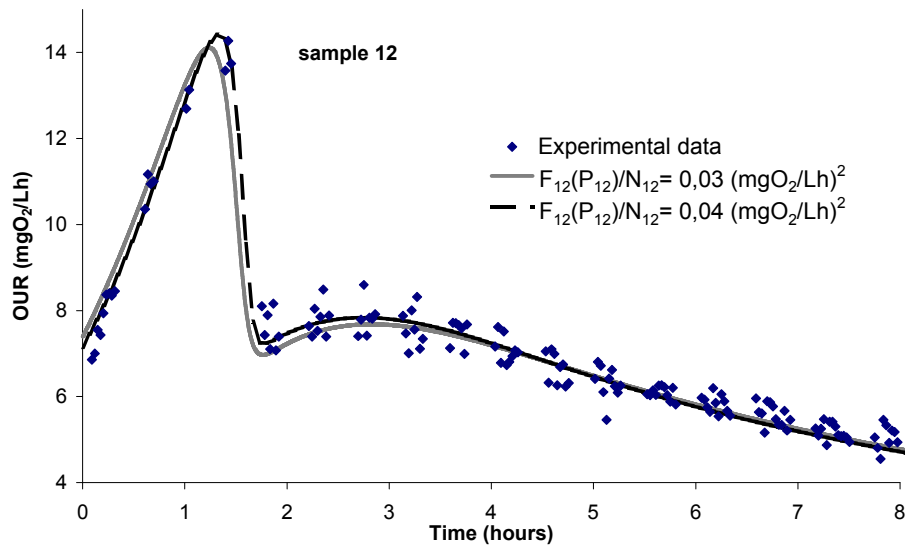


Figure 5. Simulations obtained with two sets of different parameters obtained with sample-by-sample optimisation procedure for sample 12.

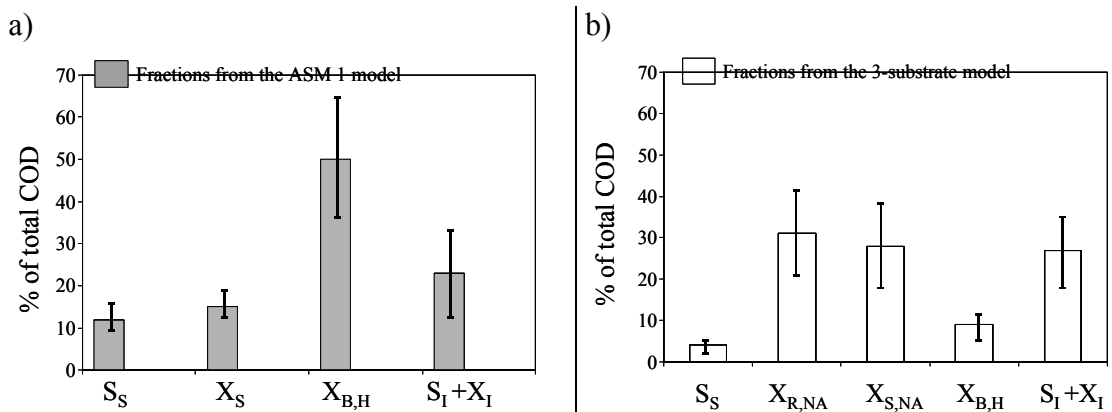


Figure 6. Average values of the fractions obtained with the ASM 1 and the three-substrate models expressed as percentages of the total COD with standard deviation.

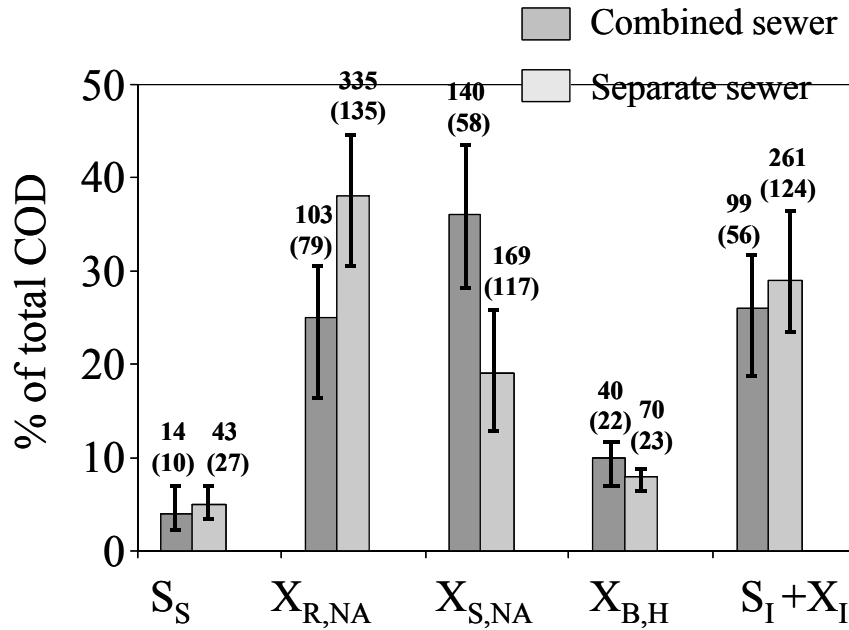


Figure 7. Average values of the fractions according to the selected model expressed as a percentage of the COD with standard deviation in the combined sewer (seven samples) and the separate sewer (six samples). Average concentrations (standard deviation) are in mg/L.

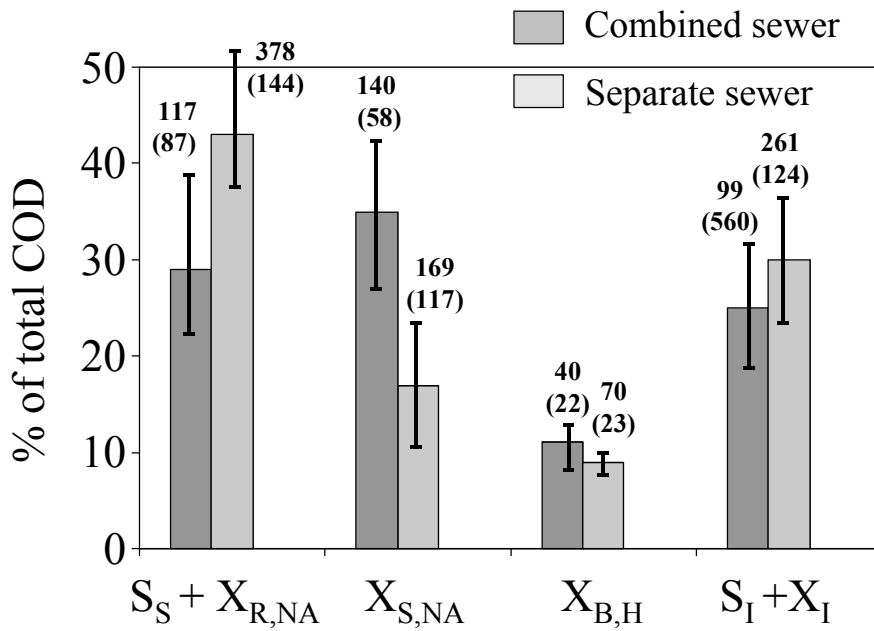


Figure 8. Average COD concentrations and percentages of the fractions according to formalism ASM I expressed in the combined (seven samples) and separate (six samples) sewers. Average concentrations (standard deviation) in mg/L.

Table 1 Wastewater samples analysed with rainfall, collecting system, mode of sampling and total COD concentration of the sample.

Sample label	Sewer	Rainfall (mm)	Sampling	Total COD (mg/L)	Type of curve
1	Combined	0	Grab	492	A
2	Combined	5.8	Grab	310	B
3	Combined	4.3	Grab	510	B
4	Combined	10.3	Grab	275	B
5	Combined	5.8	Grab	350	A
6	Combined	0.7	Composite - 24 h	350	B
7	Combined	0	Grab	428	A
8	Separate	5.8	Grab	963	A
9	Separate	4.3	Grab	610	A
10	Separate	10.3	Grab	950	A
11	Separate	5.8	Grab	750	A
12	Separate	0.7	Composite - 24 h	980	A
13	Separate	0	Grab	1013	A

Table 2. Fractions of the COD and kinetics of degradation according to the model used.

Variable →	<i>i</i>	1 S _I	2 S _S	3 X _I	4 X _S	5 X _R	6 X _{B,H}	7 X _{S,NA}	8 X _{R,NA}	9 S _O	Reaction rate ρ _{<i>j</i>} [ML ⁻³ T ⁻¹]
<i>j</i>	Process ↓										
1	Aerobic growth of heterotrophic biomass		$-\frac{1}{Y_H}$				1			$-\frac{1-Y_H}{Y_H}$	$\mu_H \left(\frac{S_S}{K_S + S_S} \right) X_{B,H}$
2	Adsorption of readily hydrolysable COD					1			-1		$K_a X_{R,NA} X_{B,H} \left(f_{ma} - \frac{X_R + X_S}{X_{B,H}} \right)$
3	Adsorption of slowly hydrolysable COD				1			-1			$K_a X_{S,NA} X_{B,H} \left(f_{ma} - \frac{X_R + X_S}{X_{B,H}} \right)$
4	Hydrolyse of readily hydrolysable COD		1			-1					$k_H X_R$
5	Hydrolyse of slowly hydrolysable COD		1		-1						$k'_H X_S$
6	Decay of heterotrophic biomass			f_{XI}			-1			$-(1-f_{XI})$	$b_H X_{B,H}$
<u>Stoichiometric Parameters</u>											<u>Kinetic parameters</u>
Heterotrophic biomass yield: Y_H Fraction of biomass leading to inert particulate products: f_{XI}		Soluble inert organic matter [M(COD)L ⁻³]	Readily biodegradable COD [M(COD)L ⁻³]	Particulate inert organic matter [M(COD)L ⁻³]	Slowly hydrolysable COD [M(COD)L ⁻³]	Readily hydrolysable COD [M(COD)L ⁻³]	Active heterotrophic biomass [M(COD)L ⁻³]	Slowly hydrolysable COD Before adsorption [M(COD)L ⁻³]	Readily hydrolysable COD Before adsorption [M(COD)L ⁻³]	Oxygen (negative COD) [M(-COD)L ⁻³]	Growth and decay of heterotrophic biomass : μ_H, K_S, b_H Hydrolysis : k_H, k'_H Adsorption : k_a, f_{ma}

Table 3. Optimal set of kinetic parameters obtained with ASM 1 model. The standard deviations of the three optimised parameters are given in brackets.

Parameter	μ_H	b_H	k_h	K_S	f_{ma}	K_X
Unit	d ⁻¹	d ⁻¹	d ⁻¹	mgCOD L ⁻¹	dimensionless	L mgCOD ⁻¹ d ⁻¹
$F(p^*)/N = 8.7$ (mgO ₂ L ⁻¹ h ⁻¹) ²	1.90 (0.02)	0.62	3.2 (0.1)	1	3	0.072 (0.020)

Table 4. Kinetic parameters obtained with both optimisation procedures and the three-substrate model (overall and sample by sample). The standard deviations are given in brackets.

Parameter	μ_H	b_H	k_h	k_h'	K_S	f_{ma}	K_a
Unit	d ⁻¹	d ⁻¹	d ⁻¹	d ⁻¹	mgCOD L ⁻¹	dimensionless	L mgCOD ⁻¹ d ⁻¹
$F(p^*)/N = 1.2$ (mgO ₂ L ⁻¹ h ⁻¹) ²	7.37 (1.2)	0.36	4.45 (1.68)	0.10	1	3	0.43 (0.05)
$\frac{1}{N} \sum_{i=1}^{13} F_i(p_i) = 0.8$ (mgO ₂ L ⁻¹ h ⁻¹) ²	8.6 (4.8)	0.28 (0.09)	9.5 (8.8)	0.61 (0.92)	4.6 (3.6)	4.0 (4.3)	0.32 (0.20)

Table 5. Sets of different parameters and COD fractions leading to very close cost functions for sample 12.

Parameter Unit	μ_H j^{-1}	b_H j^{-1}	K_h j^{-1}	k_h' j^{-1}	K_S mgCOD L^{-1}	f_{ma} dimensionless	K_a $\text{L mgCOD}^{-1} j^{-1}$
$F_{12}(p_{12})/N_{12} = 0.03 \text{ (mgO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1})^2$	17	0.36	4.4	0.23	1.4	13.6	0.07
$F_{12}(p_{12})/N_{12} = 0.04 \text{ (mgO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1})^2$	16	0.34	4.8	0.28	0.9	9.4	0.17
Fraction (mgCOD L^{-1})	S_S	X_{RNA}	X_{SNA}	X_{BH}			
$F_{12}(p_{12})/N_{12} = 0.03 \text{ (mgO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1})^2$	32	130	299	18			
$F_{12}(p_{12})/N_{12} = 0.04 \text{ (mgO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1})^2$	30	122	309	18			

A Dynamic Numerical Model To Characterize Labile Metal Complexes Collected with Diffusion Gradient in Thin Films Devices

MARIE-HÉLÈNE TUSSEAU-VUILLEMIN,^{*,†}
 RODOLPHE GILBIN,[†] AND
 MARTIAL TAILLEFERT[‡]

Cemagref QHAN, Parc de Tourvoie, BP 44,
 F-92 163 Antony Cedex, France, and School of Earth &
 Atmospheric Sciences, Georgia Institute of Technology,
 Atlanta, Georgia 30332-0340

The speciation of metal species extracted by diffusion gradient in thin films (DGT) devices during experimental deployments in simple metal–ligand synthetic solutions was numerically modeled, analyzed at steady state, and simulated in the dynamic regime. The modeled speciation of two well-known complexes (Cu–citrate and Cu–EDTA) are in good agreement with experimental data obtained in NaNO₃ solutions. For any metal complex, the rate at which the metal accumulates on the chelating resin is proportional to the concentration of free metal in solution plus a fraction of the metal complex concentration in solution equivalent to $\xi D_{ML}/D_M$. D_M and D_{ML} are the diffusion coefficients of the free and metal complex, respectively, and ξ characterizes the complex lability: it is defined as the fraction of metal complex lost when diffusing from the bulk solution to the chelating resin. Numerical simulations were used to explore the variations of ξ as a function of several operational and chemical parameters. Lability increases when the dissociation rate constant or the residence time of the metal complex within the hydrogel increase (i.e., by either increasing the thickness of the hydrogel or decreasing D_{ML}). Overall, the fraction of metal complex extracted by the DGT decreases when D_{ML} decreases, which confirms the ability of diffusion-restrictive hydrogels to separate the free metal fraction from complex solutions. Although the DGT model does not exactly comply with the voltammetric formalism, the lability criteria $\Lambda\tau^{1/2}$ used with voltammetric macroelectrodes is similar to the lability criteria ξ , except that it is valid for high metal–ligand ratio. To determine free metal concentrations in aquatic systems using DGT, it is necessary to account for the presence of numerous ligands with different complexing properties. Soon, the numerical model will be improved to include additional ligands competing for the metal, and new experiments will be designed to discriminate between different labile complexes. Experimental results obtained with different DGT devices (of different hydrogel thicknesses, for example) could be interpreted in terms of conditional kinetic characteristics of the dominant metal–ligand complex in solution.

* Corresponding author e-mail: marie-helene.tusseau@cemagref.fr; telephone: +33 1 40 96 61 98; fax: + 33 1 40 96 61 99.

[†] Cemagref QHAN.

[‡] Georgia Institute of Technology.

Introduction

There has been much experimental evidence that the toxicity of most divalent metals in aquatic environments is related to their “free” ion (aquo complexes) activity rather than to their total or even total dissolved concentrations (*J*). Following the free ion activity model (2) that gave the first theoretical basis for these observations, the biotic ligand model was recently formulated (3) that describes biological cells as possible ligands competing with other inorganic and organic species for binding metals. This model provides a priori estimations of metal toxicity, which compare reasonably well with experimental results in simple solutions containing well-defined ligands (4). Unfortunately, the chemical composition of most ligands in natural systems is unknown, and determining the free fraction of trace metals in aquatic systems remains a great challenge for environmental chemistry.

The diffusion gradient in thin films (DGT) technique was proposed by Davison and Zhang (5) as a robust way to quantitatively measure free and labile metal species in aquatic environments. The device is composed of a layer of polyacrylamide hydrogel of known thickness backed by a layer of chelating resin (Chelex 100), the whole system being isolated from the solution by a plastic holder. Once deployed, the device sequesters metal cations on the resin, creating a diffusion gradient between the bulk solution and the resin layer. This gradient induces a constant diffusion flux, whose characteristics are directly related to the physical properties of the gel, the temperature, and the concentration of labile metal in the bulk solution (6). The metal content of the resin increases with time and is measured after retrieval. It is further used to calculate the concentration of labile metal in solution during the deployment. One of the great advantages of the DGT technique is that the amount of metal to be measured (i.e., fixed on the resin) is proportional to the duration of the deployment. Thus, very low free and labile metal concentrations may be measured even with poorly sensitive techniques, provided that the device is deployed during a sufficiently long period of time. In addition, these measurements may be determined with the simplest analytical procedure (total metal analysis of the resin acidic eluate). In turn, some metal complexes may be partially labile, and the characteristics of the labile complexes measured with DGT need to be accurately defined to be able to use the device as a powerful monitoring tool.

The issue of labile metal–ligand complexes has long been discussed in the field of electrochemistry. Following the introduction of the concept of the reaction layer, lability criteria were formulated, as derived from a rigorous analytical solution describing the metal flux toward planar (7) or spherical (8) electrodes. These theoretical developments are however often applied to the case of an excess of ligand (i.e., because the total concentration of metal is usually much lower than that of the ligand in natural environments). Using these electrochemical concepts as a starting point, we developed a dynamic numerical model of the diffusion of metal species within a DGT device that does not require assumption on the ligand concentration. Numerical simulations were performed with well-known and theoretical ligands to better understand the concurrent physical and chemical processes that generate the observed metal concentration in a DGT device.

TABLE 1. Meaning, Unit, and Value of the Parameters and Symbols Used in the Model

parameter meaning	name	value ^a	unit
stability constant	K		$(\text{mol L}^{-1})^{-1}$
dissociation rate constant	k_{dis}		s^{-1}
formation rate constant	k_f		$(\text{mol L}^{-1})^{-1} \text{s}^{-1}$
diffusion coefficients of M, ML, and L within hydrogel	D_M, D_{ML}, D_L		$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$
diffusion coefficient ratio	$\epsilon = D_{ML}/D_M$		dimensionless
diffusion coefficients of ML and L within resin gel	D_{MLR}, D_{LR}		$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$
volume of resin layer	V_R	0.16	cm^3
surface area of gel	S	3.14	cm^2
thickness of gel	g		mm
thickness of resin	g_R	0.5	mm
accumulation rate of metal on resin	Φ_R		mol s^{-1}
lability criteria	$\xi = 1 - \text{ML}_N/\text{ML}_S$		dimensionless

^a If constant in all simulations.

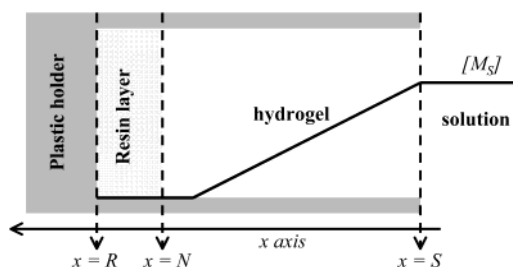


FIGURE 1. Schematic representation of the DGT device immersed in a bulk solution. A typical profile of metal concentration is displayed as an example (solid line).

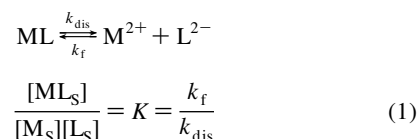
Experimental Section

The dynamic model describes the diffusion of free metal, ligand, and a metal complex from the bulk solution to the chelating resin via the hydrogel and the dynamics of association and dissociation of these species (Figure 1). The meaning of all the symbols and their units are presented in Table 1. The hydrogel and the resin layer are considered two distinct volumes with a common interface (at $x = N$). The hydrogel is connected to the bulk solution (at $x = S$) and the resin is backed by the plastic holder ($x = R$). We consider an ideal DGT, assuming that diffusion is homogeneous laterally, the diffusion layer in the solution is negligible compared to the thickness of the gel, and the binding by the Chelex resin is instantaneous and irreversible (these hypotheses were first proposed in ref 5 and not challenged by further experiments). Thus, we only address the lability window induced by the hydrogel–chelating resin interface. We consider that the metal complexes are able to diffuse within the resin gel layer, but we neglect the effect of the codiffusion of other ions (e.g., Na^+ and Cl^- in which the resins are conditioned) that increase diffusion in low ionic strength solutions (9) because we conducted our experiments at sufficiently high ionic strengths (see below). We do not either consider any binding of metals within the hydrogel, as was evoked by ref 10 because a different hydrogel was used in that particular study.

We consider a metal–ligand system with the cation M^{2+} , the external ligand L^{2-} , and the complex ML (signs are omitted below). Complexes with different stoichiometries may certainly exist in aquatic systems. However, the chemical composition of most natural organic ligands is still unknown, and it is traditionally assumed in complexation theory that 1:1 complexes are formed preferentially.

The related concentrations in solution ($[\text{M}_S]$, $[\text{L}_S]$, $[\text{ML}_S]$) verify eq 1, where K ($(\text{mol L}^{-1})^{-1}$), k_{dis} (s^{-1}), and k_f ($(\text{mol L}^{-1})^{-1} \text{s}^{-1}$) are the stability constant and the dissociation and

formation rate constants of ML, respectively:



Within the Hydrogel ($N < x < S$). The conservation equations can be established similarly for the three species (eqs 2–4). The first term refers to the diffusion (according to Fick’s second law), and the second term refers to the chemical mass balance. The free metal is removed by the resin by complexation, and thus, $[\text{M}_x]$ is negligible in the resin layer.

For $S < x < R$

$$\left[\begin{aligned} \frac{\partial[\text{M}_x]}{\partial t} &= D_M \frac{\partial^2[\text{M}_x]}{\partial x^2} + (k_{\text{dis}}[\text{ML}_x] - k_f[\text{M}_x][\text{L}_x]) \\ x \geq N, [\text{M}_x] &= 0 \end{aligned} \right] \quad (2)$$

$$\frac{\partial[\text{L}_x]}{\partial t} = D_L \frac{\partial^2[\text{L}_x]}{\partial x^2} + (k_{\text{dis}}[\text{ML}_x] - k_f[\text{M}_x][\text{L}_x]) \quad (3)$$

$$\frac{\partial[\text{ML}_x]}{\partial t} = D_{ML} \frac{\partial^2[\text{ML}_x]}{\partial x^2} + (-k_{\text{dis}}[\text{ML}_x] + k_f[\text{M}_x][\text{L}_x]) \quad (4)$$

where \overline{D}_L and \overline{D}_{ML} are respectively equal to D_L and D_{ML} within the hydrogel ($S < x < N$) and equal to D_{LR} and D_{MLR} within the resin gel ($N < x < R$).

Newman and Dirichlet boundary conditions are set for $x = R$ and $x = S$, respectively. The boundary conditions for each species at $x = R$ express that there is no flux across the plastic holder:

$$\frac{\partial[\text{M}_x]}{\partial x} \Big|_R = \frac{\partial[\text{ML}_x]}{\partial x} \Big|_R = \frac{\partial[\text{L}_x]}{\partial x} \Big|_R = 0 \quad (5)$$

At $x = S$, the supply of free metal, ligand, and complex is not limited by diffusion such that eq 1 dictates the concentration of each species at the solution–hydrogel interface. It follows that

$$[\text{M}_x] = [\text{M}_S], [\text{L}_x] = [\text{L}_S], [\text{ML}_x] = [\text{ML}_S] \quad (6)$$

At the time of immersion (initial condition), the hydrogel and the resin are free of metal or ligand. Therefore

$$S < x \leq R, \quad [\text{M}_x]_{t=0} = [\text{L}_x]_{t=0} = [\text{ML}_x]_{t=0} = 0 \quad (7)$$

TABLE 2. Description of the First Numerical Simulations

simulation a: citrate (0.95 μmol L ⁻¹)	simulation b: L ⁻ (0.66 μmol L ⁻¹)	simulation c: EDTA (1 μmol L ⁻¹)
[Cu ²⁺] = 0.25 μmol L ⁻¹ [Cu-citrate] = 0.75 μmol L ⁻¹ [citrate ²⁻] = 0.2 μmol L ⁻¹	Bulk Solution: [Cu _{tot}] = 1 μmol L ⁻¹ [Cu ²⁺] = 0.33 μmol L ⁻¹ [Cu-L] = 0.66 μmol L ⁻¹ [L ²⁻] = 10 ⁻⁵ μmol L ⁻¹	[Cu ²⁺] = 3 × 10 ⁻² μmol L ⁻¹ [Cu-EDTA] = 1 μmol L ⁻¹ [EDTA] = 0 μmol L ⁻¹
DGT Device g = 0.8 mm	DGT Device g = 0.8 mm	DGT Device g = 0.8 mm
Metal-Ligand Characteristics log(K) = 7.2 ^a k _f = 10 ⁹ (mol mol L ⁻¹) ⁻¹ s ⁻¹ c k _{dis} = 63.8 s ⁻¹ D _M = D _{ML} = D _L = 5 × 10 ⁻⁶ cm ² s ⁻¹ D _{MLR} = D _{LR} = 2.5 × 10 ⁻⁶ cm ² s ⁻¹	Metal-Ligand Characteristics log(K) = 10.3 ^b k _f = 10 ⁹ (mol mol L ⁻¹) ⁻¹ s ⁻¹ c k _{dis} = 0.005 s ⁻¹ D _M = D _{ML} = D _L = 5 × 10 ⁻⁶ cm ² s ⁻¹ D _{MLR} = D _{LR} = 2.5 × 10 ⁻⁶ cm ² s ⁻¹	Metal-Ligand Characteristics log(K) = 20.5 ^a k _f = 10 ⁹ (mol mol L ⁻¹) ⁻¹ s ⁻¹ c k _{dis} = 3 × 10 ⁻¹² s ⁻¹ D _M = D _{ML} = D _L = 5 × 10 ⁻⁶ cm ² s ⁻¹ D _{MLR} = D _{LR} = 2.5 × 10 ⁻⁶ cm ² s ⁻¹
Numerical Implementation N = 10 dx = 0.08 mm dt = 0.001 s duration = 3600 s	Numerical Implementation N = 40 dx = 0.02 mm dt = 0.005 s duration = 3600 s	Numerical Implementation N = 20 dx = 0.04 mm dt = 0.01 s duration = 3600 s

^a Obtained from the NIST database, made available by the INRS through <http://www.inrs-eau.quebec.ca/activites/groupes/biogeo.htm#mineql>; also found in ref 13. ^b Theoretical value. ^c After refs 11 and 12.

It is essential to estimate the metal flux to the chelating resin (Φ_R) at steady state because this is actually the parameter experimentally measurable. Φ_R is the sum of the mass fluxes of free metal reaching the resin either by diffusion from the hydrogel or from the dissociation of ML within the resin:

$$\Phi_R = \int_{x=N}^{x=R} k_{dis}[ML_x]S dx - SD_M \frac{\partial[M_x]}{\partial x} \Big|_{x=N} \quad (8)$$

where Φ_R is expressed in mol s⁻¹.

Numerical Implementation. These equations are coupled and nonlinear and admit no analytical solution. To visualize the evolution of [M_x], [L_x], and [ML_x] with time and with x but also to estimate a priori the metal flux accumulated on the resin layer for a given bulk solution, numerical simulations were performed using the Scilab 2.6 environment. [Free package developed by INRIA and available at <http://www-rocq.inria.fr/scilab/>.] The hydrogel and the resin layer were represented as a discrete succession of N layers of thickness g/N for the hydrogel and g_R/N for the resin layer. The concentrations of M, L, and ML in each layer i ([M_i], [L_i], and [ML_i]) were calculated by iteratively integrating eqs 2–4 with an explicit Eulerian scheme.

The boundary and initial conditions were set according to eqs 5–7. The time step and the thickness of the layers were carefully adapted for each simulation in order to ensure numerical stability and convergence of the results. The time step was typically 10⁻³–10⁻² s, and the thickness of the layers was typically 0.01–0.1 mm. The numerical simulations covered a period of several minutes (one to several hours) in order to reach a quasi-steady-state for all variables or to compare with experimental data.

Several dynamic simulations were performed in order to illustrate DGT measurements. Simulations a–c correspond to ideal solutions of Cu–citrate, Cu–L (a theoretical complex), and Cu–EDTA, respectively. Those copper complexes were chosen because of their different stability constants. Taking for k_f a typical value of 10⁹ (mol L⁻¹)⁻¹ s⁻¹ (11, 12), the k_{dis} vary from 63.8 s⁻¹ (Cu–citrate) to 3 × 10⁻¹² s⁻¹ (Cu–EDTA). Total ligand concentrations were not in excess as compared to the total copper concentration (1 μmol L⁻¹) and induced a significant complexation. The details of these simulations are given in Table 2.

The most delicate parameters to select were the diffusion coefficients within the hydrogel. Diffusion coefficients of free metals are provided by DGT Research Ltd., but diffusion

coefficients of ligands and especially their corresponding metal complexes remain poorly documented. Typically, citrate and EDTA diffusion coefficients in water at 25 °C are respectively 0.66 × 10⁻⁵ and 0.56 × 10⁻⁵ cm² s⁻¹ (14, 15). As shown previously with other ligands (16), the diffusion of citrate and EDTA in the hydrogel should not be significantly reduced as compared to water. The diffusion coefficient of the Cu–EDTA complex is around 0.56 × 10⁻⁵ cm² s⁻¹ in water at 25 °C (15), which is not significantly different from that of the free metal at the same temperature. However, because no relevant data could be found on the diffusion of the Cu–citrate complex in hydrogels or water, we decided to perform three simulations (a–c) under the simplifying assumption that D_M, D_L, and D_{ML} were equal (and taken to an arbitrary value of 0.50 × 10⁻⁵ cm² s⁻¹, approximately corresponding to the diffusion of Cu²⁺ at 18 °C). This simplification allows us in a first step to discuss the importance of the chemical parameters. The diffusion of ML and L in the resin layer is likely to be slower than in the hydrogel, because of the Chelex beads. The resin gel is composed of about 30% Chelex and about 70% hydrogel (6). Hence, the diffusion coefficients within the resin layer were estimated to be about 50% of those in the hydrogel (G. De Marsily, personal communication). Six other simulations were also performed to explore the influence of the thickness of the hydrogel, the D_{ML}/D_M ratio, and the metal–ligand ratio on the lability of the theoretical complex.

Finally, four simulations were performed to compare model predictions with experimental data obtained with DGT in Cu–citrate and Cu–EDTA solutions. Details are given in the next section and in Table 3.

DGT Measurements. The experimental procedure was very close to that described by ref 17. DGT holders (piston type, 2 cm diameter window) were purchased from DGT Research Ltd. as well as diffusive disks (0.8 mm thick) and Chelex resins. An Additional cellulose ester filter membrane (Millipore HAWP) was used to separate the gel from the solution. Cu–EDTA and Cu–citrate solutions were prepared in 0.01 mol L⁻¹ NaNO₃ (Table 3) such that the diffusion of co-ions does not interfere with the measurements. All the reagents were of analytical grade. The solutions were equilibrated overnight. DGT were deployed in 500-mL polypropylene beakers filled with each solution and stirred during 2, 4, and 6 h at 22 °C (±1 °C). Aliquots of the solutions

TABLE 3. pH, Total Copper, Citrate, or EDTA and Speciation of Copper in NaNO₃ (0.01 mol L⁻¹) Solutions^a

pH	Cu _T	citrate _T	Cu ²⁺	Cu–citrate	H–citrate ⁻	H ₂ –citrate	citrate ²⁻	simulated as		
								Cu ²⁺	Cu–citrate	citrate ²⁻
5.7	0.06	0.50	0.03	0.03	0.30	0.03	0.10	0.03	0.03	0.07
5.5	0.35	0.50	0.18	0.15	0.25	0.02	0.07	0.18	0.15	0.05

pH	Cu _T	EDTA _T	Cu ²⁺	Cu–EDTA ²⁻	Cu–HEDTA ³⁻	H ₂ –EDTA ²⁻	EDTA ⁴⁻	simulated as		
								Cu ²⁺	Cu–EDTA ²⁻	EDTA ⁴⁻
4.5	0.29	0.1	0.08	0.18	0.01	2 × 10 ⁻⁶	3 × 10 ⁻²⁰	0.08	0.18	5.5 × 10 ⁻²¹
4.5	0.26	0.2	0.16	0.1	6 × 10 ⁻³	4 × 10 ⁻⁷	1 × 10 ⁻²⁰	0.16	0.1	2 × 10 ⁻²¹

^a Expressed in μmol L⁻¹, as predicted with Visual MINTEQ and simplified in view of DGT modeling.

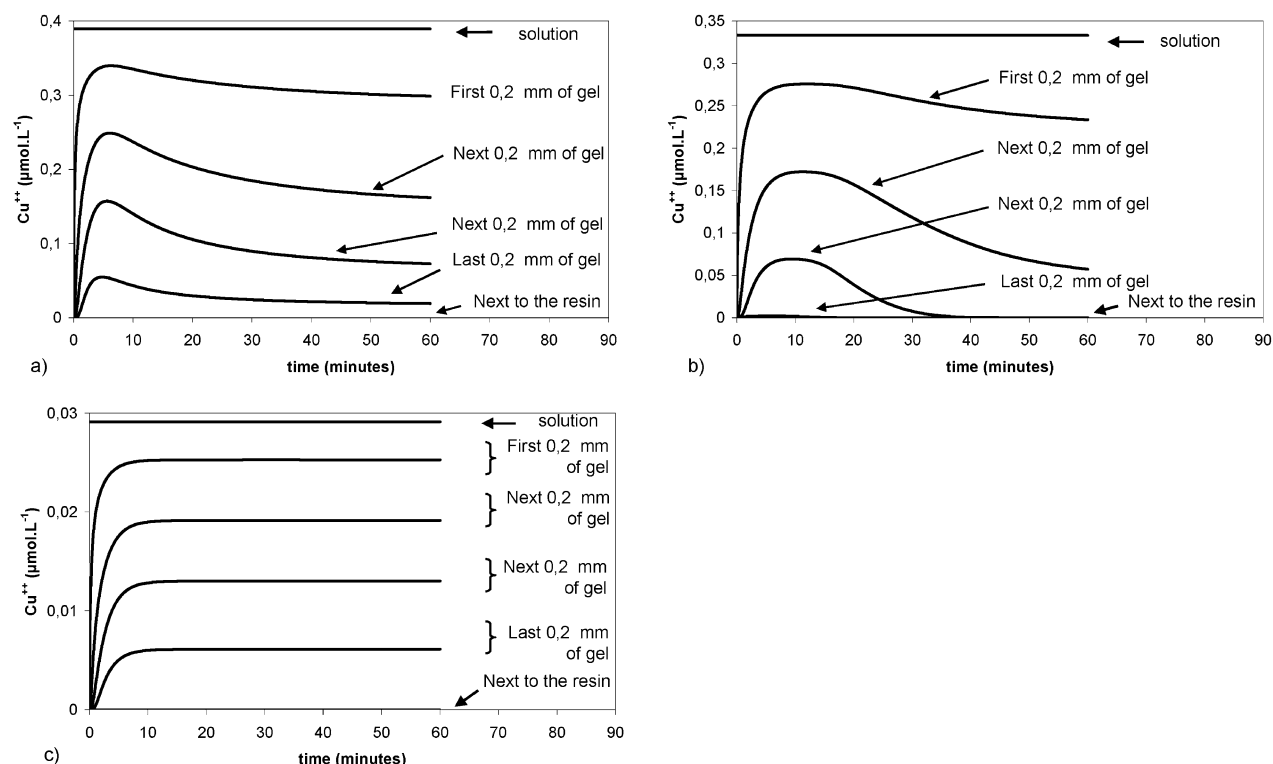


FIGURE 2. Evolution with time of the average concentrations of free Cu²⁺ within the hydrogel as simulated with the model: (a) citrate, (b) L, and (c) EDTA.

were regularly collected and acidified to pH 1 with HNO₃ before analysis. pH was also regularly checked. Once retrieved from the DGT, the resin gels were eluted overnight in 5 mL of 1 M HNO₃. Copper was measured in aliquots and eluents by graphite furnace–atomic absorption spectroscopy (GF–AAS Varian SpectrAA-20). The mass of metal sequestered on the resin was evaluated considering a 80% yield of elution (recommended by DGT Research Ltd.). We estimated a 10% relative error on our measurements, considering an error of 5% on DGT parameters (*S*, *g*, *V_R*) and relative standard deviation from Cu analysis by GF–AAS (typically < 5% on three replicates). The metal speciation was calculated with Visual MINTEQ [available at <http://www.lwr.kth.se/english/OurSoftware/Vminteq/>] (2.02, Stockholm, Sweden, 2002) simulations (Table 3). The distribution of metal species within the DGT device were calculated using a single complexation reaction of copper with citrate or EDTA with the same kinetic parameters as in simulations a and c. The concentrations of free and complexed copper in the bulk solution were determined by Visual MINTEQ. The corresponding free ligand concentration was evaluated from the equilibrium constant

and was therefore slightly different from the one simulated by Visual MINTEQ (which takes into account all other aqueous species). *D_M* and *D_{ML}* were taken equal to 5.74 × 10⁻⁶ cm² s⁻¹ (value recommended by DGT Research Ltd. [available at <http://www.dgtresearch.com>] for experiments at 22 °C).

Results and Discussion

[M_x], [L_x], and [ML_x] Profiles at Steady State. The minimum deployment time needed for reaching equilibrium differs from 10 min for EDTA (Figure 2c) to more than 1 h for citrate (Figure 2a). The metal–ligand system does not necessarily reach chemical equilibrium in each section of the hydrogel. Therefore, eqs 2–4 have to be solved in the transient case.

We may consider instead the total metal concentration because it is the measured fraction and it makes the partial differential equations linear. By summing eq 2 with eq 4 within the hydrogel, we obtain, at steady-state, a simplified

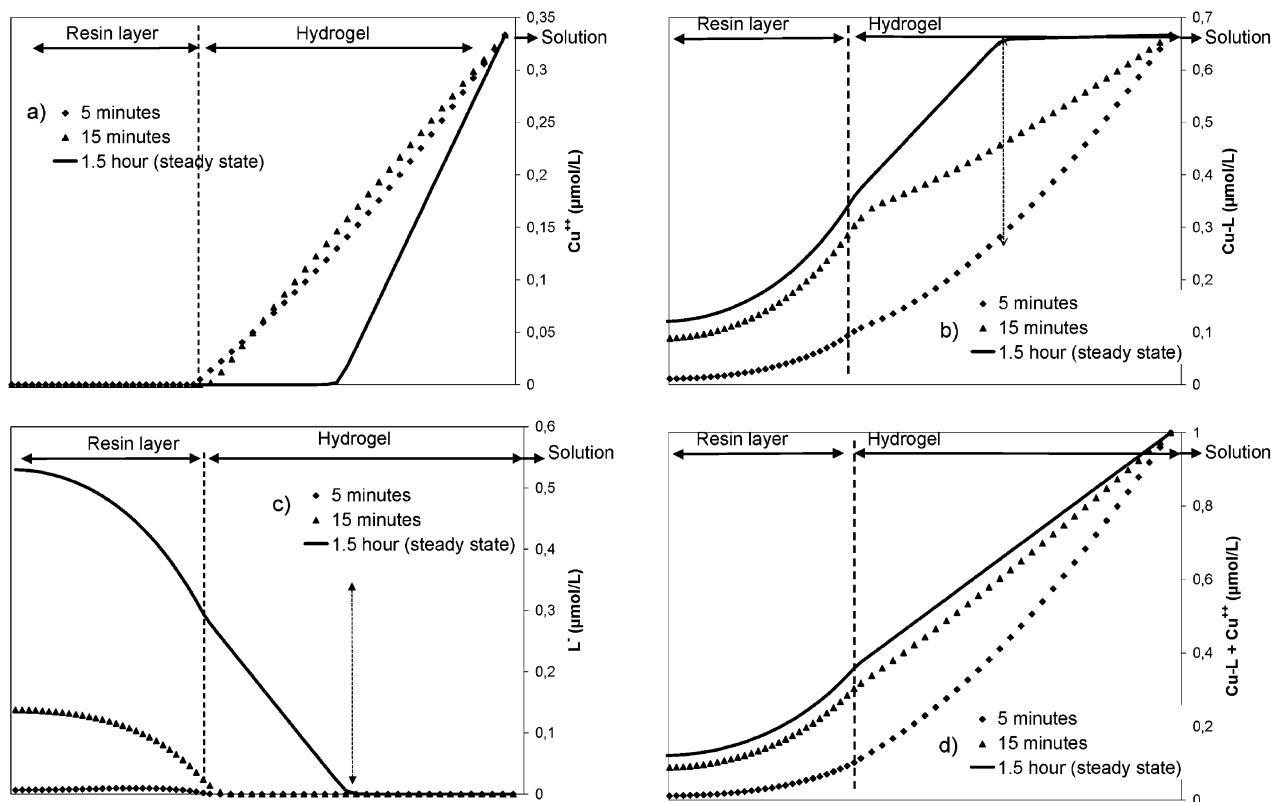


FIGURE 3. Example of the temporal evolution of (a) $[Cu^{2+}]$, (b) $[Cu-L]$, (c) $[L^{2-}]$, and (d) $[Cu_T]$ profiles within the hydrogel (from simulation b). The solid lines represent the steady-state situation.

TABLE 4. Numerically Simulated Lability of the Copper–Ligand Complexes^a

as a–c (Table 2)	(a) $k_{dis} = 63.8 \text{ s}^{-1}$ $\xi = 98\%$ $\tau = 407 \text{ s}; \Lambda = 8 \text{ s}^{-1/2}$ $\Lambda\tau^{1/2} = 164$	(b) $k_{dis} = 0.005 \text{ s}^{-1}$ $\xi = 44\%$ $\tau = 407 \text{ s}; \Lambda = 0.06 \text{ s}^{-1/2}$ $\Lambda\tau^{1/2} = 1.2$	(c) $k_{dis} = 3 \times 10^{-12} \text{ s}^{-1}$ $\xi = 0\%$ $\tau = 407 \text{ s}; \Lambda = 3 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1/2}$ $\Lambda\tau^{1/2} = 6 \times 10^{-6}$
as b, varying thickness of gel	$g = 0.4 \text{ mm}$ $\xi = 19\%$ $\tau = 102 \text{ s}; \Lambda = 0.06 \text{ s}^{-1/2}$ $\Lambda\tau^{1/2} = 0.6$	$g = 0.8 \text{ mm}$ $\xi = 44\%$ $\tau = 407 \text{ s}; \Lambda = 0.06 \text{ s}^{-1/2}$ $\Lambda\tau^{1/2} = 1.2$	$g = 1.6 \text{ mm}$ $\xi = 65\%$ $\tau = 1630 \text{ s}; \Lambda = 0.06 \text{ s}^{-1/2}$ $\Lambda\tau^{1/2} = 2.5$
as b, varying diffusion coefficients of ML	$\epsilon = 1$ $\xi = 44\%$ $\tau = 407 \text{ s}; \Lambda = 0.06 \text{ s}^{-1/2}$ $\Lambda\tau^{1/2} = 1.2$ $\epsilon = D_{ML}/D_M = 44\%$	$\epsilon = 0.5$ $\xi = 53\%$ $\tau = 815 \text{ s}; \Lambda = 0.11 \text{ s}^{-1/2}$ $\Lambda\tau^{1/2} = 3.3$ $\epsilon = D_{ML}/D_M = 26\%$	$\epsilon = 0.1$ $\xi = 74\%$ $\tau = 4074 \text{ s}; \Lambda = 0.77 \text{ s}^{-1/2}$ $\Lambda\tau^{1/2} = 49.5$ $\epsilon = D_{ML}/D_M = 7\%$
as b, varying ligand concentration	$[L_S]/([M_S] + [ML_S]) = 0.005\%$ $[M_S] = [ML_S]$ $\xi = 25\%$ $\tau = 407 \text{ s}; \Lambda = 0.1 \text{ s}^{-1/2}$ $\Lambda\tau^{1/2} = 2$	$[L_S]/([M_S] + [ML_S]) = 0.001\%$ $[M_S] = 0.5[ML_S]$ $\xi = 44\%$ $\tau = 407 \text{ s}; \Lambda = 0.06 \text{ s}^{-1/2}$ $\Lambda\tau^{1/2} = 1.2$	$[L_S]/([M_S] + [ML_S]) = 10\%$ $[M_S] = 5 \times 10^{-5}[ML_S]$ $\xi = 62\%$ $\tau = 407 \text{ s}; \Lambda = 5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1/2}$ $\Lambda\tau^{1/2} = 0.1$

^a ξ is estimated as $1 - ML_N/ML_S$ at steady state. τ and Λ are computed following ref 12 as $\tau = g^2/\pi D_{ML}$ and $\Lambda = \sqrt{k_{dis}(\epsilon^{-1} + K)/K} \sqrt{\epsilon(1+K)}$, with $K = [ML_S]/[M_S]$.

differential equation (eq 9) that is easily integrated into eq 10:

$$\frac{\partial([M_x] + [ML_x])}{\partial t} = D_{ML} \frac{\partial^2 [ML_x]}{\partial x^2} + D_M \frac{\partial^2 [M_x]}{\partial x^2} = 0 \quad (9)$$

$$D_{ML} \frac{\partial [ML_x]}{\partial x} + D_M \frac{\partial [M_x]}{\partial x} = C \quad (10)$$

where C is a constant. From eq 10, it comes that, if $D_{ML} \sim D_M$, the total metal concentration displays at steady-state a linear profile within the hydrogel with a slope that is inversely proportional to the diffusion coefficient (Figure 3d, solid line).

Conversely, it must be stressed that $[M_x]$ and $[ML_x]$ do not generally display steady-state linear profiles within the hydrogel especially in the case of partially labile complexes (Figure 3a,b, solid lines) or the diffusion coefficients are not similar.

The example displayed in Figure 3 features the simulation b where $[M_S]$ and $[ML_S]$ are of the same order of magnitude and $[L_S]$ is not in excess as compared to the total metal concentration (Table 4). The depletion of M in the vicinity of the resin promotes the breakdown of ML and a sharp increase of L at the hydrogel–chelating resin interface (Figure 3c). This increase in L in turn shifts the equilibrium toward the metal complex and depletes M even further in the vicinity of the resin. As a result, the free metal concentration reaches

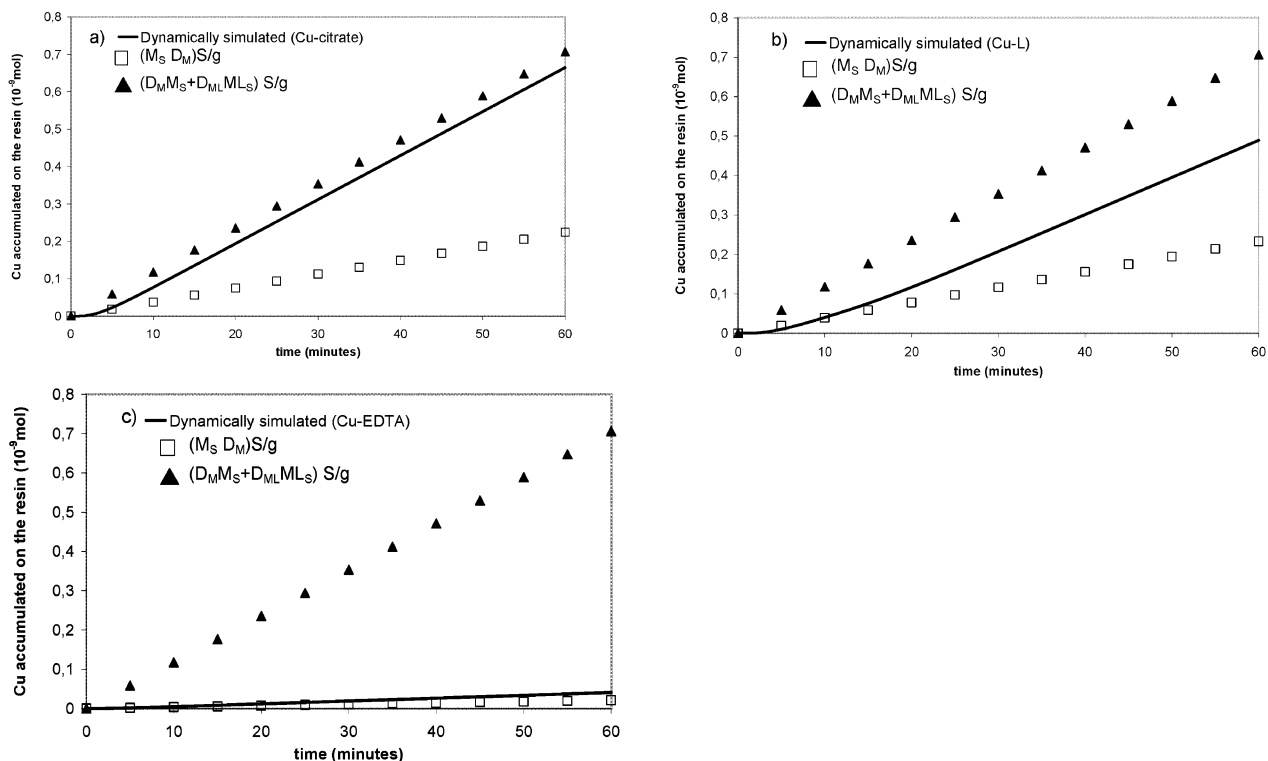


FIGURE 4. Cu accumulated on the resin layer as a function of deployment time simulated by the model (continuous line) and estimated in the two extreme cases where the metal complex is inert (squares) or fully labile (triangles): (a) Cu–citrate; (b) Cu–L; and (c) Cu–EDTA system.

zero far in the hydrogel at steady state. This feature is more or less pronounced depending on the metal–ligand ratio, the example given in Figure 3 being particularly characteristic.

Relationship between Metal Accumulation on Resin and Metal Concentration in Solution. Characterization of Labile Complexes. If the concentration of metal complex in the resin gel is at steady state, we can rewrite Φ_R (replacing eq 4 at steady state in eq 8) as

$$\Phi_R = \int_{x=N}^{x=R} D_{ML} \frac{\partial^2 [ML_x]}{\partial x^2} S dx - SD_M \frac{\partial [M_x]}{\partial x} \Big|_N$$

which can be integrated, using eq 5, into

$$\Phi_R = -S \left(D_{ML} \frac{\partial [ML_x]}{\partial x} \Big|_N + D_M \frac{\partial [M_x]}{\partial x} \Big|_N \right) \quad (11)$$

This expression indicates that the metal sequestered on the resin arises from the diffusion of both M and ML across the interface between the hydrogel and the resin. At steady state, the metal diffusion flux is constant across any plane of the gel (eq 10) and can therefore be calculated by integrating eq 11 between the solution and the resin–gel interface:

$$\int_{x=S}^{x=N} \Phi_R dx = -SD_{ML} \int_{x=S}^{x=N} \frac{\partial [ML_x]}{\partial x} dx - SD_M \int_{x=S}^{x=N} \frac{\partial [M_x]}{\partial x} dx$$

$$\Phi_R = \frac{S}{g} (D_{ML} ([ML_S] - [ML_N]) + D_M ([M_S] - [M_N]))$$

It is important to underline that the total metal reaches steady state (eq 9) much faster than each individual metal species (see Figure 3d as compared to Figures 3a and 3b). Thus, Φ_R is at steady-state after 10–20 min (Figure 4), whereas

we might expect more than 60 min for each metal species to reach full steady state (e.g., Figure 2b).

Finally because $[M_x] = 0$ at the hydrogel–chelating resin interface, it comes this interesting formulation of the rate at which the metal accumulates on the resin:

$$\Phi_R = \frac{D_M S}{g} [M_S] + \frac{D_{ML} S}{g} ([ML_S] - [ML_N]) \quad (12)$$

This expression proves that the total metal accumulation on the resin at steady state is linear with time, as initially proposed (5) and further experimentally verified (e.g., refs 6, 16, 17). It allows us to discuss the meaning of DGT measurements according to the lability of ML at the interface with the resin layer ($[ML_N]$). There are three possible scenarios:

1st case: $[ML_N] \sim 0$.

$$\Phi_R = \frac{S}{g} D_M \left([M_S] + \frac{D_{ML}}{D_M} [ML_S] \right) \cong \frac{DS}{g} [MT_S] \quad (13)$$

where $[MT_S]$ is the concentration of total metal in the solution. The rate at which the metal accumulates on the resin is proportional to $[M_S] + D_{ML}/D_M [ML_S]$. If $D_M \cong D_{ML} = D$, the flux is actually proportional to $[M_S] + [ML_S]$, i.e., the concentration of total metal in solution. The complex is *fully labile* and measured by DGT. This case is illustrated by the simulations of Cu–citrate solutions (Figures 4a and 5a).

2nd case: $[ML_N] = (1-\xi) [ML_S]$.

$$\Phi_R = \frac{SD_M}{g} \left([M_S] + \xi \frac{D_{ML}}{D_M} [ML_S] \right) \cong \frac{DS}{g} ([M_S] + \xi [ML_S]) \quad (14)$$

The rate at which the metal accumulates on the resin is proportional to $[M_S] + \xi D_{ML}/D_M [ML_S]$, which represents a metal concentration higher than the free metal concentration

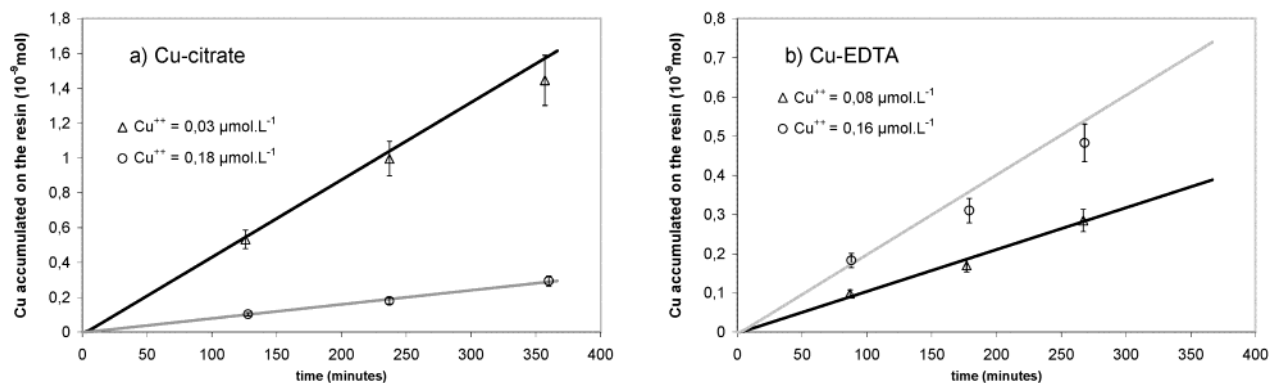


FIGURE 5. Model simulations (continuous lines) and experimentally measured (triangles and circles) Cu accumulated (10^{-9} mol) on the resin as a function of deployment time for two different initial concentrations of total Cu: (a) Cu-citrate and (b) Cu-EDTA solutions (details in Table 3).

and usually lower than the total metal concentration. If $D_M \cong D_{ML} = D$, the complex is measured at $\xi\%$ by DGT.

ML is *partially labile*. This case is illustrated by simulations b (Figures 3 and 4b).

3rd case: $[ML_N] = [ML_S]$.

$$\Phi_R = \frac{D_M S}{g} [M_S] \quad (15)$$

The rate at which the metal accumulates on the resin is proportional to the free metal concentration in solution.

ML is *inert* and not measured by DGT. Moreover, the hydrogel can be considered as “diffusion controlled”, with reference to Figure 3. This case is illustrated in the simulations with the Cu-EDTA system (Figures 4c and 5b). These results are validated by the good correlations between the simulations and experimental data with Cu-citrate and Cu-EDTA solutions (Figure 5).

Parameters Influencing Lability. Most of the existing theoretical work on metal complexes lability is related to voltammetric methodologies. The basic equations describing the dynamics of metal species within the DGT hydrogel (eqs 4–6) or in solution toward a planar electrode are actually the same (see, e.g., ref 7). Both are diffusion-controlled processes with diffusion and reactive layers, and both are influenced by metal lability. The diffusion layer in DGT is however spatially limited and controlled within the hydrogel, while that of (nonrotating) macroelectrodes is time-dependent and controlled by diffusion. In addition, the measurement is not completed during the dynamic regime but after reaching steady state. Moreover, because the chelating agent is embedded in a gel layer, the metal species are able to diffuse beyond the point where all the cations are trapped, which is not the case with a planar electrode usually considered as a hard surface. Finally, DGT measurements can be considered fully irreversible (i.e., the metal is permanently removed from the solution near the reactive layer) while the electron transfer at electrochemical devices can vary from fully reversible (i.e., once reduced, the metal is completely reoxidized and desorbed from the electrode surface between measurements) to fully irreversible depending on the metal involved. The system of partial differential equations (eqs 2–4) was solved in the field of electrochemistry (7), with the corresponding boundary conditions (the solution is at an infinite boundary, no diffusion across the electrode), and in the case of where an excess of ligand ($[L_\alpha]$ is constant). Under these hypotheses, the quantity $\Lambda t^{1/2}$, (where $\Lambda = \sqrt{k_{dis}} (\epsilon^{-1} + K[L_S]) / K[L_S] \sqrt{\epsilon(1+K[L_S])}$) and t is the duration of the measurement) was found to be an indicator of the lability of the metal complex ($\Lambda t^{1/2} \gg 1$ indicates a fully labile metal complex and $\Lambda t^{1/2} \ll 1$ indicates a nonlabile complex). According to ref 12, this

formula could also be used to evaluate the lability of metal complexes in DGT, provided that t is taken equal to the typical time τ needed for establishing the steady state in the hydrogel. This typical time is related to the thickness of the gel and the diffusion coefficient of either M or ML, as proposed by ref 6: $\tau = g^2 / \pi D_{ML}$.

Our formal modeling points out the parameter ξ , defined as $1 - [ML_N] / [ML_S]$ at steady state, as a quantitative indicator of the metal complex lability at the hydrogel-chelating resin interface. Note that the fraction of $[ML_S]$ measured by the DGT in addition to $[M_S]$ is equal to $\xi D_{ML} / D_M$. $[ML_N]$ and ξ were not formally established in the general case but were numerically estimated with the dynamical model in our various simulations. The variations of ξ with k_{dis} , g , and ϵ and the metal-ligand ratio were investigated, and the results are displayed in Table 4 together with τ , Λ , and $\Lambda t^{1/2}$.

Several features already theoretically proposed (5) or experimentally shown (6, 16) were reproduced with the model: ξ increases along with k_{dis} , according to the definition of lability (12); therefore, Cu-EDTA is inert whereas Cu-citrate is fully labile (see Table 4 simulated in the scenarios of Table 2 simulations a and b) and experimentally confirmed; see, e.g., Figure 5). Although these simulations were not performed with an excess of ligand, $\Lambda t^{1/2} \gg 1$ when k_{dis} increases in simulation a (Cu-citrate), the characteristic of a fully labile complex (12). The “theoretical ligand” was designed with an intermediate k_{dis} to provide an example of partial lability and to study the variations of ξ with other parameters. Indeed for this given metal complex, ξ increases asymptotically with the gel thickness (second row in Table 4) and is inversely proportionally to the diffusion coefficient of ML (third row in Table 4). These two parameters control the typical time needed by ML to reach steady state (τ) within the hydrogel whereas k_{dis} reflects its ability to dissociate. The longer the typical time τ and the higher the dissociation frequency are, the more labile the complex appears. Therefore, depending on the thickness of the hydrogel used, a given partially labile metal complex may theoretically appear labile or not. Our example shows that varying the thickness of the hydrogel from 0.4 to 1.6 mm could induce a variation of lability from 46% to 77% (second row in Table 4). Such variations would however be hardly visible for complexes with extremely low k_{dis} (i.e., strong complexes) such as Cu-EDTA. It is also interesting to note that, in cases of partial lability, $\Lambda t^{1/2}$ also increases with ξ but within a range of values that would not allow ones to conclude a priori on the lability of the metal complex. Finally, the lability of the Cu-L complex was found to decrease with an increasing metal-ligand ratio (last row in Table 4). This result was derived from simulations with Cu-L > 1 and is quite coherent with experimental data obtained with partially labile copper complexes (Cu-glycine

and Cu–cysteine) at high Cu–L ratios (18). In this case, $\Delta\tau^{1/2}$ also decreases, suggesting that the complexes change from fully labile to nonlabile, even if the electrochemical lability criteria was defined for systems with L in excess. The differences between DGT and a planar electrode were provided above. Among them, the diffusion of ML and L beyond the hydrogel–chelating resin interface is likely to increase the lability of metal complexes compared to a planar electrode. The resin layer provides a significant volume in which ML dissociates but the concentration of M remains extremely low because of the presence of the chelating ligand. Our modeling maximizes this effect because the sequestering of cations is considered instantaneous and irreversible in the resin layer. In addition, $\Delta\tau^{1/2}$ might not correctly reflect the complex lability in these experiments because the simulations were not conducted with an excess of ligand and that $[L_{\infty}]$ cannot be considered constant within the hydrogel (see Figure 3c).

Interpretation of Experimental Data. It appears from eqs 13–15 that the metal flux accumulated on the DGT resin is actually related to the concentrations of free, labile, or total metal in the bulk solution as expected. However, the full interpretation of experimental data with those relations a priori requires the precise knowledge of the diffusion coefficient of the metal–ligand complex (except in the case of an inert complex). This parameter is poorly documented. Following refs 15 and 19, one might infer that the diffusion of metal–ligand complexes is usually reduced as compared to that of the free metal because chelation increases the hydrodynamic radius of molecules. This was clearly evidenced in the case of copper complexes with humic and fulvic acids (19) but not with EDTA (15). In this case, the effect of chelation on the size of the complexes was apparently compensated by the loss of water molecules from the hydration shell of the metal ion (i.e., formation of inner-sphere complexes).

The formula initially proposed (5) to relate the concentration of metal in the bulk solution to the flux of metal to the DGT is $C_{DGT} = \Phi_{Rg}/SD_M$, which is in fact equal to $[M_S] + \xi D_{ML}/D_M [ML_S]$ (see eq 12), with ξ varying from 0 to 100% depending on the lability of the metal–ligand complex. Therefore, the smaller the D_{ML}/D_M ratio is, the less the complex should contribute to the measurement, despite its potential high lability (i.e., high ξ). Two converse effects operate here because a slow diffusing complex increases ξ (third row in Table 4) by increasing the typical time needed by the complex to reach steady state in the hydrogel. However, our simulations clearly show that, overall, $\xi D_{ML}/D_M$ decreases with D_{ML} (third row in Table 4), indicating that the lower the diffusion coefficient of the complex is, the less it contributes to the DGT measurement. An experimental illustration was given (19) in the case of humic and fulvic acids and for several hydrogels specifically designed to limit the diffusion of large molecules in the hydrogel. In the most selective gel, ϵ was equal to 8% and 4% for fulvic and humic acids, respectively. The percentage of Cu–FA or Cu–HA complexes measured

with DGT would therefore be equal to 0.08ξ or 0.04ξ , which warrants that they do not significantly contribute to the flux of metals to the resin layer even if they are chemically labile ($\xi > 0$). The use of restrictive gels is therefore a convenient way to operationally minimize the contribution of large metal complexes to DGT measurements.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Hao Zhang and Dr. William Davison for kindly providing the DGT devices through DGT Research Ltd. and the fruitful discussions they had in Lancaster. Three anonymous reviewers and Jean-Marie Mouchel (CEREVE) are sincerely acknowledged for their constructive remarks on a previous version of the manuscript. Part of this work was supported by the PIREN Seine Research Program (CNRS, France). R.G. acknowledges a postdoctoral grant from Cemagref.

Literature Cited

- (1) Tessier, A.; Buffle, J.; Campbell, P. G. C. In *Chemical and Biological Regulation of Aquatic Systems*; Buffle, J., De Vite, R. R. Eds.; Lewis Publishers: Boca Raton, FL, 1994; p 199.
- (2) Morel, F. M. M. *Principles of Aquatic Chemistry*; John Wiley & Sons: New York, 1983.
- (3) Di Toro, D. M.; Allen, H. E.; Bergman, H. L.; Meyer, J. S.; Paquin, P. R.; Santore, R. C. *Environ. Toxicol. Chem.* **2001**, *20*, 2383–2396.
- (4) De Schampelaere, K. A. C.; Janssen, C. R. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 48–54.
- (5) Davison, W.; Zhang, H. *Nature* **1994**, *367*, 546–548.
- (6) Zhang, H.; Davison, W. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3391–3400.
- (7) De Jong, H.; Van Leeuwen, H. P. *J. Electroanal. Chem.* **1987**, *234*, 17–29.
- (8) Galceran, J.; Puy, J.; Salvador, J.; Cecilia, J.; Van Leeuwen, H. P. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *505*, 85–94.
- (9) Alfaro-De la Torre, M. C.; Beaulieu, P.-Y.; Tessier, A. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *418*, 53–68.
- (10) Sangi, M. R.; Halstead, M. J.; Hunter, K. A. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *456*, 241–251.
- (11) Stumm, W.; Morgan, J. *Aquatic Chemistry*, 3rd ed.; Wiley-Interscience: New York, 1996.
- (12) Van Leeuwen, H. P. *Electroanalysis* **2001**, *13* (10), 826–830.
- (13) Fortin, C.; Gauthier, J. *Constantes de formation et différences d'enthalpie pour divers complexes métalliques: Comparaison de différentes bases de données*; Rapport Interne 136; INRS-Eau: Québec, Canada, 1995.
- (14) Kortly, S.; Sucha, L. *Handbook of Chemicals in Analytical Chemistry*; Wiley-Interscience: New York, 1985.
- (15) Leaist, D. G.; Hao, L. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1994**, *90* (1), 133.
- (16) Zhang, H.; Davison, W. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *398*, 329–340.
- (17) Gimpel, J.; Zhang, H.; Hutchinson, W.; Davison, W. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *448*, 93–103.
- (18) Vasconcelos, M. T.; Leal M. F. C.; Soares H. M. V. M. *Anal. Chim. Acta* **1996**, *330*, 273–281.
- (19) Zhang, H.; Davison, W. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 4447–4457.

Received for review May 31, 2002. Revised manuscript received February 2, 2003. Accepted February 12, 2003.

ES025839O

PERFORMANCE OF DIFFUSION GRADIENT IN THIN FILMS TO EVALUATE
THE TOXIC FRACTION OF COPPER TO *DAPHNIA MAGNA*

MARIE-HÉLÈNE TUSSEAU-VUILLEMIN,*† RODOLPHE GILBIN,‡ ESTELLE BAKKAUS,† and JEANNE GARRIC§
†Cemagref, UR Qualité et Fonctionnement Hydrologique des Systèmes Aquatiques, Parc de Tourvoie, BP 44, F-92163 Antony Cedex, France
‡IRSN/DPRE/SERLAB/LRE, Centre de cadarache, Bat 186, BP3, F-13115 Saint Paul Les Durance, France
§Cemagref, Laboratoire d'écotoxicologie, 3 bis quai Chauveau, CP 220, F-69336 Lyon Cedex 09, France

(Received 4 June 2003; Accepted 11 February 2004)

Abstract—This study investigates the relevance of the diffusion gradient in thin films technique (DGT) to measure copper's induced lethality on *Daphnia magna* in natural water spiked with various organic ligands. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), nitrilotriacetic acid (NTA), and glycine were used as artificial organic ligands in controlled solutions of mineral water. With EDTA, DGT measurement makes it possible to predict the toxicity of the mixture because Cu-EDTA complexes are inert, whereas DGT is of no help in the case of NTA, because Cu-NTA complexes are fully labile. The Cu-glycine complexes appear as partly labile and toxic. Humic acids as well as fresh and aged algae extracts also were used as models for natural dissolved organic matters. All three of them form copper complexes that are not toxic to *Daphnia magna* and appear as partly labile with open-pored DGT. However, the use of restricted gels in DGT greatly reduces the contribution of labile complexes, at least for humic acids and aged algae copper complexes. The DGT with restrictive gels, therefore, appears to be a powerful tool for measuring bioavailable copper in natural water bodies, especially when the dissolved organic matter mostly is of humic origin. The DGTs potential ability to mimic the lability induced by the biological uptake also is discussed.

Keywords—Bioavailability Copper Diffusion gradient Thin films technique Lability

INTRODUCTION

Although there is a considerable body of literature to be found on metal speciation in natural waters [1], direct in situ measurements remain a challenge because they involve specific techniques and skills (e.g., [2]). The diffusion gradient in thin films technique (DGT) was proposed by Davison and Zhang [3] as a robust way to measure quantitatively free and labile metal species in aquatic environments. The device is composed of a layer of polyacrylamide hydrogel of known thickness backed by a layer of chelating resin (Chelex 100, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), with the entire system being isolated from the solution by a plastic holder. Once deployed, the device sequesters metal cations on the binding resin, creating a diffusion gradient between the bulk solution and the inside. This gradient induces a constant diffusion flux and the metal content of the resin increases with time. After retrieval, the resin is eluted in acid and the quantity of accumulated metal is measured. The concentration of the labile metal in solution during deployment can be calculated from this quantity and the physical characteristics of the hydrogel [3]. Because the technique provides in situ preconcentration of metals, it avoids the usual contamination problems. Moreover, because the measurement is taken in the acidic eluate of the binding resin, DGT considerably reduces the analytical difficulties related to complex chemical matrices. As for any speciation technique, the definition of labile species is not straightforward. It was investigated by means of numerical modeling by Tusseau-Vuillemin et al. [4]. The DGT recently has gained from the development of restricted diffusive gels that minimize the sampling of humic metal com-

plexes [5]. Moreover, labile metal concentrations generally are claimed to be a good estimation of the bioavailable fractions of dissolved metals (for DGT measurements, see [6–8]). Indeed, copper concentrations measured in soils with DGT have been shown to correlate with the metal accumulated in plant roots [9].

In order to evaluate the adequacy of DGT measurements in natural waters in the estimation of the bioavailable concentrations of metals, we measured the labile copper concentrations corresponding to acute toxic effects on *Daphnia magna* in mineral water spiked with different organic ligands. These experiments provide both an insight into the protecting capacity of dissolved organic matters from several origins and an evaluation of the ability of DGT to estimate the bioavailable fraction of copper in such solutions and further in natural aquatic systems.

Given that toxic concentration depends on the bioavailability of the metal, i.e., its ability to reach the biological target, we carried out simple toxicity experiments to reflect bioavailability. In this sense, DGT metal concentration, compared with toxic concentration (expressed as EC50, i.e., lethal concentration, 50% population), can be interpreted as a reflection of toxicity and bioavailable metal concentrations. The aim is to use a reliable chemical in situ measurement instead of a bioassay in order to evaluate the bioavailable metallic contamination of water bodies and urban discharges.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and solutions

Mineral water was used for daphnid culture (Evian®, Evian, France) and for all bioassays. The ionic composition is given in Table 1, as analyzed with ion chromatography (DX-120, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) and measured by pH titration.

* To whom correspondence may be addressed
(marie-helene.tusseau@cemagref.fr).

Table 1. Major ion composition of the solutions used as biotest media. Citrate, iron, and metals (Mn, Mo, Zn, Co, Cu) also are found at trace levels in Lefevre-Czarda (LC) medium, but do not further influence copper speciation

	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺	CO ₃ ²⁻	SO ₄ ²⁻	Cl ⁻	NO ₃ ⁻
RM1 ^a								
mmol/L	1.95	0.99	0.22	0.02	5.8	0.1	0.13	0.06
mg/L	78	24	5	1	357	10	4.5	3.8
RM2 ^b								
mmol/L	1.38	0.74	0.15	0.50	0.86	0.15	0.09	0.53
mg/L	55.4	18.1	3.4	19.4	49	14.5	3.1	33

^a Reference medium 1—mineral water (RM1).

^b Reference medium 2 (1/3 LC in 2/3 mineral water) RM2.

This mineral water is suited for both the bioassays and the chemical analysis because of its stable and precisely known composition. When left equilibrating with atmosphere for 12 h, its pH rises and stabilizes at 8 ± 0.1 . The pH was checked regularly during the bioassays and the DGT deployments and was found to remain stable. All the reagents were of analytical grade. Ethylenediaminetetraacetic acid (Na₂-EDTA, Acros Organics, Geel, Belgium, trace metals <0.001%), nitrilotriacetic acid (Na-NTA, Acros Organics, 99%), glycine (Merck, Darmstadt, Germany, trace metals <0.001%), humic acids (Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) were used as organic ligands. Stock solutions were prepared with ultrapure water. The humic acid (HA) stock solution (1g/L) was prepared 24 h before experiments and filtered on precombusted glass fiber filters (Whatman glass fiber filter, Maidstone, UK) before use and dissolved organic carbon (DOC) analysis. The copper stock solution was an atomic absorption spectroscopy standard solution (Acros Organics, 1mg/ml Cu in 2% HNO₃). Natural dissolved organic matters also were obtained from fresh and aged algae solutions (FAI and AAI), following Gourlay et al. [10]. The FAI was obtained from a *Selenastrum capricornutum* culture in Lefevre-Czarda medium (LC, [11]), which was autoclaved for 90 min at 120°C and filtered on precombusted glass fiber filters (Whatman glass fiber filter). The AAI was obtained from the same algae that were cultured until they faded and then autoclaved for 90 min at 120°C and filtered on precombusted glass fiber filters (Whatman glass fiber filter). The DOC was measured with an OI-Analytical 1100 total carbon analyzer (OI Corporation, College Station, TX, USA). Inorganic carbon is removed automatically after acidification by means of N₂ bubbling, and then persulfate oxidation of organic carbon, followed by infrared spectrophotometric detection of the produced CO₂. The media used for the biotests consisted of mineral water spiked with the organic ligands, except for FAI and AAI, for which the algae solutions (LC) were diluted three times in mineral water. The resulting mineral composition of the solution is displayed in Table 1. The DOC concentrations were varied according to the complexing capacity of the ligand, so that a significant complexation of copper could be observed (Table 2).

Table 2. Concentrations of the organic ligands in the solutions used for the biotests; DOC = dissolved organic carbon

Ligand concn.	EDTA ^a	NTA ^b	Glycine
μmol/L	2	2	10
DOC concn.	Humic acids	Fresh algae	Aged algae
mgC/L	7.0 ± 0.7	9.6 ± 1.5	5.6 ± 0.3

^a Ethylenediaminetetraacetic acid.

^b Nitrilotriacetic acid.

Total and labile copper measurements

The DGT holders (piston type, 2-cm-diameter window) were purchased from DGT Research (Lancaster, UK), as well as the diffusive gel disks and the Chelex binding resins. Open-pored and restricted gels (thoroughly described in Zhang and Davison [5]), 0.8 mm thick, were used. The same binding resin was used for all devices. An additional cellulose ester filter membrane (Millipore® HAWP code filter, Molsheim, France, thickness 0.13 mm) was used to separate the gel from the solution. The restricted gels were used in addition to classic gels in the mineral water and in HA, FAI, and AAI solutions only. Two or three DGTs were deployed in each 500-ml polypropylene stirred beaker, for 2 to 6 h at 22°C (± 1°C), with a longer deployment duration for the less-concentrated solutions. The beakers were soaked previously for 24 h in 10% HNO₃, rinsed, and washed with ultrapure water. Aliquots of the solutions were collected regularly and acidified to pH 1 with HNO₃ before analysis. Once retrieved from the DGT, the resin gels were eluted overnight in 5 ml 1M HNO₃. Copper was measured in aliquots and eluates by graphite furnace—atomic absorption spectroscopy (Varian SpectraAA-20, Les Ulis, France). The mass of metal sequestered on the resin was evaluated considering an 80% yield of elution (as determined by Zhang et al. [12]). The labile copper concentration was calculated following Davison and Zhang [3], as $C_{DGT} = M\Delta g/tAD$, where M is the mass of copper accumulated on the resin after a deployment of duration t , Δg is the thickness of the diffusive layer (composed here of the 0.8-mm-thick hydrogel and the 0.13-mm-thick membrane), A is the surface of the window and D is the diffusion coefficient of copper (typically, $5.74 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ at 22°C in open-pored gels, $4.76 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ at 22°C in restricted gels; data from DGT Research, available at <http://www.dgtresearch.com>). Deviation among replicates typically was less than 15%. Total copper was measured with the same apparatus in the acidified aliquots of solutions. The copper speciation in the solutions was calculated with VMINTEQ software (2.02, Stockholm, Sweden, 2002, <http://www.lwr.kth.se/english/OurSoftware/Vminteq>).

Acute toxicity tests

The acute 24-h immobilization assay with young *D. magna* (<24-h-old) was performed following International Organization for Standardization Guidelines [13]. The test organisms originated from a healthy *D. magna* clone (K6), which was cultured in the laboratory in mineral water under controlled lighting (100 lux, with a 8:16-h light:dark period), temperature (24°C ± 1), and feeding conditions (daily feeding with *S. capricornutum* in exponential growth phase). For each of the six media listed in Table 2 as well as reference medium 1

([RM1] mineral water) and reference medium 2 ([RM2] mineral water + LC; Table 1), an acute toxicity assay was conducted consisting of at least six treatments (control + 5 copper concentrations). All solutions were prepared the day before the experiment in order to allow them to fully equilibrate. Each treatment was carried out with at least three replicates and five organisms per replicate. The number of immobilized daphnia was counted after 24 h. The dose-effect curves and the EC50 were obtained by nonlinear fitting (logistical model) to the experimental data, with REGTOX_EV6.3 software (E. Vindimian, available at <http://perso.wanadoo.fr/eric.vindimian/>). The optimal EC50s are given with the 95% confidence interval estimated by means of the bootstrap method (500 simulations), which is not necessarily centered on the optimal EC50 value.

Experimental set-up

After the completion of each of the toxicity tests, the total and labile copper concentrations were measured in the treatments corresponding to one of the replicates. The dose-effect curves and the corresponding EC50s were computed with total and labile copper concentrations, leading to two (total and labile copper) or three (total and labile with open and restrictive pore copper) different toxicity curves for the same test. These parameters were compared to the reference parameters (EC50 of total or labile copper in reference media) in order to evaluate the protective effect of the added ligands and the ability of DGT to predict the bioavailability of copper in such media. We are of course aware that bioavailability does not necessarily imply toxicity, especially for copper in natural water bodies. However, because this toxicity test was easy to implement, it was chosen as a first step toward the description of bioavailability (as toxicity only occurs when a metal can reach biological targets). The reference toxicity curves were calculated with plain mineral water (RM1, Table 1) for comparison with EDTA, NTA, glycine, and HA and with LC diluted in mineral water (RM2, Table 1), for comparison with FAI and AAI. Because the cationic composition of the solutions is the same, the dose-effect curves can be compared without taking into account competition with other cations [14].

RESULTS

Copper lability and toxicity in reference media

In addition to the expected minerals, we found a very low concentration of DOC in the mineral water (0.7 ± 0.3 mgC/L) that was neglected. The VMINTEQ simulations showed that because of the high concentration of carbonates, the speciation of copper ($[Cu] < 2$ mg/L, pH = 8) was dominated by $CuCO_{3(aq)}$ and that Cu^{2+} made up approximately 6% of total copper in both reference media. Inorganic complexes of copper usually are considered as fully labile within the range of pH we used [5,15], while most of the experiments were done in artificial solutions. In this study, labile copper (measured either with open-pored or restricted-pores gels) was found lower than total copper in both reference media: RM1 (mineral water) and RM2 (mineral water + LC), as shown in Figure 1. This mineral water actually is a relatively complex mixture that is, however, necessary to the organism's survival and rather close to natural water bodies. The dose-effect curves expressed as total copper are very similar and the EC50 obtained in both reference media are not significantly different (Fig. 1). These 50% effect concentrations are equal to 59 $\mu\text{g/L}$ in RM1 and 55 $\mu\text{g/L}$ in RM2 (as total copper) or 4 $\mu\text{g/L}$ (as a cupric ion, estimated with a

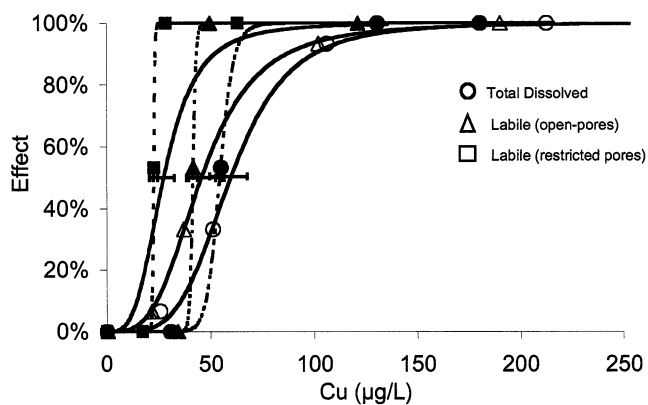


Fig. 1. Dose-effect curves of copper (total copper: circles; labile copper with open-pored gels: triangles; labile copper with restricted gels: squares) in reference medium 1 (mineral water, solid lines, open symbols) and in reference medium 2 (Lefevre-Czarda diluted in mineral water, dotted lines, black symbols). Only the mean effect observed in the three replicates is displayed. The horizontal bars represent the 95% confidence interval of the estimated median effective concentration.

VMINTEQA2 simulation). The labile copper EC50s obtained with open-pored and restricted-pores gels are lower (45 $\mu\text{g/L}$ and 27 $\mu\text{g/L}$ in RM1; 41 $\mu\text{g/L}$ and 22 $\mu\text{g/L}$ in RM2) than the total copper EC50s. These results are in agreement with those usually reported for *Daphnia magna* in hard mineral water [16]. The low toxicity of copper in the mineral water probably results from the combined effects of the high complexing capacity of carbonates and the competition of the other cations (especially calcium, magnesium, and sodium) for binding on biological membranes.

Copper lability and toxicity in mineral water spiked with synthetic organic ligands

Total and labile copper concentrations measured in each of the solutions used for the biotests are plotted against inorganic copper concentrations in Figure 2. The latter were estimated on the basis of VMINTEQ simulations, as the sum of all the simulated inorganic species of copper (Cu^{2+} , $Cu(OH)^+$, $Cu(OH)_2$, $CuCO_3$). This graph shows the extent of the organic complexation of copper and whether the organic complex is labile (as the difference between total and labile concentrations). These results confirm that EDTA copper complexes are not labile regarding the DGT technique, as expected from Zhang and Davison [5] and Tusseau-Vuillemin et al. [4]. The DGT labile copper concentrations are close to simulated inorganic copper concentrations (slope 1:1 in the graph). Conversely, the copper complexes formed with NTA appear almost fully labile (total and labile concentrations are roughly equal except at the highest copper concentration). The copper complexes formed with glycine display an intermediate behavior, as they appear partially labile (labile concentrations were lower than total copper concentrations and higher than inorganic copper concentrations).

The toxicity data are expressed as total, labile, and free ionic copper (Table 3) and compared to the reference values obtained in the mineral water. All the whole dose-effect curves are displayed in Figure 3. Modeled free cupric concentrations corresponding to the 50% effect remain remarkably constant when EDTA or NTA is added to the mineral solution, which means that these experiments could be interpreted with the free ion activity model (FIAM). This particular behavior of

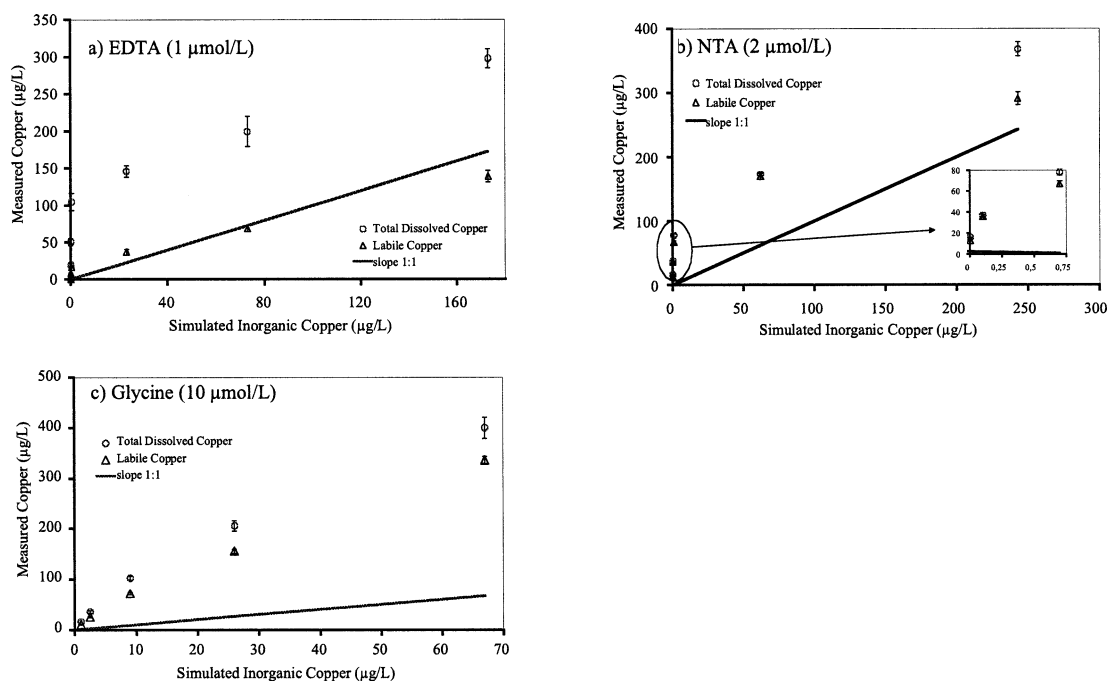


Fig. 2. Total (circles) and labile (triangles) copper concentrations against inorganic copper concentrations in the solutions used for the biotests ($\mu\text{g/L}$). The straight line features a slope 1:1 (measured copper = inorganic copper); (a) ethylenediaminetetraacetic acid ([EDTA] $1\ \mu\text{mol/L}$); (b) nitrilotriacetic acid ([NTA] $2\ \mu\text{mol/L}$); (c) glycine ($10\ \mu\text{mol/L}$).

Cu-EDTA and Cu-NTA has long been demonstrated. However, Campbell [17] stated that most of the published data supporting the FIAM usually are expressed in log-log scale, which was not necessary in this study. Conversely, we observed a much lower cupric EC_{50} when glycine was added, which confirms that Cu-glycine does not comply with the FIAM, as reported by Borgmann and Ralph [18].

Copper lability and toxicity in mineral water spiked with natural organic ligands

The dose-effect curves are displayed in Figure 4, the metal concentrations being expressed as total and labile copper concentrations, obtained with open- and restricted-pore DGT. To keep the graph clear enough, only one reference curve was displayed (labile copper, restricted gels). The DOC concentrations display a slight variability among the treatments (Table 4). The toxicity data obtained with AAI could not estimate the EC_{50} accurately because only the 0% and 100% effects were obtained in the treatments and, therefore, we could bracket only the 50% value. However, this rough estimation was sufficient to compare this experiment with the bioassays done in the reference media (Table 5). Obviously, whatever the added dissolved organic matter (DOM), the toxicity of copper decreased. Adding HA produced the maximum toxicity decrease, with the EC_{50} equal to $478\ \mu\text{g/L}$ as total Cu. Adding AAI resulted in approximately the same positive shift in toxicity as with FAI ($\text{EC}_{50} = 300\ \mu\text{g/L}$; range, $196\text{--}344\ \mu\text{g/L}$ as total Cu), with a lower average DOC concentration (respectively, 5.7 and $8.6\ \text{mgC/L}$). Labile (open-pored gels) copper concentrations range from 15% (HA) to 54% (FAI and AAI) of the total concentrations (averaged over the treatments). The restricted gels decreased this percentage very significantly for the HA solution, from 15% to 5% of the total copper. This decrease was less pronounced in FAI and AAI solutions: From 54% to 29% and to 26% of the total copper, respectively. Indeed, the restrictive pore gels specifically were designed to

reduce the contribution of labile humic ligands to the DGT measurements [5]. The chemical behavior of the aged algae exudates lies between humic acids (characteristic of an old refractory and allochthonous DOM) and fresh algae exudates (characteristic of a fresh biodegradable autochthonous DOM).

DISCUSSION

Theoretical correlation of DGT measurements with bioavailable metal concentrations

Most of the experiments aiming at relating the chemistry of divalent metals in solution and their bioavailability can be interpreted with the FIAM, following which the metal free ion activity is the determinant bioavailability parameter [17]. The DGT measures labile metal concentrations, i.e., free ion concentrations plus an a priori unknown fraction of the metal complexes to be found in the solution. Labile metal concentrations always remain lower than or equal to the total concentrations. Therefore, DGT measurements provide meaningful information on the bioavailable metal as long as the FIAM is followed, if pH and hardness concentrations (as competing cations) are stable, and if there are very few labile metal complexes in the solution (i.e., as long as most of the metal complexes would be inert in DGT sampling). We chose EDTA and NTA as an illustration, because their influence on metal toxicity has long been studied (see review by Campbell [17]) and their copper complexes are known to follow the FIAM. Our toxicity results confirm this very well as the 50% effect is obtained with a very stable free ion concentration (Table 3). However, Cu-EDTA complexes are inert in DGT (Fig. 2a, already noted by Zhang and Davison [5] and Tusseau-Vuillemin et al. [4]), whereas Cu-NTA complexes appear fully labile (Fig. 2b, already evidenced by Scally et al. [19] and Tusseau-Vuillemin et al. [20]). It follows that the labile dose-effect curve obtained with EDTA is very similar to that obtained in the reference mineral medium (Fig. 3a). A single

Table 3. The 50% effect concentrations (EC50) obtained in reference medium 1—mineral water (RM1) spiked with various ligands, expressed as labile and total copper concentrations. 95% confidence intervals are given in parentheses. The Cu^{2+} concentrations are computed by means of VMINTEQ (Ver 2.02, Stockholm, Sweden, 2002, <http://www.lwr.kth.se/english/OurSoftware/Vminteq>) simulations

	RM1	EDTA ^a (2 $\mu\text{mol/L}$)	NTA ^b (2 $\mu\text{mol/L}$)	Glycine (10 $\mu\text{mol/L}$)
Total copper EC50 ($\mu\text{g/L}$)	59 (49–67)	185 (174–195)	176 (168–238)	100 (71–101)
Labile copper EC50 ($\mu\text{g/L}$)	45 (37–55)	55 (49–61)	171 (165–173)	65 (53–76)
Cu^{2+} EC50 ($\mu\text{g/L}$)	3.9	4	3.4	0.9

^a Ethylenediaminetetraacetic acid.

^b Nitrilotriacetic acid.

DGT copper measurement in such solutions, therefore, predicts toxicity. Conversely, the labile dose-effect curve obtained with NTA is identical to the total curve (as expected because of the high value of the dissociation kinetic constant of the complex) and dramatically different from the curve obtained in the reference mineral medium (Fig. 3b): In this case, the DGT measurements do not predict toxicity.

Besides the classic experiments mentioned above, some ligands have been shown to produce metal complexes that do not obey the FIAM model. Among the key assumptions of the FIAM are that: The metal interacts with the living organism through surface complexation on the plasma membrane; the biological response is proportional to the number of membrane sites occupied by the metal; and the renewal of the solution at the vicinity of the membrane is much faster than the metal uptake and the expression of the biological response, i.e., the internalization flux is rate-limiting compared to the transport of the metal in solution [21,22]. These statements are not confirmed for ligands that form lipophilic complexes with the metal (and hence do not require a preliminary fixation on the membrane to induce toxicity). Other ligands forming low mo-

lecular-weight hydrophilic complexes capable of directly entering the plasma also were identified as exceptions to the FIAM. Copper-glycine complexes are one of these exceptions and have been shown to be toxic to *Daphnia magna* [18]. Indeed, our results indicate that adding 10 $\mu\text{mol/L}$ glycine results in a decrease of about 75% in the free copper EC50 compared to the reference mineral water (Table 3). However, because the copper-glycine complexes appear partly labile regarding DGT, the labile EC50 obtained in the reference mineral water and in the glycine solution remain very close (Table 3 and Fig. 3c) in our experiment, whereas the modeled free copper concentration was very low. This result probably is only a favorable coincidence, because such partially labile complexes have been shown to behave very differently regarding DGT, depending on the metal:ligand ratio and on other operational parameters such as the thickness of the gel [4,23]. Some of the FIAM exceptions occur because the internalization flux of metal is not rate-limiting, compared with the metal's diffusion, dissociation or desorption fluxes outside of the organism; therefore, the bioavailability determinant has been defined theoretically as the labile metal concentration,

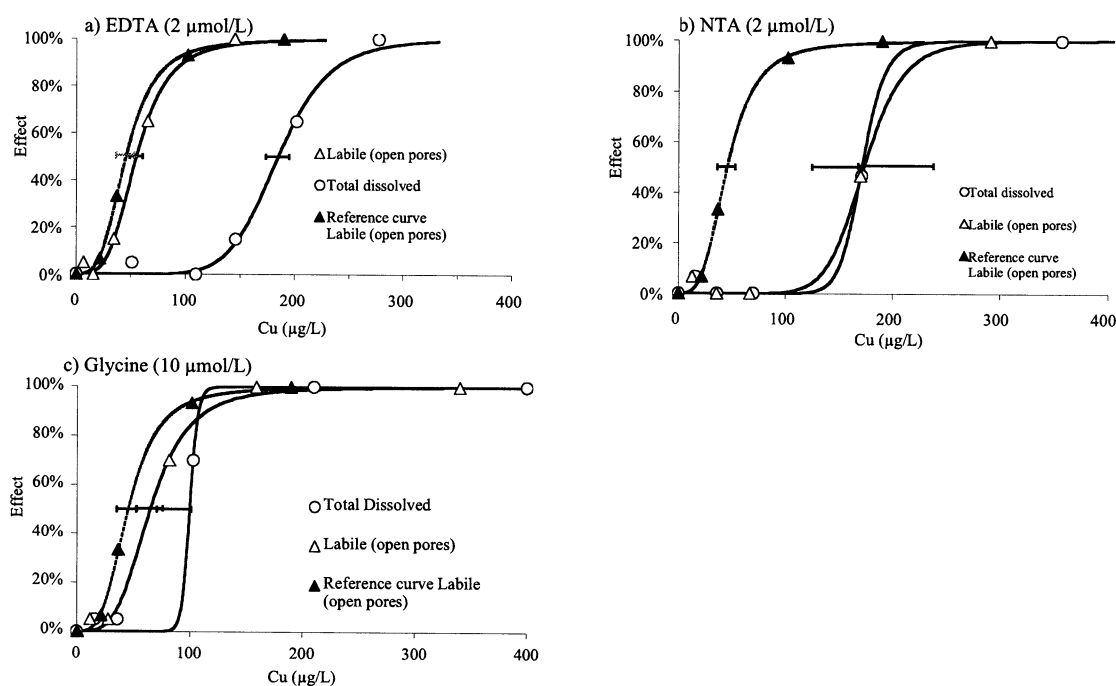


Fig. 3. Dose-effect curves obtained in mineral water spiked with (a) ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), (b) nitrilotriacetic acid (NTA), and (c) glycine as compared to the one obtained in reference medium 1 (mineral water; dotted black line). Copper is expressed as total concentrations (circles) and labile concentrations (triangles). The horizontal bars represent the 95% confidence interval of the estimated median effective concentration.

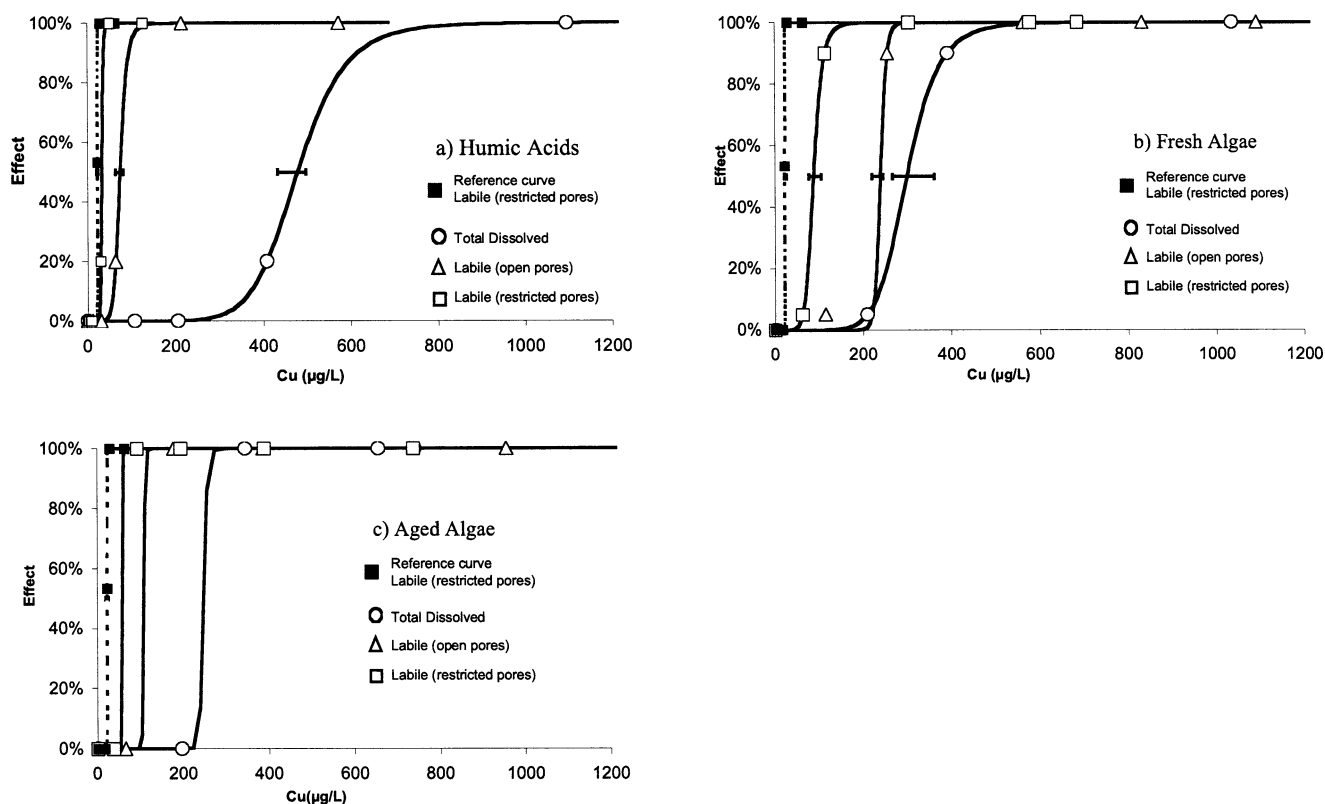


Fig. 4. Dose-effect curves obtained with (a) humic acids in reference medium 1 (RM1 mineral water), (b) fresh algae in reference medium 2 (RM2 Lefevre-Czarda diluted in mineral water), and (c) aged algae in RM2 as compared to the curve obtained in plain RM1, (a) dotted black line, or in plain RM2, (b) and (c) dotted line in black. Copper is expressed as total concentrations (circles) labile concentrations obtained with open-pored diffusion gradient in thin films technique ([DGT] triangles), and labile concentrations obtained with restricted DGT (squares). The horizontal bars represent the 95% confidence interval of the estimated medium effective concentration.

rather than the free ion activity [21]. This biologically defined lability is then linked to the ability of the metal complex to dissociate or desorb in the boundary diffusion layer around the organism. This also is how the labile metal complexes sampled with DGT are characterized [4], with hydrogel the boundary diffusion layer. When the biological internalization is no longer rate-limiting but rather coupled to a rate-limiting dissociating and diffusing process, DGT could be considered not only as a way to approach the free ion activity metal in solution, but also as a mimic of the biological membrane. Tubbing et al. [24] provided experimental evidence that complexed copper could be bioavailable to a significant extent, and that lability measurement (e.g., with Chelex resin exchange) could sometimes correlate better with a biological response than the free ion measurements, as with the early

comparison of DGT measurements in root uptake in soils [9]. In such systems, the bioavailability of metals is above all controlled by its remobilization from the particles and its diffusion toward the roots and, therefore, is reflected very well with DGT. One of the great advantages of DGT in this frame is that the detection window of labile complexes can be adjusted depending on the width and composition of the hydrogel [4,5,19].

Meaning of DGT measurements in solutions containing natural DOM

Ethylenediaminetetraacetic acid, NTA, and glycine copper complexes illustrate how the biological and physicochemical response can vary depending on the composition of the sampled solution. The most abundant natural organic ligands are

Table 4. Average dissolved organic carbon concentration (standard deviation in brackets). Percentage of labile copper versus total copper in the treatments with natural dissolved organic matter. (a) Open-pored gels, (b) Restricted gels; DOC = dissolved organic carbon

DOC (mgC/L)	HA ^a		FAI ^b		AAI ^c	
	7.0	(0.8)	9.3	(1.6)	5.6	(0.3)
% Labile Cu versus total Cu	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
	11	3	54	30	33	19
	15	4	65	29	52	27
	16	7	55	29	59	30
	19	5	41	28	71	29
Average	15	5	54	29	54	26

^a Humic acids.

^b Fresh algae.

^c Aged algae.

Table 5. The 50% effect concentrations (EC50) obtained in the reference mineral media with or without additional dissolved organic matter, expressed as total and labile (open-pored and restricted gels) copper concentrations. Ninety-five percent confidence intervals are given in parentheses. Cu²⁺ concentrations are computed by means of VMINTEQ simulations (Ver 2.02, Stockholm, Sweden, 2002, <http://www.lwr.kth.se/english/OurSoftware/Vminteq>); reference medium 1—mineral water (RM1), reference medium 2—mineral water + Lefevre-Czarda medium (RM2)

	RM1	Ha ^a (7.5 mgC/L)	RM2	Fal ^b (8.6 mgC/L)	AAI ^c (5.7 mgC/L)
Total Cu EC50 (μg/L)	59 (49–67)	478 (434–497)	55 (54–58)	300 (266–362)	[196–344] ^a
Labile Cu (open-pored gels) EC50 (μg/L)	45 (37–55)	55 (49–61)	41 (40–42)	240 (220–245)	[65–178] ^d
Labile Cu (restricted gels) EC50 (μg/L)	27 (22–33)	32 (31–36)	22 (22–23)	88 (77–105)	[36.5–92.8] ^d
Cu ²⁺ (simulated) EC50 (μg/L)	4		4		

^a Humic acids.

^b Fresh algae.

^c Aged algae.

^d [min, max] interval bracketing the EC50.

humic and fulvic acids. Their binding of metals is becoming well understood and powerful speciation softwares are available (e.g., the Windermere Humic Aqueous Model [WHAM], [25]). These models form the basis for accurate biotic ligand model simulations [26]. However, while the inorganic speciation is the straightforward part of the computation, simulating the humic binding of metals still requires specifying additional parameters. Moreover, other metal-complexing agents are released by aquatic organisms [27,28]. The copper complexing agents produced by fresh algae could even dominate copper speciation during bloom periods [27]. Natural dissolved organic matter, therefore, is composed of a variety of molecules, whose behavior regarding copper probably is intermediate between the chosen examples [1,29,30]. The complexity of such natural mixtures makes reliable and a priori numerical simulation of the metal speciation impossible, except in the case of an in-depth characterization. Moreover, it is not clear whether the free ion activity would then be the best indicator of the metal's bioavailability, insofar as natural DOM may contain (even if at very low levels) ligands forming copper complexes that do not follow the FIAM. Our methodology (comparison of dose-effect curves with or without DOM) allows us not to make any a priori hypotheses on the bioavailable forms of copper. However, because we need to observe 0 to 100% biological effects, our experiments are restricted to a given DOM metal range. The systematic titration of all the binding sites on the organic ligands, therefore, is not easy, although it would be necessary in order to fully extrapolate our results to relevant environmental levels of copper. Our data emphasize the great impact of HA on copper bioavailability (Fig. 4). Moreover, we observed that the labile dose-effect curves (open and restrictive pores) are rather close to or even quasi-identical to the reference curve obtained in mineral water. This means that part of the Cu–HA complexes are labile regarding DGT, but that the restrictive gels are well suited for the estimation of bioavailable copper in mineral waters spiked with HA. From a chemical point of view, the lability of the Cu–HA complexes implies that their average dissociation kinetics constant is rather high [4]. However, the molecules likely are large enough that they barely diffuse through the restricted gel. The impact of DOM originating from fresh or aged algae exudates also is considerable, although less pronounced than with HA. Moreover, the labile concentrations inducing a given effect are always strictly higher than in the reference medium, whatever the type of hydrogel used (Table 5 and Fig. 4). This means

that a significant part of the copper complexes is labile in DGT and that another significant fraction of these labile copper complexes is not sensitive to the use of restrictive gels. From a chemical point of view, this means that weak ligands of relatively small size therefore may be involved in the copper complexation with fresh algae exudates [20], whereas aged algae would produce inert ligands as long chain biopolymers [31]. The use of DGT with restrictive gels improves the estimation of bioavailable copper but still leads to an overestimation of its potential toxicity if the bioassay is not done. It must be stated that for HA and AAI, the percentage of labile copper compared to the total copper regularly increases with the copper concentration (from 11–20% for HA, from 33–71% for AAI; Table 4), which supports the generally accepted hypothesis that the metal binds the stronger sites at low concentrations and the weakest ones only at higher concentrations. Because the natural levels of copper are much lower than those tested in this study, we might infer that the copper complexes are on the whole stronger and less labile than those studied here. This suggests that DGT copper measurements in natural aquatic bodies dominated by humic and refractory organic matter could fit better with bioavailable copper than observed in our results.

CONCLUSION

We developed a coupled methodology, mixing biotests and chemical measurements in mineral media spiked with different types of dissolved organic matter in order to evaluate the ability of DGT measurements to estimate bioavailable copper concentrations. This method does not require the assumption that the FIAM is followed, although the interpretation of the results is much easier in this case. We illustrate how DGT measurements can improve or not the a priori estimation of the toxicity of a metal–DOM mixture on controlled solutions spiked with artificial ligands. The use of natural DOM shows that restrictive DGTs are most powerful in estimating the bioavailable copper in a humic acid solution, but less efficient in the case of algae exudate solutions, especially if the organic matter originates from a fresh culture. We expect that in natural waters, dissolved organic matter is composed of a mixture of humic substances and autochthonous organic matter of variable biodegradability. The operational consequences of these results therefore are that restrictive DGT will be most efficient in estimating the bioavailable copper concentrations in upstream reaches, where the organic matter originates mostly

from terrestrial leaching. Conversely, they might overestimate the bioavailable copper concentrations in downstream reaches, where the DOM is less humic, especially at the beginning of phytoplanktonic bloom. Other series of experiments, based on more sensitive biological endpoints would be necessary in order to test the relation between DGT labile metals and the bioavailable fraction on an extended range of DOM and metal environmental concentrations. However, this work provides a first insight into the potentials of this new monitoring tool in evaluating the bioavailable metal concentrations in natural waters.

Acknowledgement—We are very grateful to I. Chardon, D. Lintignat, and B. Vullat for their technical assistance. Part of this work was supported financially by Electricité de France through the ECOSED project and by the research program PIREN Seine (CNRS, France). R. Gilbin was funded with a postdoctoral grant from Cemagref in 2002.

REFERENCES

- Town RM, Filella M. 2000. Dispelling the myths: Is the existence of L1 and L2 ligands necessary to explain metal ion speciation in natural waters? *Limnol Oceanogr* 45:1341–1357.
- Xue H, Oestreich A, Kistler D, Sigg L. 1996. Free cupric ion concentrations and Cu complexation in selected Swiss lakes and rivers. *Aquat Sci* 58:69–87.
- Davison W, Zhang H. 1994. In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. *Nature* 367:546–548.
- Tusseau-Vuillemin M-H, Gilbin R, Taillefert M. 2003. A dynamical model to characterize labile metal complexes collected with diffusion gradient in thin films devices. *Environ Sci Technol* 37:1645–1652.
- Zhang H, Davison W. 2000. Direct in situ measurements of labile inorganic and organically bound metal species in synthetic solutions and natural waters using diffusive gradients in thin films. *Anal Chem* 72:4447–4457.
- Jak RG, Kramer KJM, Van Hatum B, Hooftman RN, Zwolsman JGG, Talsma MJG. 2000. Bioavailability and ecotoxicity of copper in fresh water ecosystems. *Proceedings, 3rd SETAC World Congress, Brighton, UK, May 21–25, p 183.*
- Webb JA, Keough MJ. 2002a. Measurement of environmental trace-metal levels with transplanted mussels and diffusive gradients in thin films (DGT): A comparison of techniques. *Mar Pollut Bull* 44:222–229.
- Webb JA, Keough MJ. 2002b. Quantification of copper doses to settlement plates in the field using diffusive gradients in thin films. *Sci Total Environ* 298:207–217.
- Zhang H, Zhao FJ, Sun B, Davison W, MacGrath SP. 2001. A new method to measure effective soil solution concentration predicts copper availability to plants. *Environ Sci Technol* 35:2602–2607.
- Gourlay C, Tusseau-Vuillemin M-H, Garric J, Mouchel J-M. 2003. Effect of dissolved organic matter of various origins and biodegradabilities on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 22:1288–1294.
- Agence Française de Normalisation. 1980. Essais des Eaux, Détermination de L'inhibition de Croissance de Scenedesmus Subspicatus par une Substance. AFNOR, Paris, France.
- Zhang H, Davison W. 1995. Performance characteristics of diffusion gradients in thin films for the in situ measurement of trace metals in aqueous solution. *Anal Chem* 67:3391–3400.
- International Organization for Standardization. 1993. Water quality—determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Strauss (Cladocera, Crustacea): Acute toxicity test. ISO 6341. Geneva, Switzerland.
- Meyer JM. 1999. A mechanistic explanation for the ln(LC50) vs ln(Hardness) adjustment equation for metals. *Environ Sci Technol* 33:908–912.
- Gimpel J, Zhang H, Hutchinson W, Davison W. 2001. Effect of solution composition, flow, and deployment time on the measurement of trace metals by the diffusion gradient in thin films technique. *Anal Chim Acta* 448:93–103.
- De Schampelaere KAC, Janssen CR. 2002. A biotic ligand model predicting acute copper toxicity for *Daphnia magna*: The effects of calcium, magnesium, sodium, potassium, and pH. *Environ Sci Technol* 36:48–54.
- Campbell PGC. 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free ion activity model. In Tessier A, Turner DR, eds, *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. John Wiley, New York, NY, USA, pp 45–102.
- Borgmann U, Ralph KM. 1983. Complexation and toxicity of copper and the free metal bioassay technique. *Water Res* 17:1697–1703.
- Scally S, Davison W, Zhang H. 2003. In situ measurement of dissociation kinetics and labilities of metal complexes in solutions using DGT. *Environ Sci Technol* 37:1379–1384.
- Tusseau-Vuillemin M-H, Gilbin R. 2002. Characterization of the labile complexes measured with DGT by means of a numerical modeling. *Proceedings, European Meeting on Environmental Chemistry, Geneva, Switzerland.*
- Van Leeuwen HP. 1999. Metal speciation dynamics and bioavailability. Inert and labile complexes. *Environ Sci Technol* 33:3743–3748.
- Hassler CL, Wilkinson KJ. 2003. Failure of the biotic ligand and the free-ion activity models to explain zinc bioaccumulation by chlorella kesslerii. *Environ Toxicol Chem* 22:620–626.
- Vasconcelos MT, Leal MFC, Soares HMVM. 1996. Influence of the ratio copper(II) to ligand concentrations and the nature of entering and leaving ligands on the lability of copper(II) complexes. *Anal Chim Acta* 330:273–281.
- Tubbing DMJ, Admiraal W, Cleven RFMJ, Iqbal M, Van de Meent D, Verweij W. 1994. The contribution of complexed copper to the metabolic inhibition of algae and bacteria in synthetic media and river water. *Water Res* 28:37–44.
- Tipping E. 1994. WHAM—A chemical equilibrium model and computer code for waters, sediments, and soils incorporating a discrete site/electrostatic model of ion-binding by humic substances. *Comput Geosci-UK* 20:973–1023.
- Di Toro DM, Allen HA, Bergman HL, Meyer JM, Paquin PR, Santore RC. 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. A. Technical basis. *Environ Toxicol Chem* 20:2383–2396.
- McNight DM, Morel FMM. 1979. Release of weak and strong complexing agents by algae. *Limnol Oceanogr* 24:823–837.
- Fish W, Morel FMM. 1983. Characterization of organic copper-complexing agents released by *Daphnia magna*. *Can J Fish Aquat Sci* 40:1270–1277.
- Leenheer JA, Croué J-P. 2003. Characterizing dissolved aquatic organic matter. *Environ Sci Technol* 37:18A–26A.
- Croué J-P, Benedetti MF, Violleau D, Leenheer JA. 2003. Characterization and copper binding of humic and nonhumic organic matter isolated from the South Platte River: Evidence for the presence of nitrogenous binding site. *Environ Sci Technol* 37:328–336.
- Allard B, Templier J, Largeau C. 1998. An improved method for the isolation of artifact-free algaenans from microalgae. *Organic Geochemistry* 28:543–548.

EFFECT OF DISSOLVED ORGANIC MATTER OF VARIOUS ORIGINS AND BIODEGRADABILITIES ON THE BIOACCUMULATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN *DAPHNIA MAGNA*

CATHERINE GOURLAY,*†‡ MARIE-HÉLÈNE TUSSEAU-VUILLEMIN,§ JEANNE GARRIC,|| and 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

(Received 4 September 2002; Accepted 11 November 2002)

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 matter (DOM) on the bioaccumulation of fluoranthene, pyrene, or benzo[*a*]pyrene in *Daphnia magna* was studied. Commercial humic substances, DOM from the aeration 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 to a lesser extent. Fluoranthene bioaccumulation was affected by the presence of humic acids only. In each experiment, the solution containing humic DOM led to the lowest bioaccumulation. Supposing that only dissolved PAHs were bioavailable, the reduction of bioaccumulation allowed a biological estimate of the partition coefficients of DOM and PAH, K_{DOC} . The estimated coefficients were positively related to the aromaticity of DOM and negatively related to its biodegradability.

Keywords—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]. Polycyclic aromatic hydrocarbons, 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], Levesee 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.



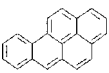
The intensity of interactions depends on the characteristics of the organic matter. Humic substances that form the hydrophobic part of natural organic matter and may represent up to 60% of DOM in lakes and rivers have a great potential to bind PAHs [13]. Kukkonen et al. [14] showed that humic substances 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 DOMs. 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 in aquatic ecosystems, also contain large amounts of nonhumic [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 has been available.

In this study, the bioaccumulation of three PAHs (fluoranthene, pyrene, and benzo[*a*]pyrene) by *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 toward 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.

* To whom correspondence may be addressed (gourlay@cereve.enpc.fr).

Table 1. Structures and characteristics of the tested polycyclic aromatic hydrocarbons (from Schwarzenbach et al. [26]). Characteristics of the spectrofluorimetric analysis

	Fluoranthene	Pyrene	Benzo[<i>a</i>]pyrene
Structure			
Octanol–water partition coefficient, log K_{ow}	5.22	5.13	6.50
Aqueous solubility, S_w ($\mu\text{g/L}$)	240	136	1.5
Spectrofluorimetry			
Excitation wavelength (nm)	287	275	265
Corrected fluorescence F at wavelength λ	$F_\lambda = I_\lambda - I_{400}$	$F_\lambda = I_\lambda - I_{480}$	$F_\lambda = I_\lambda - I_{395}$
Maximum emission wavelength $\lambda(\text{max})$ (nm)	470	380	407

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 spectrofluorometric 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 $\mu\text{S/cm}$). 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).

Five types of organic matter solutions from different origins were used. A solution of commercial humic acids (HA; Aldrich) was prepared as follows: After dilution in the water used for culture, the solution was left in the dark at 4°C for at least one month in order to allow flocculation and settling of nondissolved organic matter. Before use, the HA solution was filtered on a 0.7- 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, left to 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 was thus similar to DOM of plant pilot outputs. Two samples were collected from the same pilot with-

in 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. The same algae were cultured until they fade and then were autoclaved and filtered in the same way.

All DOM solutions were stored in the dark at 4°C. All but HAs were used within two weeks after preparation or collection. After addition of PAH and DOM in water, the exposure media were allowed to sit for 1 h 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 ($\text{ABS}_{270} = 1,000 \times A_{270}/[\text{DOC}]$) was calculated to estimate the aromatic carbon content [24].

The biodegradation of DOM in all but WAB solution was followed during 18 d at room temperature (Fig. 1). We inoculated 350 to 400 ml of each DOM solution with 350 to 400 μl of activated sludge from a sewer treatment plant. Solutions were aerated so as to keep aerobic conditions in the solutions. Dissolved organic carbon content was measured regularly. After 8 d, DOC reached a plateau. The biodegradability of the solution was expressed as the mean percentage of DOC decrease after 8, 12, and 18 d. 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

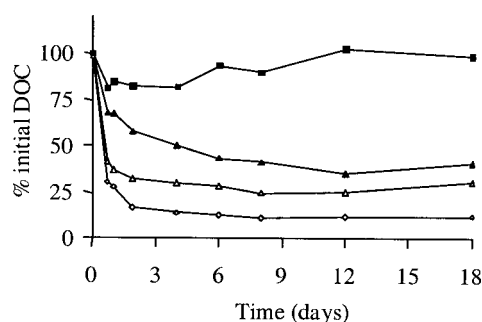


Fig. 1. Evolution of dissolved organic carbon (DOC) concentrations in organic matter stock solutions during biodegradation experiments. Black squares, humic acids; black triangles, fanned algae extracts; open triangles, fresh algae extracts; open squares, artificial substrate.

Table 2. Dissolved organic matter (DOC) characteristics: concentrations in the stock solution and in exposure media (mg/L DOC), absorptivity at 270 nm (ABS_{270} , L/g/cm) and 18-d biodegradability (%)

	Stock solution	Exposure media	ABS_{270}	Biodegradability
Commercial humic acids	51	0–10	55	3%
Artificial substrate	1,000	0–30	5.1	88%
Filtered water from aeration basin	28 and 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 of the water from an aeration basin was not measured. It was estimated from biodegradability of sewage treatment plant effluent data found in Tusseau-Vuillemin and Le Revlillé [19].

biodegradability of filtered effluents of sewage treatment plants that have a similar efficiency (~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, *S. 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-d-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 to clean mineral water in order to clear their guts.

Experimental set-up

For each type of DOM, daphnids were exposed for 4 h in water spiked with one PAH and DOM at room temperature in the dark to avoid photodegradation of PAHs. Nominal fluoranthene, pyrene, and benzo[a]pyrene concentrations were, respectively, 25, 2, and 1 $\mu\text{g/L}$. 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 daphnid 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 hereafter referred to as daphnid blanks. In order to reduce the result variability due to 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 spectrofluorometric measurement

For each measurement, 15 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 min using a 3-mm- ϕ sonicating

horn (Vibracell™ 72434, 50 W; Bioblock Scientific, Illkirch, 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 a 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 spectrofluorometer (FP-750; Jasco, Nantes, France) equipped with a 150-W 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, 275, 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 nonzero 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 extracts 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 $F_{\lambda_{\text{max}}}$ in daphnid extract spectra at λ_{max} (Table 1) are linearly related to PAH content as $[\text{PAH}]_{\text{org}} = \alpha F_{\lambda_{\text{max}}}$, 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 daphnid extracts always was not influenced by the presence of DOM in the media (Fig. 2).

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 $[\text{BaP}]_{\text{org}} =$

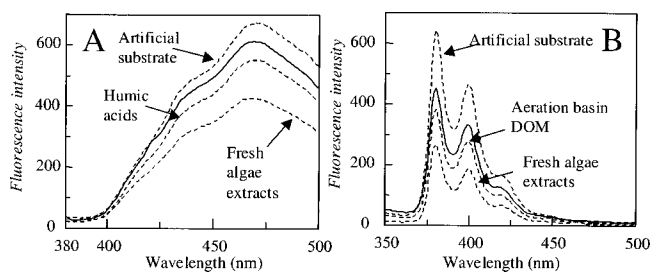


Fig. 2. Fluorescence spectra of daphnid extracts after exposure to fluoranthene (A) or pyrene (B) without (continuous line) or with different kinds of dissolved organic matter (DOM; dotted lines).

$\alpha_1 F_{407 \text{ nm}} + \alpha_2 F_{417 \text{ nm}}$, whatever the shape of the BaP spectrum. The deformation of the peak due to the BaP metabolism was estimated with the parameter $R = F_{407 \text{ nm}}/F_{417 \text{ nm}}$. 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 $F_{407 \text{ nm}}$ as $[\text{BaP}]_{\text{org}} = F_{407 \text{ nm}}(\alpha_1 + \alpha_2/R) = \beta F_{407 \text{ nm}}$.

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-h 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.

RESULTS

Benzo[a]pyrene

The decrease of F/F_0 indicated that the bioaccumulation of BaP was reduced with increasing concentrations of DOM (Fig. 3A). The reduction was more pronounced with humic substances, i.e., bioaccumulation was 80% less in the 4-mg/L DOC solution of HA compared with a media without DOM. The reduction was less pronounced with other DOM, i.e., 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

The 4-h bioaccumulation of pyrene also decreased with increasing concentrations of DOM (Fig. 3B). 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

The bioaccumulation of fluoranthene was only significantly affected by humic substances (Fig. 3C). 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

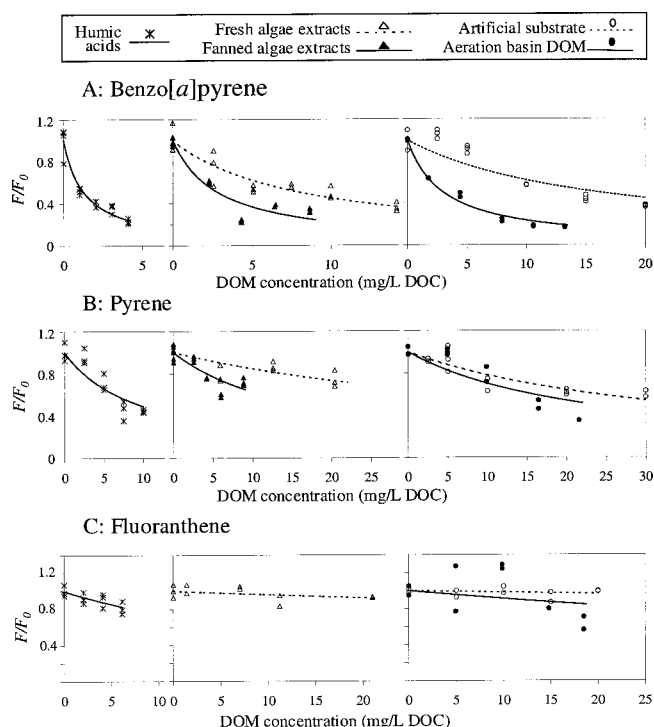


Fig. 3. Relative bioaccumulation of benzo[a]pyrene (A), pyrene (B), and fluoranthene (C) in *Daphnia magna* against dissolved organic matter (DOM) concentration in the media. F is a linear estimator of the bioaccumulation, F_0 being the estimator in a media without DOM. DOM are humic acids (on the left), algae extracts (in the center), and artificial substrate of a sewage treatment plant pilot and DOM from water of the aeration basin of the plant (on the right). DOC, dissolved organic carbon.

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 of 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:

$$\text{BCF}_{\text{DOM}} = f_{\text{free}} \text{BCF}_0 \quad (1)$$

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 ($[\text{PAH}]_{\text{DOM}}$) and the concentration of free PAH in water ($[\text{PAH}]_{\text{free}}$) by

$$K_{\text{DOC}} = \frac{[\text{PAH}]_{\text{DOM}}}{[\text{PAH}]_{\text{free}}[\text{DOC}]} \Leftrightarrow f_{\text{free}} = \frac{1}{1 + K_{\text{DOC}}[\text{DOC}]} \quad (2)$$

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]),

$$\text{BCF}_{\text{DOM}} = \frac{\text{BCF}_0}{1 + K_{\text{DOC}}[\text{DOC}]} \quad (3)$$

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 co-

efficient $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$ from the reduction of bioaccumulation in daphnids exposed to DOM after a 4-h exposure as

$$\frac{F_{\text{DOM}}}{F_0} = \frac{1}{1 + K_{\text{DOC}}(\text{biol})[\text{DOM}]} \quad (4)$$

Both F_{DOM} and F_0 are, respectively, the fluorescence peak heights in daphnids extracts exposed or not exposed 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 *D. magna* has been well described by a one-compartment toxicokinetic model [6,25] as

$$\frac{d[\text{PAH}]_{\text{org},t}}{dt} = k_u[\text{PAH}]_{\text{water}} - k_d[\text{PAH}]_{\text{org},t} \quad (5)$$

with $[\text{PAH}]_{\text{org},t}$ the PAH concentration in the organism, $[\text{PAH}]_{\text{water}}$ 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

$$[\text{PAH}]_{\text{org},t} = [\text{PAH}]_{\text{water}} \frac{k_u}{k_d} (1 - e^{-k_d t}) \quad (6)$$

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 relationship

$$[\text{PAH}]_{\text{org},t} = [\text{PAH}]_{\text{water}} \frac{k_u}{k_d} \Leftrightarrow \frac{[\text{PAH}]_{\text{org},t}}{[\text{PAH}]_{\text{water}}} = \text{BCF} = \frac{k_u}{k_d} \quad (7)$$

Combining Equations 6 and 7, the bioaccumulation kinetic can be described by

$$[\text{PAH}]_{\text{org},t} = [\text{PAH}]_{\text{water}} \text{BCF} (1 - e^{-k_d t})$$

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,

$$\begin{aligned} \frac{F}{F_0} &= \frac{[\text{PAH}]_{\text{org},t,\text{DOM}}}{[\text{PAH}]_{\text{org},t,0}} = \frac{[\text{PAH}]_{\text{water}} \text{BCF}_{\text{DOM}} (1 - e^{-k_d t})}{[\text{PAH}]_{\text{water}} \text{BCF}_0 (1 - e^{-k_d t})} \\ &= \frac{\text{BCF}_{\text{DOM}}}{\text{BCF}_0} \end{aligned} \quad (9)$$

Equation 9 shows that the methodology is equivalent to the one developed by Kukkonen et al. [4,5] and used in Haitzer et al. [6,10–12], although the exposure time is only 4 h.

Using Equation 4 and experimental values of F_{DOM}/F_0 , we determined $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$ by nonlinear regressions for each combination of DOM and PAH. Figure 3 shows experimental F_{DOM}/F_0 values and corresponding regression curves, whereas $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$ 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.

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 $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$ were intermediate and fluoranthene $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$ were the lowest. This decreasing binding capacity

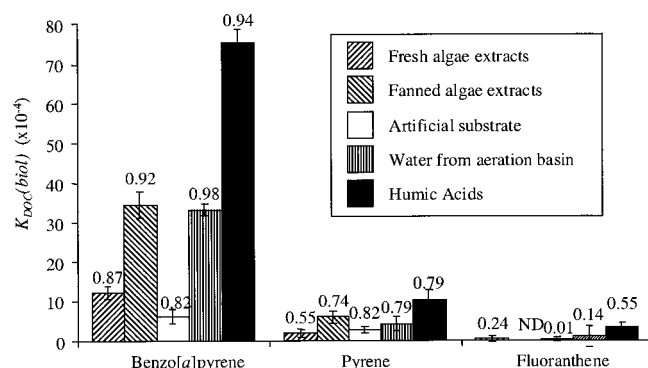


Fig. 4. Estimated biological partitioning coefficients $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$. Determination coefficients r^2 are noticed on the top of each bar. DOC, dissolved organic carbon; ND, not determined.

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 $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$ 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 because 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 $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$ is directly related to the bioavailable fraction that is more relevant for ecotoxicological issues.

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 of 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 $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$ 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].

Table 3. Dissolved organic carbon (DOC) K_{DOC} estimations: Results from this study and from the literature^a

PAH	Dissolved organic matter	Analytical technique	K_{DOC} ($\times 10^{-4}$ L/kg DOC)	Reference
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]
	Late Kontiolampi (humic boreal lake)	Dialysis	21–121	[32]
	NDOM from boreal lakes	Dialysis	1–22	[5]
	NDOM from Finnish rivers and lake	Biological	19.6–48.1	[15]
	NDOM from Spanish rivers	Biological	0.7–1.6	[15]
	Pyrene	Fresh algae extracts	Biological	1.8
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	11.9	[33]
Suwanee River humic acids		FQ	1.4–3.5	[23]
Suwanee River humic acids		Dialysis	5.2–9.2	[34]
Natural humic substances		Biological	1.2–6.3	[12]
Humic acid from coal wastewater		SPME	2.5	[35]
Nordic reference fulvic acid		Dialysis	0.6–2.0	[32]
Lake Kontiolampi		Dialysis	1.0–5.9	[32]
NDOM from Finnish rivers and lake		Biological	1.4–4.4	[15]
NDOM from Spanish rivers		Biological	1.8–4.2	[15]
Fluoranthene	Aldrich humic acids	Biological	3.4	This study
	Aldrich humic acids	FQ	11.5	[33]
	Humic acids from coal wastewater	SPME	2.0	[35]

^a PAH = polycyclic aromatic hydrocarbon; NDOM = natural dissolved organic matter; FQ = fluorescence quenching; SPME = solid-phase microextraction.

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 with 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 nonaromatic 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 $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$ 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 with their $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$. Our results also demonstrate that $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$ 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 spectrofluorometry, 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 toward the aquatic ecosystem. They also convey high levels of nonhumic 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, because 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 studying nonstable materials and a simple spectrofluorometric 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.

REFERENCES

- Neff JM. 1979. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. Sources, Fates and Biological Effects*. Applied Sciences, London, UK.
- 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.
- 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.
- 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.
- Kukkonen J, Oikari A. 1991. Bioavailability of organic pollutants in boreal waters with varying levels of dissolved organic material. *Water Res* 25:455–463.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Henze M. 1992. Characterization of wastewater for modelling of activated sludge processes. *Water Sci Technol* 25:1–15.
- 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.
- 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.
- Gourlay C, Miège C, Tusseau-Vuillemin MH, Mouchel JM, Garcia 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Nikkilä A, Kukkonen JVK. 2001. Effects of dissolved organic material on binding and toxico-kinetic of pyrene in the waterflea *Daphnia magna*. *Arch Environ Contam Toxicol* 40:333–338.
- Schwarzenbach R, Gschwend P, Imboden DM. 1993. *Environmental Organic Chemistry*. John Wiley, New York, NY, USA.
- Kukkonen J, Pellinen J. 1994. Binding of organic xenobiotics to dissolved organic macromolecules: Comparison of analytical methods. *Sci Total Environ* 152:19–29.
- 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.
- 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.
- 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.
- McCarthy JF, Jimenez BD. 1985. Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons and dissolved humic material: Binding and dissociation. *Environ Sci Technol* 19:1072–1076.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

Rapid communication

The ability of dissolved organic matter (DOM) to influence benzo[a]pyrene bioavailability increases with DOM biodegradation

Catherine Gourlay^{a,b,*}, Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin^a,
Jean-Marie Mouchel^b, Jeanne Garric^c

^aCemagref, UR Hydrosystèmes et Bioprocédés, Parc de Tourvoie, BP 44, 92163 Antony Cedex, France

^bCentre d'Enseignement et de Recherches Eau Ville Environnement, ENPC, Cité Descartes, 77455 Marne La Vallée Cedex 02, France

^cCemagref, 3b quai Chauveau, CP 220, 69336 Lyon Cedex 9, France

Received 21 January 2004; received in revised form 2 December 2004; accepted 6 December 2004

Abstract

The biodegradation of two substrates and the ability of dissolved organic matter (DOM) to influence benzo[a]pyrene bioavailability as DOM biodegradation progressed were monitored in reactors. Substrates were composed of algae extracts and an artificial substrate that mimics raw wastewater, which were considered to be 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 ultraviolet absorbance. Partitioning coefficients between DOM and benzo[a]pyrene, $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$, were biologically determined by means of 4-h bioaccumulation experiments on *Daphnia magna*. Parent and 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. $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$ ranged between 2×10^4 and 4×10^5 L/kg. As the artificial wastewater biodegraded, DOM aromaticity increased, as did $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$. During the biodegradation of algae extract DOM, $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$ increased, whereas their aromaticity slightly decreased.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: 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 in 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 microcontaminants (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 fish (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).

*Corresponding author. Cemagref, UR Hydrosystèmes et Bioprocédés, Parc de Tourvoie, BP 44, 92163 Antony Cedex, France. Fax: +33 1 40 96 61 99.

E-mail address: catherine.gourlay@cemagref.fr (C. Gourlay).

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 nonhumic natural riverine DOM (with low aromaticity and low carboxylic content) could also affect the bioavailability of POPs (Akkanen et al., 2001) and that highly biodegradable DOM was able to reduce the bioavailability of some polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) (Gourlay et al., 2003).

Water bodies under anthropogenic influence contain high levels of nonhumic allochthonous organic matter of urban origin from industrial or domestic effluents (Namour and Müller, 1998). Moreover, this organic matter may be subject to further changes in the medium. Tusseau-Vuillemin and Le Reveillé (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) determined that 68% of DOM produced during a phytoplanktonic bloom was biodegraded within 18 days. Not only can DOM impact 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 microcontaminants.

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 analyzed 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 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 μ S/cm, organic carbon <0.3 mg C/L) was used both for

experiments and for 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 precombusted 0.7- μ m glassfiber filter (GF/F Whatmann; Kent, UK) and used within 4 h 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. 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 (Viadox, 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 Viadox 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 precombusted GF/F filter 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 L of the initial DOM stock solution in the reactor, with a 4.5-mL activated sludge inoculum. The solution was regularly aerated 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 precombusted GF/F Whatmann filters. For each sample, the dissolved organic carbon (DOC) concentration and the particulate organic carbon (POC) concentration 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 ultraviolet absorbance ($SUVA = A_{254}/DOC$ in $\text{cm}^{-1}\text{g}^{-1}\text{L}$) 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.

To validate the use of Viadox as a model for 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 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 composed only of newly formed SMPs, as observed by Hejzlar and Chudoba (1986). On the 4th day, the solution was filtered and analyzed for its DOC and 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 5–7-day-old daphnids (*Daphnia magna*). One hour before exposure, the organisms were moved into clean mineral water 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 Reveillé, 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 h 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 h 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 wavelength was 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-h 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 ($\text{DOC}(t_f)$ and $\text{DOC}(t)$, respectively): $f_{\text{ref}} = \text{DOC}(t_f)/\text{DOC}(t)$. 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, $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$ 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 pseudoreplicates of daphnid extracts exposed to BaP only and F being the F_{407} in the 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-normalized 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):

$$\frac{F}{F_0} = \frac{1}{1 + K_{\text{DOC}}[\text{DOC}]} \quad (1)$$

From Eq. (1), a biologically determined partitioning coefficient $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$ could be estimated from non-linear regression of F/F_0 against DOC data points (XLStat software). $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$ 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 in Fig. 1. All substrates were highly degradable. After 15 days, 76% of the initial 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.

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 (Laspidou and Rittmann, 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 ($\text{DOC}_{\text{SMP}}(t)$) amounts to 5% of DOC decrease, as found in the glucose degradation experiment:

$$\text{DOC}_{\text{SMP}}(t) = 0.05(\text{DOC}(0) - \text{DOC}(t)). \quad (2)$$

The DOC balance during a biodegradation process includes three terms: a constant nondegradable (over the time scale considered in the experiments) DOC pool, losses from a degradable DOC pool, and new production of a smaller amount of a nondegradable 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

Fig. 2 shows the 254-nm 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 an indicator of the aromaticity of DOM. Initially, the three substrates displayed very low SUVA, compared to natural humic substances (for example $\text{SUVA} = 27\text{--}62/\text{cm}^2/\text{g}/\text{L}$ for various humic substances, Haitzer et al., 1999c). The aromaticity of the artificial wastewater DOM increased during the biodegradation, whereas the aromaticity of the 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 to the

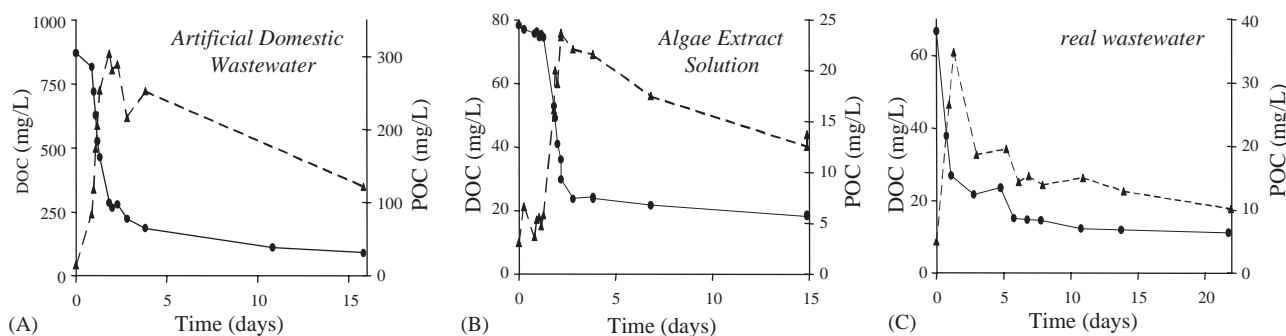


Fig. 1. Particular (dotted line, POC) and dissolved (continuous line, DOC) organic carbon concentration (mg C/L) changes during the biodegradation of the three substrates.

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 in Fig. 2 ($SUVA_{SMP} = 22.5/cm^2/g/L$). It compares well with data obtained by Shin and Kang (2003), who measured SMP SUVA obtained from glucose degradation between 17 and 19/cm²/g/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 in Figs. 3A and B. For each DOM solution, the relative bioaccumulations of BaP by daphnids (F/F_0) in the presence of increasing amounts of DOM and the regression curve following Eq. (1) are

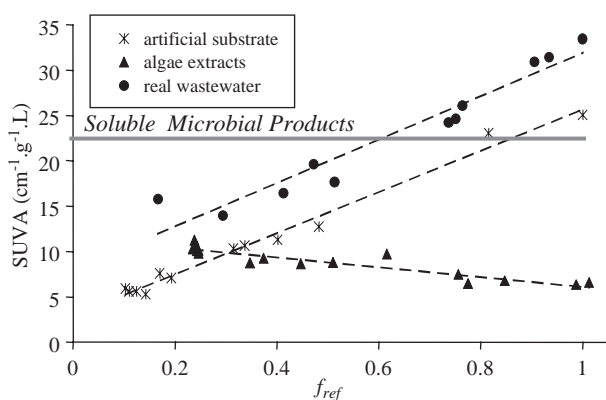


Fig. 2. Changes in the specific UV absorbance at 254 nm ($SUVA$, in $cm^{-1}g^{-1}L$) during the biodegradation of the artificial domestic wastewater (crosses), the real wastewater (circles), and the algae extracts (triangles). The $SUVA$ value of soluble microbial products is also reported.

plotted. 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 0.8-day-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.

A biologically determined partitioning coefficient $K_{DOC(biol)}$ could be estimated for all the bioaccumulation experiments. Fig. 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 the algae and between 6×10^4 and 36×10^4 L/kg for DOM from the degrading

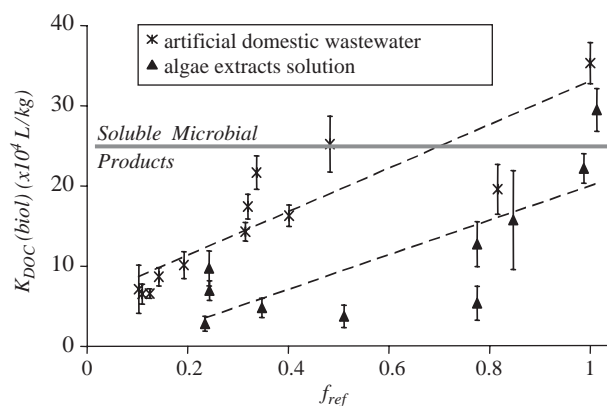


Fig. 4. Changes in the biologically determined partition coefficients between dissolved organic matter and benzo[a]pyrene ($K_{DOC(biol)}$, in L/kg) during the biodegradation of the artificial domestic wastewater (crosses) and the algae extract (triangles) substrates. The $K_{DOC(biol)}$ value of soluble microbial products is also reported.

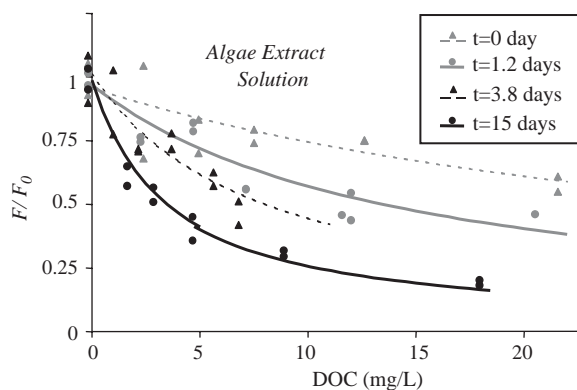
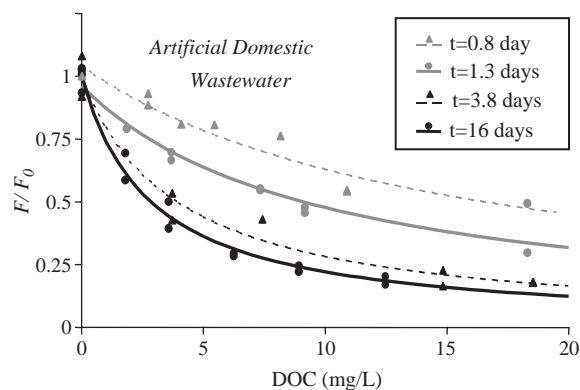


Fig. 3. Relative bioaccumulation of benzo[a]pyrene in daphnids (F/F_0) in the presence of organic matter from artificial wastewater and algae extracts, at different biodegradation times, from the initial substrate to a 16-day-biodegraded solution, as a function of organic carbon concentration (DOC, mg/L)

artificial wastewater. The $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$ estimated for SMPs ($24.8 (\pm 3.5) \times 10^4 \text{ L/kg}$) is also reported in Fig. 4.

4. Discussion

4.1. Validity of $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$ estimation and comparison with natural DOM

A very similar technique was used by Haitzer et al. (1999a,b) to estimate K_{DOC} , the bioaccumulation measurement performed after 48 h 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 $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$, under a generally accepted first-order toxicokinetic hypothesis. Consequently, we assume that $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$ from this study and $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$ 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 nonrefractory DOM are on the same order of magnitude as the DOM partitioning coefficients from European rivers estimated with the equilibrium dialysis technique ($0.7\text{--}24 \times 10^4 \text{ L/kg}$; 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 ($20\text{--}49 \times 10^4 \text{ L/kg}$; Haitzer et al., 1999b). Our data show that biodegradable or recently stabilized DOM may have an effect comparable to that of 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 nonaromatic, 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 hydrolyzable 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 $23 \text{ cm}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ L}$ 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 $6 \text{ cm}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ L}$) than that measured in treated wastewaters from several sewer treatment plants ($11\text{--}19 \text{ cm}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ L}$). In the experiment with the artificial wastewater, we found a positive correlation between the binding capacity of DOM with BaP, $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$, and the 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 anticorrelation (poor correlation coefficient: -0.55) between SUVA and $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$ was obtained 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 $12 \pm 4 \text{ cm}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ L}$ 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 nonhydrolyzable, 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 may favor the binding of POPs onto organic matter, the data

presented here show that SUVA is not a good indicator of the binding potential of the 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 progresses, the relative proportion of SMP increases. Therefore, the increase in $K_{\text{DOC}}(\text{biol})$ during the biodegradation process may also be due to the increasing presence of SMPs in the solution. SMPs were demonstrated to significantly influence the bioavailability of BaP at low concentrations ($K_{\text{DOC}}(\text{biol}) = 24.8 \times 10^4 \pm 3.5 \times 10^4 \text{ L/kg}$). 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 kDa (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 ($\text{DOC}(t)$) can be theoretically fractionated into biodegradable compounds ($\text{DOC}_{\text{biodeg}}(t)$), initially present refractory compounds (DOC_{ref}), and SMPs produced during the biodegradation process ($\text{DOC}_{\text{SMP}}(t)$). In the following, we postulate that each fraction can be characterized by a specific SUVA ($\text{SUVA}_{\text{biodeg}}$, SUVA_{ref} , and SUVA_{SMP} , respectively) and a specific binding capacity ($K_{\text{DOC, biodeg}}$, $K_{\text{DOC, ref}}$, and $K_{\text{DOC, SMP}}$, respectively). Consequently, the 254-nm absorption of the global solution will be given by

$$\begin{aligned} \text{SUVA}(t) \cdot \text{DOC}(t) = & \text{SUVA}_{\text{biodeg}} \text{DOC}_{\text{biodeg}}(t) \\ & + \text{SUVA}_{\text{ref}} \text{DOC}_{\text{iniref}} \\ & + \text{SUVA}_{\text{SMP}} \text{DOC}_{\text{SMP}}(t). \end{aligned} \quad (3)$$

Eq. (3) can be rewritten as a linear function of $\text{SUVA}(t)$ against f_{ref} (see details in the appendix):

$$\begin{aligned} \text{SUVA}(t) = & \text{SUVA}_{\text{biodeg}} 1.05[1 - f_{\text{ref}}] \\ & + \text{SUVA}_{\text{ref}} [1.05 - 0.05 \text{DOC}(0)/\text{DOC}(f)] f_{\text{ref}} \\ & + \text{SUVA}_{\text{SMP}} 0.05 [\text{DOC}(0)/\text{DOC}(f)] f_{\text{ref}} - 1]. \end{aligned} \quad (4)$$

For each DOM origin, $\text{SUVA}_{\text{biodeg}}$ and SUVA_{ref} were estimated from linear regressions of $\text{SUVA}(t)$ against f_{ref} . Regression curves are shown in Fig. 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 ($\text{SUVA}_{\text{biodeg}} < 13 \text{ cm}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ L}$). Refractory initial molecules of the artificial and the real wastewater effluents are more aromatic than SMPs. On the contrary, the refractory initial molecules from algae

Table 1

Estimated specific ultraviolet absorbance for biodegradable ($\text{SUVA}_{\text{biodeg}}$) and refractory (SUVA_{ref}) dissolved organic matter in $\text{cm}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ L}$ (\pm standard deviations)

	R^2, n^a	$\text{SUVA}_{\text{biodeg}}^b$	$\text{SUVA}_{\text{ref}}^b$
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 2

Estimated partitioning coefficients for biodegradable ($K_{\text{DOC, biodeg}} \times 10^4 \text{ L/kg}$) and refractory ($K_{\text{DOC, ref}} \times 10^4 \text{ L/kg}$) dissolved organic matter (\pm standard deviation)

	R^2, n^a	$K_{\text{DOC, biodeg}}^b$	$K_{\text{DOC, ref}}^b$
Algae extract solution	0.61, 10	-0.3 ± 3.9^c	19.8 ± 12.3^c
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.

^c Values obtained from nonsignificant parameter estimators (t test, $P > 0.05$).

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 gives only 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.

The same linear equation theoretically links $K_{\text{DOC}}(t) \cdot \text{DOC}(t)$ and $\text{DOC}(t)$, since the partitioning coefficient K_{DOC} between BaP and DOM follows the relationship:

$$\begin{aligned} K_{\text{DOC}}(t) \text{DOC}(t) = & K_{\text{DOC, biodeg}} \text{DOC}_{\text{biodeg}}(t) \\ & + K_{\text{DOC, ref}} \text{DOC}_{\text{ref}} \\ & + K_{\text{DOC, SMP}} \text{DOC}_{\text{SMP}}(t). \end{aligned} \quad (5)$$

Consequently, $K_{\text{DOC, biodeg}}$ and $K_{\text{DOC, ref}}$ were estimated in the same way. Results are displayed in Table 2 and regression curves are reported in Fig. 4.

A significant estimation was obtained from the regression with data from the artificial substrate experiment (t test, $P < 0.01$). Biodegradable and refractory compounds from the artificial substrate have a significant influence on the binding of BaP. K_{DOCref} values obtained for refractory compounds are similar to those of natural humic substances (Kukkonen et al., 1990; Haitzer et al., 1999a, b, c) and are higher than measured $K_{\text{DOC SMP}}$. 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 to determine the relevance of biogeochemical fractionation of DOM to estimate its binding capacity for organic micropollutants.

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 facts (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 and 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 (organic matter from sewer treatment plants, stormwater, or sewer overflows) origin. 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.

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:

$$\text{DOC}(t) = \text{DOC}_{\text{biodeg}}(t) + \text{DOC}_{\text{ref}} + \text{DOC}_{\text{SMP}}(t). \quad (6)$$

At the end of the experiment (t_f), only refractory compounds and SMPs remain in the solution:

$$\text{DOC}_{\text{ref}} = \text{DOC}(t_f) - \text{DOC}_{\text{SMP}}(t_f). \quad (7)$$

Since DOC_{SMP} can be approximated by $\text{DOC}_{\text{SMP}}(t) = 0.05(\text{DOC}(0) - \text{DOC}(t))$ (Eq. (2)), DOC_{ref} can be written as

$$\begin{aligned} \text{DOC}_{\text{ref}} &= \text{DOC}(t_f) - 0.05[\text{DOC}(0) - \text{DOC}(t_f)], \\ \text{DOC}_{\text{ref}} &= 1.05\text{DOC}(t_f) - 0.05\text{DOC}(0). \end{aligned} \quad (8)$$

The biodegradable compounds can be expressed as a function of $\text{DOC}(t)$ (Eq. (6)):

$$\text{DOC}_{\text{biodeg}}(t) = \text{DOC}(t) - \text{DOC}_{\text{ref}} - \text{DOC}_{\text{SMP}}(t). \quad (9)$$

Using the estimation of $\text{DOC}_{\text{SMP}}(t)$ (Eq. (2)) and DOC_{ref} (Eq. (8)):

$$\begin{aligned} \text{DOC}_{\text{biodeg}}(t) &= \text{DOC}(t) - 1.05[\text{DOC}(f) - 0.05\text{DOC}(0)] \\ &\quad - 0.05[\text{DOC}(0) - \text{DOC}(t)], \\ \text{DOC}_{\text{biodeg}}(t) &= 1.05(\text{DOC}(t) - \text{DOC}(f)). \end{aligned} \quad (10)$$

Finally, Eq. (3) can be rewritten as

$$\begin{aligned} \text{SUVA}(t) \text{DOC}(t) &= \text{SUVA}_{\text{biodeg}} 1.05[\text{DOC}(t) - \text{DOC}(f)] \\ &\quad + \text{SUVA}_{\text{ref}} [1.05\text{DOC}(f) \\ &\quad - 0.05\text{DOC}(0)] \\ &\quad + \text{SUVA}_{\text{SMP}} 0.05[\text{DOC}(0) \\ &\quad - \text{DOC}(t)]. \end{aligned} \quad (11)$$

Eq. (4) is obtained when dividing Eq. (11) by $\text{DOC}(t)$ and using the definition of f_{ref} :

$$\begin{aligned} \text{SUVA}(t) &= \text{SUVA}_{\text{biodeg}} 1.05[1 - f_{\text{ref}}] + \text{SUVA}_{\text{ref}} \\ &\quad \times [1.05f_{\text{ref}} - 0.05\text{DOC}(0)/\text{DOC}(f)f_{\text{ref}}] \\ &\quad + \text{SUVA}_{\text{SMP}} 0.05[\text{DOC}(0)/\text{DOC}(f)f_{\text{ref}} - 1]. \end{aligned} \quad (12)$$

References

- 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.
- Billen, G., 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., Berkaloﬀ, C., Rousseau, B., Wilhelm, C., Hatcher, P.G., 1992. Non-hydrolosable macromolecular constituents from outer walls of *Chlorella fusca* and *Nanochlorum eucaryotum*. *Phytochemistry* 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, 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.
- Fukushima, T., Chul, J., Imai, A., Matsushige, K., 1996. Dissolved organic carbon in a eutrophic lake; dynamics, biodegradability and origin. *Aquat. Sci.* 58, 139–157.
- Gourlay, C., Miège, C., Tusseau-Vuillemin, M.H., Mouchel, J.M., 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, M.H., Garric, J., Mouchel, J.M., 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., 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, B.K., 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.
- Haitzer, M., Akkanen, J., Steinberg, C., Kukkonen, J.V.K., 2001. No enhancement in bioconcentrations of organic contaminants by low levels of DOM. *Chemosphere* 44, 165–171.
- Hejzlar, J., 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 (K_{DOC}). *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 169, 1–122.
- Kukkonen, J., 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, J.F., 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, P.F., Reinhold, M.D., Nihart, S.R., Eadie, B.J., 1985. Predicting the bioavailability of organic xenobiotics to *Pontoreia hoyi* in the presence of humic and fulvic materials and natural dissolved organic matter. *Environ. Toxicol. Chem.* 4, 459–467.
- Laspidou, C.S., 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, G.J., Landrum, P.F., Giesy, J.P., Fannin, T., 1983. Humic acids reduce bioaccumulation of some polycyclic aromatic hydrocarbons. *Can. J. Aquat. Sci.* 40, 63–69.
- McCarthy, J.F., Jimenez, B.D., 1985a. Reduction in bioavailability to bluegills of polycyclic aromatic hydrocarbons bound to dissolved humic material. *Environ. Toxicol. Chem.* 4, 511–521.
- McCarthy, J.F., Jimenez, B.D., 1985b. Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons and dissolved humic material: binding and dissociation. *Environ. Sci. Technol.* 19, 1072–1076.
- 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.
- Mean, B., Kirchmann, D.L., 2001. Dynamics and molecular composition of dissolved organic material during experimental phytoplankton blooms. *Mar. Chem.* 75, 185–199.
- Namour, Ph., 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 effluent. *Water Res.* 32, 2224–2231.
- Pernelle, J.J., Laval, G., Cotteux, E., Duchêne, P.H., 2001. Influence of transient substrate overloads on the proliferation of filamentous bacterial populations in an activated sludge pilot plant. *Water Res.* 35, 129–134.
- 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.
- Schwarzenbach, R., Gschwend, P.M., Imboden, D.M., 1993. *Environmental Organic Chemistry*. Wiley, New York, USA (680pp).
- Seidl, M., Servais, P., Mouchel, J.M., 1998. Organic matter transport and degradation in the river Seine (France) after a combined sewer overflow. *Water Res.* 32, 3569–3580.
- Shin, H.S., 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*. Wiley, 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., 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.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Science of the Total Environment xx (2005) xxx–xxx

Science of the
Total EnvironmentAn International Journal for Scientific Research
into the Environment and its Relationship with Humankindwww.elsevier.com/locate/scitotenv

Evaluation of DGT as a metal speciation tool in wastewater

Rémy Buzier^a, Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin^{a,*}, Jean-Marie Mouchel^b

^a Cemagref, UR Hydrosystèmes et Bioprocédés, parc de Tourvoie, BP 44, 92163 Antony Cedex, France

^b Centre d'Enseignement et de Recherche Eau Ville Environnement, ENPC, cité Descartes, 77455 Marne la Vallée Cedex 02, France

Received 20 April 2005; received in revised form 11 August 2005; accepted 10 September 2005

Abstract

This paper aims to evaluate the performance of the diffusive gradient in thin film technique (DGT) as a speciation tool for metals in wastewater. The validity of metal sampling by DGT in wastewater was checked. DGT was used in parallel with the *Daphnia magna* acute toxicity test in order to obtain information on the speciation of copper and cadmium in diluted and spiked filtered wastewater (raw and treated) from two treatment plants. Combining the chemical (DGT) and the biological methods (*D. magna* toxicity test) allowed metal to be fractionated into inorganic, labile organic and inert organic metal. Copper was mainly found as inert organic complexes, whereas the major part of cadmium was found to be labile organic complexes. The proportion of inert organic copper complexes was higher in the presence of treated wastewater than in raw wastewater. The use of restricted gels in DGT devices discriminated more labile organic cadmium than labile organic copper, indicating that cadmium weak ligands have more complex structures than copper weak ligands. In our experimental conditions (i.e. a high metal to ligand ratio), DGT, even equipped with restricted gels, was able to accumulate labile organic complexes. This result highlights that the ecotoxicological interpretation of DGT measurement should be considered carefully. DGT is a reliable tool to assess the chemical characteristics of metals (i.e. reactivity) in wastewater, but it does not ensure that only inorganic metal is measured.

© 2005 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Municipal wastewater; DGT; Metal complexation; Lability; Copper; Cadmium

1. Introduction

Municipal wastewater is an important pathway for heavy metals toward the aquatic environment and their potential toxicity in receiving waters is of concern (Bubb and Lester, 1991). Wastewater treatment plants (WWTPs) remove most particulate metals (Oliver and Cosgrove, 1974; Nielsen and Hrudey, 1983; Ekster and Jenkins, 1996). However, dissolved metals are less efficiently retained and constitute the major fraction

in treated effluents, causing receiving waters to be enriched (Bubb and Lester, 1995; Gagnon and Saulnier, 2003). Because of their potential toxic effect to the ecosystems, some heavy metals were earmarked as “priority substances” (Cd, Hg and Pb) in the European Framework Directive (European Parliament, 2000).

Trace metals’ bioavailability and toxicity are usually believed to be controlled by free metal ion activity (Morel, 1983). Generalizing the concept of the free ion activity model, the biotic ligand model (BLM) (for a review see Paquin et al., 2002) evaluates the mitigation of metal toxicity by parameters such as hardness and pH by incorporating the competition of major cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} , K^{+} and H^{+}) for metal interaction with “biological sites”. Although these mod-

* Corresponding author. Tel.: +33 1 40 96 61 98; fax: +33 1 40 96 61 99.

E-mail address: marie-helene.tusseau@cemagref.fr (M.-H. Tusseau-Vuillemin).

els have shown some exceptions (Campbell, 1995; Hassler and Wilkinson, 2003), many studies have demonstrated their validity for determining acute toxicity (Brown and Markich, 2000; Van Ginneken et al., 2001; De Schamphelaere and Janssen, 2002). Nevertheless, few data are available on metal complexation by wastewater ligands. Metals are largely complexed to dissolved organic matter (DOM) in wastewater entering WWTPs, as shown by Kaplan et al. (1987), Kunz and Jardim (2000) and Giokas et al. (2002).

Electrochemical methods (voltametry or ion selective electrodes) have been widely used to determine metal speciation in natural systems, and more rarely in wastewater (Gardiner and Stiff, 1975; Kaplan et al., 1987; Alvarez et al., 1998). Most studies focus on treated wastewater (Laxen and Harrison, 1981; Sedlak et al., 1997; Bedsworth and Sedlak, 1999), because of the analytical problems raised by the high OM content of untreated wastewater (Alvarez et al., 1998). The diffusive gradient in thin film (DGT) was proposed by Davison and Zhang (1994) as an alternative speciation device. The technique is based on the diffusion of dissolved metal species in a polyacrylamide gel and measures the free metal ion and labile complexes (Tusseu-Vuillemin et al., 2003). Because DGT is a selective sampler, this technique can remove interferences encountered with electrochemical techniques. The device can be used with different kinds of diffusive gels. The restricted gels make it possible to exclude humic organic complexes (Zhang and Davison, 1999; Tusseau-Vuillemin et al., 2004). However, non-humic organic matter can account for most of DOM released by municipal WWTP (Ma et al., 2001; Imai et al., 2002) and is able to bind significantly metals (Sarathy and Allen, 2005). The exclusion by restricted gels of wastewater organic complexes is actually not known and need to be addressed.

As a first step toward monitoring bioavailable metals in wastewater-impacted waters using the DGT technique, this study focuses on copper and cadmium fractionation in the presence of wastewater ligands. The metal complexation was evaluated in two ways: through DGT sampling and bioassays, so as to discuss the speciation of each metal and critically evaluate DGT as a speciation tool in wastewater.

2. Material and methods

2.1. Samples

Samples were collected in two activated sludge WWTPs fed by combined sewer. These plants, located

near Paris (France), respectively collect wastewater from 130,000 p.e. (WWTP 1) (mostly domestic with a 25% industrial contribution) and 6 million p.e. (WWTP 2) (<30% industrial contribution). WWTP 1 is designed to biologically remove carbon, nitrogen and phosphorus (low organic loading ratio) and to precipitate phosphorus by ferric chloride addition in the aerobic zone. WWTP 2 is designed to biologically remove carbon only (high organic loading rate). Plant 1 was chosen as an up to date and widespread WWTP and plant 2 because it's actually the second world largest plant (it collects 80% of Parisian area wastewaters). Samples were collected at the inlet, after primary treatment (raw wastewater), and at the outlet (treated wastewater) of each plant. Grab samples were taken at WWTP 1 whereas 24-h composite samples (kept on ice) were collected at WWTP 2. After collection, samples were brought back to the laboratory, immediately filtered on cellulose nitrate membrane (0.45- μ m porosity) in order to prevent sample evolution and immediately used for experiments.

2.2. Labile and total metal concentration determination

Labile copper and cadmium concentrations were measured with the DGT technique. All DGT holders, resins and diffusive gels (0.8-mm thickness) were purchased from DGT Research (Lancaster, UK). Open-pore (pore size >5 nm) and restricted gels (pore size <1 nm) (as defined by Zhang and Davison, 1999) were used simultaneously. In standard experiments, two DGT systems were deployed in 500 mL polypropylene beakers (stirred at 24 ± 1 °C) for 3 and 6 h. After the system retrieval, resins were eluted in 2 mL (V_e) of 1 M nitric acid (prepared from Merck 65% suprapur nitric acid). Eluates were analysed by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF-AAS Varian SpectrAA-20, Les Ulis, France). The eluate concentration was converted into the mass of metal accumulated on the resin using an elution yield (f_e) of 80% for copper (Zhang and Davison, 1995) and 100% for cadmium (Sangi et al., 2002).

Labile metal concentration C_{DGT} was calculated according to Eq. (1) (Davison and Zhang, 1994):

$$C_{DGT} = \frac{M\Delta g}{tAD} \quad (1)$$

M : mass of metal accumulated on the resin during the immersion time (t), Δg : diffusive gel thickness (0.8 mm), A : exposure area (3.14 cm²) and D : diffusion coefficient of the metal. D values in open-pore gels were provided by DGT Research (Lancaster, UK,

145 <http://www.dgtresearch.com>) ($5.93 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ for
146 Cd and $6.06 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ for Cu at $24 \text{ }^\circ\text{C}$). Because
147 the deployment solutions had a low ionic strength (<3
148 mM), the effective D in restricted gels was also
149 measured with a diffusion cell, deployed in a reference
150 medium (“ref”, Table 1) as recommended by Sangi et
151 al. (2002). Values were found to be $8.44 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2$
152 s^{-1} for Cd and $8.86 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ for Cu at $24 \text{ }^\circ\text{C}$
153 (H. Zhang, personal communication) and were conse-
154 quently used in this study. Estimated errors on labile
155 metal concentration include the two replicates, AAS
156 measurement deviation and 5% error on V_e , f_e , Δg , A ,
157 and D .

158 Before and after immersion, pH and temperature
159 were measured. We sampled 5 mL of solution for
160 total metal determination (acidified with 1% v/v of
161 Merck 65% pro analysis nitric acid) by GF-AAS (Var-
162 ian SpectraAA-20, Les Ulis, France).

163 2.3. *Daphnia* toxicity tests

164 Twenty-four-hour acute toxicity tests were per-
165 formed using the ISO 6341 standard (International
166 Standard Organisation, 1993). The test organisms orig-
167 inated from a healthy *Daphnia Magna* clone (K6),
168 which was cultured in the laboratory. Five animals
169 were exposed in triplicate in 15 mL of different
170 media, listed in Table 1. R1, T1, R2 and T2 solutions
171 were obtained by spiking the culture medium (mineral
172 water) with 10% (v/v) filtered wastewater sample. The
173 reference medium (“Ref”) was obtained by adding
174 CaCl_2 , MgSO_4 and NaNO_3 to the mineral water in
175 order to mimic the average inorganic composition of
176 R1, T1, R2 and T2. The composition of solutions was
177 appropriately determined for each treatment of the
178 biotest (Table 1). Before exposure, the media were
179 equilibrated overnight after adding metal (copper or
180 cadmium) to ensure chemical equilibrium. The 50%
181 effect concentrations (EC_{50}) were obtained with their
182 95% confidence interval by nonlinear adjustment to a
183 log-logistic model of experimental data (<http://perso.wanadoo.fr/eric.vindimian/>,
184 Isnard et al., 2001). The

control samples for each medium (medium with no
metal spike) showed no toxicity on daphnids.

2.4. Metal fractionation

Our approach was original in that it combined a
biological and chemical evaluation of the trace metal
speciation in the same medium. For each trace metal
addition, a sufficient volume of medium was prepared
in order to run daphnid exposure and labile and total
metal measurement simultaneously, following Tusseau-
Vuillemin et al., 2004. Dose/effect curves were deter-
mined for the three measured metal fractions (Fig. 1).
Three EC_{50} were calculated for each medium and
metal, expressed as total metal ($\text{EC}_{50}^{\text{tot}}$), labile metal
measured with open-pore gels ($\text{EC}_{50}^{\text{op}}$) and with restrict-
ed gels ($\text{EC}_{50}^{\text{res}}$).

2.5. Determination of the inorganic metal fraction

The free metal concentrations inducing 50% effect
on *Daphnia* ($[\text{Me}^{2+}]_{50}$) were considered identical in
each medium and were taken as the value simulated
by VisualMinteq software (v 2.12) in the reference
medium. The possible contribution to toxicity of other
inorganic metal species and the mitigation of the free
metal ion toxicity by major cations is examined in the
discussion below (Section 4). The ratio of free metal to
inorganic metal was unaffected by total copper or or-
ganic matter concentration (Allen and Hansen, 1996).
Accordingly, the $[\text{Me}^{2+}]_{50}$ value was used to simulate
the corresponding inorganic metal concentration
($\text{EC}_{50}^{\text{inorg}}$) in the R1, T1, R2 and T2 media, regardless
of the organic matter.

2.6. Determination of metal fractions

The four EC_{50} values ($\text{EC}_{50}^{\text{inorg}}$, $\text{EC}_{50}^{\text{res}}$, $\text{EC}_{50}^{\text{op}}$ and
 $\text{EC}_{50}^{\text{tot}}$) were used to determine metal fractionation in
each medium, when 50% effect on *Daphnia* was ob-
served (Fig. 1). The metal was fractionated into inor-
ganic metal (Me_{inorg}) (Eq. (2)) and organic metal

t1.1 Table 1
t1.2 Origin and average composition ($n=9$) of media used for toxicity tests

t1.3	Medium	Spiked wastewater	pH	Cl^- (μM)	SO_4^{2-} (μM)	Na^+ (μM)	K^+ (μM)	Mg^{2+} (μM)	Ca^{2+} (μM)	DOC (mg C L ⁻¹)
t1.4	Ref	–	7.7 ± 0.1	712 ± 46	122 ± 6	817	23	170	400	0.1
t1.5	R1	Raw (WWTP1)	8.0 ± 0.1	352	ND	698 ± 65	114 ± 7	194 ± 2	452 ± 4	5.5*
t1.6	T1	Treated (WWTP1)	7.9 ± 0.2	408	ND	739 ± 13	103 ± 4	193 ± 4	476 ± 19	1.1 ± 0.3
t1.7	R2	Raw (WWTP2)	7.8 ± 0.2	330 ± 14	163 ± 4	800 ± 30	73 ± 15	137 ± 7	368 ± 9	4.7 ± 0.8
t1.8	T2	Treated (WWTP2)	7.7 ± 0.2	640 ± 18	112 ± 5	1141 ± 110	60 ± 16	117 ± 1	290 ± 4	2.3 ± 0.7

DOC refers to dissolved organic carbon. *Calculated on the basis of a conservative dilution of the initial sample. ND not determined.

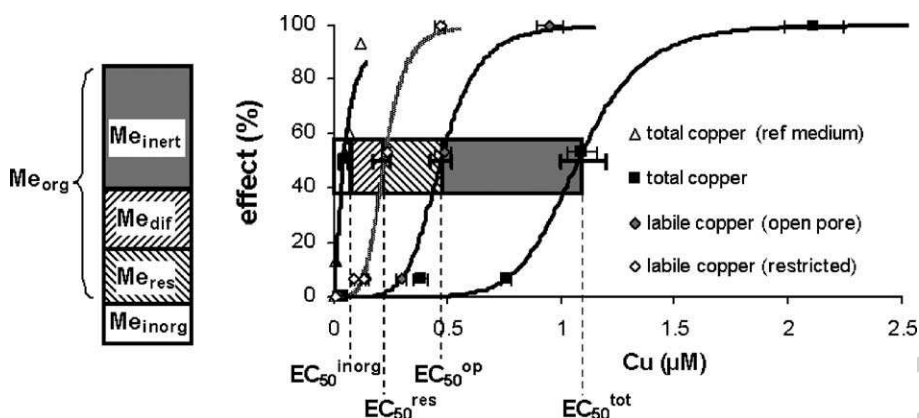


Fig. 1. Scheme of the procedure used to determine copper speciation in R2 when 50% effect is observed. The scheme includes the dose/effect curves determined by *Daphnia* biotests and the corresponding metal fractionation when 50% effect is observed. Note that EC_{50}^{inorg} does not match the EC_{50} in the ref medium and is calculated using the procedure detailed in Sec. 3.2.

221 (Me_{org}), obtained as the difference between EC_{50}^{tot} and
 222 EC_{50}^{inorg} (Eq. (3)).

$$Me_{inorg} = EC_{50}^{inorg} \quad (2)$$

$$Me_{org} = EC_{50}^{tot} - EC_{50}^{inorg} \quad (3)$$

223

224 The organic metal was in turn fractionated into labile
 227 organic metal with restricted gels (Me_{res}) (Eq. (4)),
 228 labile organic metal not diffusing in restricted gels
 229 (Me_{dif}) (Eq. (5)), and inert organic metal (Me_{inert})
 230 (Eq. (6)).

$$Me_{res} = EC_{50}^{res} - EC_{50}^{inorg} \quad (4)$$

$$Me_{dif} = EC_{50}^{op} - EC_{50}^{res} \quad (5)$$

231

$$Me_{inert} = EC_{50}^{tot} - EC_{50}^{op} \quad (6)$$

232

233 The procedure is schematised in Fig. 1. The DGT
 236 devices used in the experiments define their own lability
 237 window (van Leeuwen, 2001). DGT-labile organic
 238 complexes (Me_{res} and Me_{dif}) refers to complexes able
 239 to dissociate during their migration through the DGT
 240 device (high dissociation rate) whereas DGT-inert or-
 241 ganic complexes (Me_{inert}) refers to complexes unable to
 242 dissociate (low dissociation rate) (Tusseu-Vuillemin et
 243 al., 2003).

3. Results

244

3.1. Validity of labile metal measurement using DGT in wastewater

245

246

The validity of metal sampling using DGT (metal accumulation linearity and accumulation stability) in wastewater was first investigated in a filtered raw wastewater sample from WWTP 1. Four DGT systems were immersed following the pattern presented in Fig. 2. The removal of suspended matter limits bacterial activity and the possible sources of sample evolution. Because suspended matter cannot diffuse within the gels (Zhang and Davison, 1999), we hypothesize that DGT collects an equivalent metal quantity in the filtered and in the raw samples. Fig. 3 represents the mass of copper accumulated on the resins as a function of deployment time in a filtered raw wastewater sample. Labile cadmium was undetectable in the sample ($<0.014 \mu\text{g/L}$). Total dissolved cadmium was also below the detection limit of AAS ($0.1 \mu\text{g L}^{-1}$).

Because DGT A and A' accumulated the same amount of copper, we infer that the labile copper concentration is constant and is not significantly modified by a possible evolution of organic ligands during deployment. Moreover, the linearity of accumulation during the 24 h of exposure indicates that biofouling (which was not

268

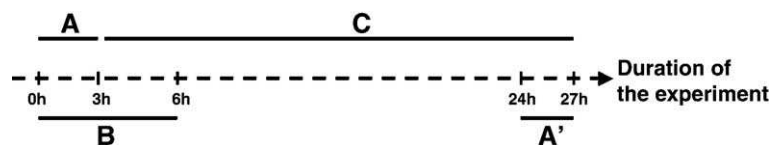


Fig. 2. Schematic representation of DGT immersion (noted A, A', B and C) for the validation of labile metal measurement in wastewater. The lines represent the immersion of each DGT in the beaker. The corresponding time is indicated on the dotted line.

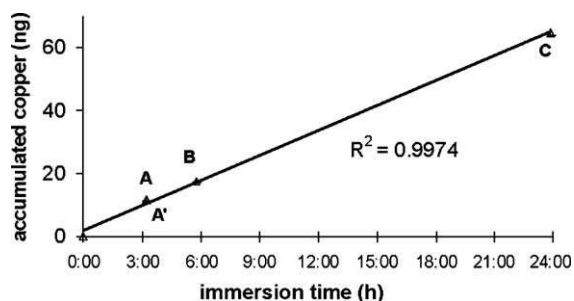


Fig. 3. Accumulated mass of copper on DGT resins immersed in a filtered raw wastewater sample.

269 observable) did not significantly interfere with accumu- 308
 270 lation rates into DGT devices. Hence, we consider in the 309
 271 following that Eq. (1) is valid for filtered wastewater. 310
 272 Let us note that unfiltered wastewater samples are likely 311
 273 to evolve when stored in batch experiments (Gourlay et 312
 274 al., 2005). Deployment in unfiltered samples for 24 h is 313
 275 possible but does not warrant accurate measurement. 314
 276 However, shorter duration could prevent significant 315
 277 biofouling or sample evolution. 316

278 3.2. Metal fractionation

279 3.2.1. Copper

280 The EC₅₀ values determined for each metal fraction 319
 281 in each medium are shown in Table 2. Copper fraction- 320
 282 ation at 50% effect is presented in Fig. 4. 321

283 In all the media, most copper was found as organic 322
 284 complexes (Cu_{org} varying from 84% to 94%). Within 323
 285 this fraction, Cu_{inert} dominated and ranged from 58% to 324
 286 71% of Cu_{org}. Labile organic copper able to diffuse in 325
 287 restricted gels (Cu_{res}) was absent in the medium con- 326
 288 taining treated wastewater from WWTP1 (T1), whereas 327
 289 it accounted for approximately 15% of organic copper 328
 290 in the other media. Labile organic copper discriminated 329
 291 by restricted gels (Cu_{dif}) was between 20% and 30% of 330
 292 organic copper in all media. 331

293 3.2.2. Cadmium

294 The EC₅₀ values determined for cadmium are pre- 332
 295 sented in Table 3. Cadmium fractionation at 50% effect 333
 296 is shown in Fig. 5. 334

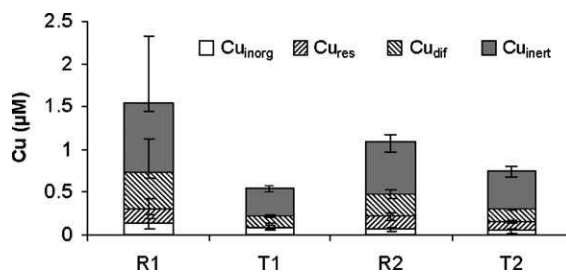


Fig. 4. Copper fractionation for 50% effect in the R1, R2, T1 and T2 media. Error bars indicate 95% confidence interval.

308 As for copper, most cadmium formed organic com- 309
 310 plexes. Cd_{org} totalled roughly 55% of total cadmium 310
 311 in the medium containing treated wastewater from 311
 312 WWTP2 (T2) and about 75% in the other media. Within 312
 313 the organic fraction, Cd_{dif} dominated (from 49% to 71% 313
 314 of Cd_{org}) except in R1 (32%). Cd_{inert} accounted for 54% 314
 315 of the organic cadmium in R1, but the percentages of 315
 316 Cd_{inert} were much lower and with a large confidence 316
 317 interval in the other media. The fraction Cd_{res} was found 317
 318 to be absent in T2, whereas it was situated between 13% 318

319 4. Discussion

320 4.1. Validity of the speciation obtained with the biotest

321 4.1.1. Toxicity of inorganic species

322 Computed copper speciation shows that the inorganic 322
 323 fraction (6–16% of total copper) is mainly composed in 323
 324 each medium of free copper (6–18%), copper hydroxide 324
 325 (17–25%) and copper carbonate (54–73%). The slight 325
 326 differences between the media are mainly due to small 326
 327 differences in pH (Table 1). Copper carbonate is usually 327
 328 not considered as contributing to copper toxicity (Mea- 328
 329 dor, 1991). Conversely, CuOH⁺ toxicity has been dis- 329
 330 cussed (Allen and Hansen, 1996). However, copper 330
 331 hydroxide seems less toxic than ionic copper and, in 331
 332 short-term toxicity tests, ionic copper is the predominant 332
 333 toxic species (Meador, 1991; De Schamphelaere and 333
 334 Janssen, 2002). Therefore we assumed that the toxic 334
 335 effect on *D. Magna* had to be related to ionic copper 335
 336 only. Inorganic cadmium speciation (22–45% of total 336

t2.1 Table 2
 t2.2 EC₅₀ (μM) determined for copper in the R1, R2, T1 and T2 media

t2.3		EC ₅₀ ^{tot}	EC ₅₀ ^{op}	EC ₅₀ ^{res}	EC ₅₀ ^{inorg}
t2.4	R1	1.545 (1.431–2.307)	0.719 (0.656–1.119)	0.307 (0.233–0.417)	0.129 (0.071–0.190)
t2.5	T1	0.545 (0.501–0.569)	0.222 (0.192–0.237)	0.086 (0.070–0.098)	0.088 (0.049–0.129)
t2.6	R2	1.081 (0.968–1.165)	0.476 (0.423–0.518)	0.225 (0.176–0.248)	0.062 (0.034–0.087)
t2.7	T2	0.737 (0.677–0.795)	0.297 (0.283–0.311)	0.148 (0.130–0.174)	0.044 (0.024–0.065)

t2.8 95% confidence intervals are indicated in parentheses.

t3.1 Table 3
t3.2 EC₅₀ (μM) determined for cadmium in the R1, R2, T1 and T2 media

t3.3		EC ₅₀ ^{tot}	EC ₅₀ ^{op}	EC ₅₀ ^{res}	EC ₅₀ ^{inorg}
t3.4	R1	2.156 (1.682–2.473)	1.245 (0.705–1.390)	0.712 (0.632–0.784)	0.471 (0.386–0.539)
t3.5	T1	1.884 (0.578–2.522)	1.343 (1.060–1.606)	0.653 (0.397–0.887)	0.465 (0.382–0.532)
t3.6	R2	1.827 (1.495–2.200)	1.511 (1.208–2.046)	0.695 (0.601–0.765)	0.461 (0.378–0.528)
t3.7	T2	1.042 (0.851–1.344)	0.840 (0.670–1.147)	0.429 (0.321–0.541)	0.465 (0.382–0.532)

t3.8 95% confidence interval are indicated in parentheses.

337 cadmium) is by far (>90%) dominated by the free ion. A
338 significant toxic effect of inorganic species other than
339 Cd²⁺ is therefore unlikely.

340 4.1.2. Toxicity mitigation by major cations

341 Wastewater addition, although limited, may modify
342 the major cation composition of the media (Table 1),
343 which may in turn modify metal toxicity (Di Toro et al.,
344 2001). De Schamphelaere and Janssen (2002) defined
345 the fraction of the total number of copper biotic binding
346 sites occupied by copper (f_{CuBL}) and proposed Eq. (7)
347 to calculate this using the cation concentrations. f_{CuBL}
348 involving 50% effect on *Daphnia* ($f_{\text{CuBL}}^{50\%}$) was cal-
349 culated using Eq. (7) for the reference medium (simu-
350 lated with VisualMinteq software v 2.12).

$$f_{\text{CuBL}} = \frac{K_{\text{CuBL}} \cdot (\text{Cu}^{2+})}{1 + K_{\text{CuBL}} \cdot (\text{Cu}^{2+}) + K_{\text{CaBL}} \cdot (\text{Ca}^{2+}) + K_{\text{MgBL}} \cdot (\text{Mg}^{2+}) + K_{\text{NaBL}} \cdot (\text{Na}^{+}) + K_{\text{HBL}} \cdot (\text{H}^{+})} \quad (7)$$

352 where K are the stability constants for the binding of
353 cation to the biotic ligand sites: $\log K_{\text{CuBL}} = 8.02$; \log
354 $K_{\text{CaBL}} = 3.47$; $\log K_{\text{MgBL}} = 3.58$; $\log K_{\text{NaBL}} = 3.19$;
355 $\log K_{\text{HBL}} = 5.4$ (De Schamphelaere and Janssen, 2002).
356 Assuming $f_{\text{CuBL}}^{50\%}$ is a constant (De Schamphelaere
357 and Janssen, 2002), free copper concentrations
358 corresponding to $f_{\text{CuBL}}^{50\%}$ in the other media could be
359 in turn calculated using Eq. (8).

$$(\text{Cu}^{2+}) = \frac{f_{\text{CuBL}}^{50\%} \cdot [1 + K_{\text{CaBL}} \cdot (\text{Ca}^{2+}) + K_{\text{MgBL}} \cdot (\text{Mg}^{2+}) + K_{\text{NaBL}} \cdot (\text{Na}^{+}) + K_{\text{HBL}} \cdot (\text{H}^{+})]}{K_{\text{CuBL}} \cdot (1 - f_{\text{CuBL}}^{50\%})} \quad (8)$$

362 The free copper concentrations inducing 50% effect
363 were found not to differ more than 5.4% from the
364 value in the reference medium. Because the variation
365 induced on EC₅₀^{inorg} was negligible compared to the
366 95% confidence interval of EC₅₀^{inorg} (Table 2), the
367 extrapolation of the free copper concentration from
368 the reference medium to all other media is validated.
369 This type of formalism and data were not available for
370 cadmium.

4.1.3. Comparison with other analytical methods

373 The characteristics of dissolved organic matter are
374 significantly altered by activated sludge treatment. Dur-
375 ing biodegradation, simple compounds like lipids,
376 sugars and proteins are highly removed (Dignac et
377 al., 2000a) whereas more complex organic structures
378 are produced (Dignac et al., 2000b). However, we
379 found that Cu_{org} was significantly correlated with
380 DOC ($r^2=0.9545$; Pearson's test, $P<0.005$), which
381 means that the organic ligands of all the media had
382 very similar properties regarding copper complexation.
383 A relationship was also found for cadmium but the
384 correlation was poor ($r^2=0.5496$; Pearson's test,
385 $P<0.1$). However, excluding Cd_{org} in the T1 medium,
386 which showed a large confidence interval, the correla-
387 tion became highly significant ($r^2=0.9934$; Pearson's
388 test, $P<0.005$). Using this correlation, copper organic
389 ligand density (titrated for 50% effect on *Daphnia*) was
390 found to be 0.249 μmol mg C⁻¹, which is close to van
391 Veen and Burton's (2002) results. With the ion selec-
392 tive electrode (ISE), these authors obtained a copper
393 complexing capacity of 0.213 μmol mg C⁻¹ for nine
394 different treated effluents. This close agreement indi-
395 cates that experiments in our study were probably run
396 near the saturation of metal ligands, which is a direct
397 consequence of the observed biological endpoint.
398 Buckley (1994) also showed a good correlation be-
399 tween ISE and a biological method (growth inhibition
400 on *Lemna minor*) for determining copper complexing
401 capacity in wastewater effluents. Our methodology,
402

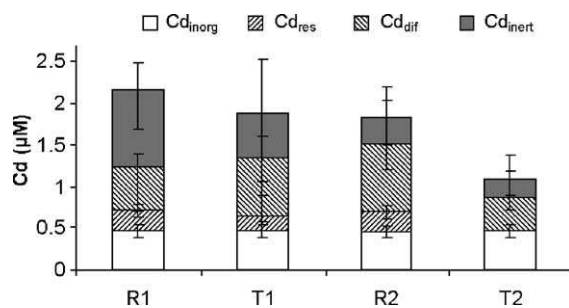


Fig. 5. Cadmium fractionation corresponding to 50% effect in the R1, R2, T1 and T2 media. Error bars indicate 95% confidence interval.

416 based on toxicity tests with *D. magna*, is therefore in
417 agreement with this well-documented electrochemical
418 technique.

419 4.2. Fractionation within the organic fraction assessed 420 by DGT

421 Although the wastewater samples we used in the
422 experiments were diluted and spiked with metals,
423 most copper (>84%) and cadmium (55% in T2 and
424 >75% in the other media) was complexed by organic
425 matter in all the media. Indeed, Kunz and Jardim (2000)
426 showed that copper speciation in sewage is mostly
427 controlled by complexation with dissolved organic mat-
428 ter. In all media, at 50% biological effect, organic
429 copper complexes were mostly DGT-inert (60–70%),
430 whereas cadmium complexes appeared mostly DGT-
431 labile (50–80%). The copper complexation with waste-
432 water organic ligands therefore appears stronger than
433 for cadmium. This complies with the observations of
434 Ghosh and Banerjee (1997), who determined condition-
435 al stability constants between humic acids extracted
436 from sewage and Cu two orders of magnitude higher
437 than for Cd. The fraction Cu_{dif} , in all media, accounted
438 for one-quarter of organic copper, whereas Cd_{dif} was
439 the major fraction of organic cadmium. Indeed, Bender
440 et al. (1970) and Buckley (1983) reported that most
441 copper binding capacity in effluents was associated
442 with compounds of less than 1000 Da, which would
443 likely diffuse in both open-pore and restricted gels. Part
444 of the ligands responsible for cadmium and copper
445 complexation were probably different. Cadmium, clas-
446 sified as a soft metal, is known to coordinate preferen-
447 tially with S or N donor atoms whereas copper, a
448 moderately hard metal, coordinates preferentially with
449 O donor atoms (Stumm and Morgan, 1996). Such
450 ligand difference in wastewater effluent has been pre-
451 viously mentioned by Gardiner and Stiff (1975). How-
452 ever, as far as wastewater are concerned, few data are
453 available.

454 Both Me_{inert} and DGT-labile complexes ($Me_{res} +$
455 Me_{dif}) were lower in media containing treated waste-
456 water than in media containing raw wastewater, sug-
457 gesting a ligand removal during the treatment. The
458 proportion of DGT-inert organic copper was higher in
459 the media containing treated wastewater (71% and
460 63%) than in media containing raw wastewater (58%
461 and 59%, respectively), whereas for cadmium this
462 trend was observed only for samples from WWTP2
463 (35% vs. 23%). It arises that strong ligand removal is
464 accompanied by a higher weak ligand removal. The
465 biological treatment therefore slightly enhances the

466 proportion of strong organic ligands in both plants. 466
467 Indeed, the activated sludge treatment removes biode- 467
468 gradable organic matter such as proteins or volatile 468
469 fatty acids (VFA) (Dignac et al., 2000a), which con- 469
470 stitute rather weak ligands for copper (e.g. log 470
471 $K=2.21$ for the formation of $Cu\text{-acetate}^+$, NIST ther- 471
472 modynamic database 46, v 6.0, available in the Visual- 472
473 MInteq database). The absence of the fraction Cu_{res} 473
474 in T1, whereas it accounted for 13% of organic copper 474
475 in R1, could be explained by the degradation of such 475
476 ligands during the treatment. The significant correla- 476
477 tion ($P<0.005$) obtained between Me_{org} and DOC 477
478 regardless the stage in the treatment, leads us to 478
479 infer that the strong ligand removal is counterbalanced 479
480 (regarding metal complexation) by a higher removal of 480
481 weak ligand. The overall binding properties appear 481
482 therefore quite similar at the tested metal to ligand 482
483 ratios. The proportion of organic cadmium unable to 483
484 diffuse within restricted gels (Cd_{dif}) was found to be 484
485 higher in T1 than in R1 (49% vs. 32%) and higher in 485
486 T2 than in R2 (71% vs. 60%). This indicates that 486
487 cadmium organic ligands had more complex structures 487
488 in treated than in raw wastewater. 488

489 4.3. DGT as a speciation tool in wastewater 489

490 The biotests provided an estimate of free metal 490
491 allowing in turn inorganic metal assessment. DGT 491
492 devices sampled the labile copper and cadmium com- 492
493 plexes, with open-pore gels and restricted gels. Zhang 493
494 and Davison (2000) claimed that the combination of the 494
495 two gels could be a way to discriminate between inor- 495
496 ganic and organic metal complexes. However, we show 496
497 that DGT devices equipped with restricted gels still 497
498 sample a significant amount of labile organic metal 498
499 complexes (Figs. 4 and 5), as was also suggested by 499
500 Odzak et al. (2002). Indeed, Sarathy and Allen (2005) 500
501 showed that, oppositely to natural DOM, wastewater 501
502 DOM includes some non-humic ligands. According to 502
503 their binding strength, complexes with such ligands can 503
504 contribute to DGT measurement. The results of our 504
505 study clearly demonstrate that labile wastewater organic 505
506 complexes can be measured with restricted gels, which 506
507 should be taken into account to evaluate the ecotoxicolo- 507
508 gical significance of DGT measurement, especially in 508
509 the case of sewage-impacted waters. However, it must 509
510 be acknowledge that our study was conducted in solu- 510
511 tions with metal/ligand ratios greater than those en- 511
512 countered in real wastewater. Most of the complexing 512
513 sites occupied by metal are therefore expected to be 513
514 weaker than those occupied in real samples. In real 514
515 wastewater, labile organic complexes (Me_{res} and 515

516 Me_{dif} should therefore be comparatively less abundant
517 than in this study and DGT measurements closer to the
518 inorganic metal fraction.

519 Moreover, although experiments were conducted in
520 filtered wastewater, it is likely that DGT can be used in
521 situ. In this case, wastewaters are continuously renewed
522 and not expected to evolve as in batch reactors.

523 5. Conclusions

524 Copper and cadmium speciation was studied in
525 spiked diluted wastewater using both *Daphnia* bioas-
526 says and DGT. Although the metal to DOM ratio was
527 much higher in experimental media than it was in
528 wastewater, metal speciation was dominated by the
529 interactions with organic ligands both with raw and
530 treated wastewater. From our observations, the amount
531 of organic copper or cadmium at 50% biological effect
532 (i.e. nominal inorganic concentration) would only de-
533 pend on the amount of dissolved organic matter, re-
534 gardless the stage in the treatment. However, it should
535 be remembered that the differences between raw and
536 treated wastewater regarding metal binding affinity
537 were probably lowered by the experimental set up.
538 Due to the biological endpoint observed, the media
539 needed to be spiked with high metal concentrations.
540 If the metal/ligand ratio was decreased, the organic
541 metal might no longer be so strongly correlated with
542 DOC independently of wastewater origin. We showed
543 that DGT was a reliable tool to evaluate metal fraction-
544 ation in wastewater, which opens a wide field of prac-
545 tical research. DGT can characterize the stability of
546 complexes by distinguishing between labile and inert
547 forms of metals in wastewater. However, even with
548 restricted gels, DGT-sampled species were shown to
549 include labile organic complexes for the two metals
550 we studied (copper and cadmium). Therefore, whereas
551 DGT might be very useful to provide an operational
552 fractionation of metal in domestic-derived wastewaters,
553 it does not ensure a strict inorganic metal measurement,
554 nor a strict determination of bioavailable metal.

555 Acknowledgements

556 The assistance of Isabelle Chardon in the toxicity
557 tests is gratefully acknowledged. The authors thank Dr.
558 Hao Zhang (Lancaster University) for providing effec-
559 tive diffusion coefficient in restricted gels. The SIAAP
560 (Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de
561 l'Agglomération Parisienne) and the Ville de Meaux are
562 kindly acknowledged for providing access to their fa-
563 cilities and facilitate onsite sampling. Rémy Buzier

acknowledges a Ph.D. grant from Cemagref and the
"Région Ile de France". Part of this work was funded by
the French national research program ECODYN.

References

- Allen HE, Hansen DJ. The importance of trace metal speciation to water quality criteria. *Water Environ Res* 1996;68:42–54.
- Alvarez EA, Mochon MC, Sanchez JCJ, Rodriguez MT. A voltammetry procedure with medium exchange for the speciation of heavy metals in wastewater of a sewage treatment plant. *Electroanalysis* 1998;10:917–20.
- Bedsforth WW, Sedlak DL. Sources and environmental fate of strongly complexed nickel in estuarine waters: the role of ethylenediaminetetraacetate. *Environ Sci Technol* 1999;33:926–31.
- Bender ME, Matson WR, Jordan RA. On the significance of metal complexing agents in secondary sewage effluents. *Environ Sci Technol* 1970;4:520–1.
- Brown PL, Markich SJ. Evaluation of the free ion activity model of metal-organism interaction: extension of the conceptual model. *Aquat Toxicol* 2000;51:177–94.
- Bubb JM, Lester JN. The impact of heavy-metals on lowland rivers and the implications for man and the environment. *Sci Total Environ* 1991;100:207–33.
- Bubb JM, Lester JN. The effect of final sewage effluent discharges upon the behavior and fate of metals in a lowland river system—a question of dilution. *Environ Technol* 1995;16:401–17.
- Buckley JA. Complexation of copper in the effluent of a sewage treatment plant and an estimate of its influence on toxicity to Coho salmon. *Water Res* 1983;17:1029–34.
- Buckley JA. The bioavailability of copper in wastewater to Lemna minor with biological and electrochemical measures of complexation. *Water Res* 1994;28:2457–67.
- Campbell PGC. Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critic of the free ion model. In: Tessier A, Turner DR, editors. *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. John Wiley & Sons, Ltd. p. 45–102.
- Davison W, Zhang H. In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-films gels. *Nature* 1994;367:546–8.
- De Schampelaere KAC, Janssen CR. A biotic ligand model predicting acute copper toxicity for *Daphnia Magna*: the effects of calcium, magnesium, sodium, potassium, and pH. *Environ Sci Technol* 2002;36:48–54.
- Di Toro DM, Allen HE, Bergman HL, Meyer JS, Paquin PR, Santore RC. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals 1 Technical basis. *Environ Toxicol Chem* 2001;20:2383–96.
- Dignac M-F, Ginestet P, Rybacki D, Bruchet A, Urbain V, Scribe P. Fate of wastewater organic pollution during activated sludge treatment: nature of residual organic matter. *Water Res* 2000a;34:4185–94.
- Dignac M-F, Derenne S, Ginestet P, Bruchet A, Knicker H, Largeau C. Determination of structure and origin of refractory organic matter in bio-epurated wastewater via spectroscopic methods Comparison of conventional and ozonation treatments. *Environ Sci Technol* 2000b;34:3389–94.
- Ekster A, Jenkins D. Nickel and copper removal at the San Jose/Santa Clara water pollution control plant. *Water Environ Res* 1996;68:1172–8.
- European Parliament. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for a commu-

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

- 624 nity action in the field of water policy, Official journal (OJ L 327)
625 on 22 December 2000.
- 626 Gagnon C, Saulnier I. Distribution and fate of metals in the dispersion
627 plume of a major municipal effluent. *Environ Pollut* 2003;124:
628 47–55.
- 629 Gardiner J, Stiff MJ. The determination of cadmium, lead, copper and
630 zinc in ground water, estuarine water, sewage and sewage effluent
631 by anodic stripping voltammetry. *Water Res* 1975;9:517–23.
- 632 Ghosh R, Banerjee DK. Complexation of trace metals with humic
633 acids from soil, sediment and sewage. *Chem Spec Bioavailab*
634 1997;9:15–9.
- 635 Giokas DL, Antelo J, Paleologos EK, Arce F, Karayannis MI. Copper
636 fractionation with dissolved organic matter in natural waters and
637 wastewater—a mixed micelle mediated methodology (cloud point
638 extraction) employing flame atomic absorption spectrometry. *J*
639 *Environ Monit* 2002;4:505–10.
- 640 Gourlay C, Tusseau-Vuillemin M-H, Mouchel J-M, Garric J. The
641 ability of dissolved organic matter (DOM) to influence benzo[a]-
642 pyrene bioavailability increases with DOM biodegradation. *Eco-*
643 *toxicol Environ Saf* 2005;61:74–82.
- 644 Hassler CL, Wilkinson KJ. Failure of the biotic ligand and the free-ion
645 activity models to explain zinc bioaccumulation by *Chlorella*
646 *kesslerii*. *Environ Toxicol Chem* 2003;22:620–6.
- 647 Imai A, Fukushima T, Matsushige K, Kim Y-H, Choi K. Character-
648 ization of dissolved organic matter in effluents from wastewater
649 treatment plants. *Water Res* 2002;36:859–70.
- 650 International Standard Organisation. Water quality-determination of
651 the inhibition of the mobility on *Daphnia magna* Strauss (Clado-
652 cera, Crustacea): acute toxicity test, Rep ISO 6341. Geneva:
653 International Standard Organisation; 1993.
- 654 Isnard P, Flammarion P, Romana G, Babut M, Bastien Ph, Bintein S,
655 et al. Statistical analysis of regulatory ecotoxicity tests. *Chemo-*
656 *sphere* 2001;45:659–69.
- 657 Kaplan D, Abeliovich A, Ben-Yaakow S. The fate of heavy metal in
658 wastewater stabilization ponds. *Water Res* 1987;21:1189–94.
- 659 Kunz A, Jardim WF. Complexation and adsorption of copper in raw
660 sewage. *Water Res* 2000;34:2061–8.
- 661 Laxen DPH, Harrison RM. The physicochemical speciation of Cd,
662 Pb, Cu, Fe and Mn in the final effluent of a sewage treatment
663 works and its impact on speciation in the receiving river. *Water*
664 *Res* 1981;15:1053–65.
- 665 Ma H, Allen HE, Yin Y. Characterization of isolated fractions of
666 dissolved organic matter from natural waters and a wastewater
667 effluent. *Water Res* 2001;35:985–96.
- 668 Meador JP. The interaction of pH, dissolved organic carbon, and total
669 copper in the determination of ionic copper and toxicity. *Aquat*
670 *Toxicol* 1991;19:13–32.
- 671 Morel FMM. Principles of aquatic chemistry. New York: Wiley-
672 Interscience; 1983. 301 pp.
- Nielsen JS, Hrudehy SE. Metal loadings and removal at a municipal
activated sludge plant. *Water Res* 1983;17:1041–52.
- Odzak N, Kistler D, Xue H, Sigg L. In situ trace metal speciation in a
eutrophic lake using the technique of diffusion gradient in thin
films (DGT). *Aquat Sci* 2002;64:292–9.
- Oliver BG, Cosgrove EG. The efficiency of heavy metal removal by a
conventional activated sludge treatment plant. *Water Res* 1974;8:
869–74.
- Paquin PR, Gorsuch JW, Apte S, Batley GE, Bowles KC, Campbell
PGC, et al. The biotic ligand model: a historical overview. *Comp*
Biochem Phys C 2002;133:3–35.
- Sangi MR, Halstead MJ, Hunter KA. Use of the diffusion gradient
thin film method to measure trace metals in fresh waters at low
ionic strength. *Anal Chim Acta* 2002;456:241–51.
- Sarathy V, Allen HE. Copper complexation by dissolved organic
matter from surface water and wastewater effluent. *Ecotoxicol*
Environ Saf 2005;61:337–44.
- Sedlak DL, Phinney JT, Bedworth WW. Strongly complexed Cu and
Ni in wastewater effluents and surface runoff. *Environ Sci Technol*
1997;31:3010–6.
- Stumm W, Morgan JJ. Aquatic chemistry. Chemical equilibria and
rates in natural waters. New York: John Wiley and Sons; 1996.
1022 pp.
- Tusseau-Vuillemin M-H, Gilbin R, Taillefert M. A dynamic numerical
model to characterize labile metal complexes collected with dif-
fusion gradient in thin films devices. *Environ Sci Technol* 2003;
37:1645–52.
- Tusseau-Vuillemin M-H, Gilbin R, Bakkaus E, Garric J. Performance
of the diffusive gradient in thin films in evaluating the toxic
fraction of copper to *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem*
2004;23:2154–61.
- Van Ginneken L, Bervoets L, Blust R. Bioavailability of Cd to the
common carp, *Cyprinus carpio*, in the presence of humic acid.
Aquat Toxicol 2001;52:13–27.
- van Leeuwen HP. Revisited: the conception of lability of metal
complexes. *Electroanalysis* 2001;13:826–30.
- van Veen E, Burton N. Speciation of copper in sewage effluents and
its toxicity to *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 2002;21:
275–80.
- Zhang H, Davison W. Performance characteristics of diffusion gradi-
ents in thin films for the in situ measurement of trace metals in
aqueous solution. *Anal Chem* 1995;67:3391–400.
- Zhang H, Davison W. Diffusional characteristics of hydrogels used in
DGT and DET techniques. *Anal Chim Acta* 1999;398:329–40.
- Zhang H, Davison W. Direct in situ measurements of labile inorganic
and organically bound metal species in synthetic solutions and
natural waters using diffusive gradients in thin films. *Anal Chem*
2000;72:4447–57.