



HAL
open science

Mise au point d'une systématique de caractérisation des interactions Matière Organique Naturelle Dissoute (MOND) – Contaminants métalliques

Yoann Louis

► **To cite this version:**

Yoann Louis. Mise au point d'une systématique de caractérisation des interactions Matière Organique Naturelle Dissoute (MOND) – Contaminants métalliques. Chimie. Université du Sud Toulon Var, 2008. Français. NNT: . tel-00410142

HAL Id: tel-00410142

<https://theses.hal.science/tel-00410142v1>

Submitted on 18 Aug 2009

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.



Discipline :
CHIMIE, chimie analytique, chimie de
l'environnement marin, modélisation



THESE de Doctorat

Soutenue par **M. LOUIS Yoann**

le 21 Novembre 2008
à l'Université du Sud Toulon - Var

Mise au point d'une systématique de caractérisation des interactions Matière Organique Naturelle Dissoute (MOND) – Contaminants métalliques

S. MOUNIER D. OMANOVIĆ	Directeurs de Thèse : Maître de conférences (HDR) Chercheur	Université du Sud Toulon - Var Institut Ruđer Bošković - Croatie
N. MARMIER R. RISO	Rapporteurs : Professeur Professeur	Université de Nice Sofia Antipolis Université de Bretagne Occidentale
D. COSSA F. ELBAZ POULICHET C. GARNIER	Examineurs : Directeur de Recherche Directrice de Recherche Maître de conférences	IFREMER, Centre de Nantes Université Montpellier II Université de Bordeaux I
J.-L. GONZALEZ I. PIŽETA	Invités : Chercheur Professeur	IFREMER, Centre de Méditerranée Institut Ruđer Bošković - Croatie

*A mes parents qui m'ont toujours encouragé,
Et à mamie Claire, disparue un peu trop tôt, et qui serait très fière de moi,
Je leur dédie ce travail de thèse qui représente l'aboutissement de mes études.*

*En science, la phrase la plus excitante que l'on peut entendre,
celle qui annonce des nouvelles découvertes, ce n'est pas "Eureka" mais... "c'est drôle".*

Isaac Asimov

REMERCIEMENTS

Approchant à grands pas de la fin de l'aventure de mon doctorat, c'est avec un grand plaisir que je désire adresser mes plus sincères remerciements à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer et plus particulièrement à celles qui m'ont permis de travailler dans d'aussi bonnes conditions.

Je tiens donc, avant tout, à présenter toute ma gratitude au Professeur Yves Lucas, Directeur du Laboratoire PROTEE (Université du Sud Toulon-Var), pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, mais aussi pour ses conseils et sa sympathie.

Je remercie ensuite, Monsieur Stéphane Mounier, mon premier Directeur de thèse, sans qui il n'aurait pas été possible de travailler dans d'aussi bonnes conditions. Je tiens aussi à le remercier pour m'avoir rendu plus indépendant et pour m'avoir initié à sa philosophie. Je lui apporte encore toute ma reconnaissance pour m'avoir donné l'opportunité de rencontrer M. Dario Omanović (RBI, Croatie), mon second Directeur de thèse, ce qui m'a permis de découvrir comment travaillent les spécialistes de l'électrochimie en Croatie ! Enfin, je le remercie de m'avoir fait participer à de nombreux colloques scientifiques, qui m'ont donné un aperçu de ce qu'est la communauté scientifique, et où j'ai pu présenter une partie de mes travaux.

Je remercie au passage, sa sympathique famille : Sophie, Lili, Joseph et Zac (Désolé pour la poule et la tortue, mais j'ai omis leurs noms !), rencontrée à maintes reprises et avec qui j'ai découvert les jeux de rôles.

Je tiens à remercier particulièrement M. Dario Omanović (RBI, Croatie), mon second Directeur de thèse, qui m'a apporté de nombreux conseils permettant, entre autres, d'accélérer mon apprentissage de l'électrochimie, et d'acquérir les compétences nécessaires à l'étude des ultra traces. Un grand merci encore pour aussi, m'avoir fait découvrir son pays, et m'avoir toujours très agréablement accueilli lors de mes missions en Croatie.

J'exprime également toute ma gratitude aux Professeurs Marmier Nicolas (Université de Nice Sophia Antipolis) et Riso Ricardo (Université de Bretagne Occidentale), rapporteurs de ce travail, qui ont bien voulu accepter de juger le contenu de ma thèse.

Je tiens également à remercier les Directeurs de Recherche, M. Cossa Daniel (IFREMER, Centre de Nantes) et Mme Elbaz-Poulichet Françoise (Université Montpellier II), ainsi que M. Garnier Cédric (MdC à l'Université de Bordeaux I), qui ont accepté de participer à mon Jury.

Je suis aussi très reconnaissant à M. Gonzalez Jean Louis (IFREMER, Centre de Méditerranée), ainsi qu'au Professeur Ivanka Pižeta (RBI, Croatie), d'avoir accepté de venir assister à ma thèse, mais aussi pour les nombreux échanges forts sympathiques que nous avons eus durant ces 3 années de thèse. Je remercie, de plus, particulièrement Mme Ivanka Pižeta, pour m'avoir accueilli toujours avec soins lors de mes missions en Croatie, mais aussi, pour ses nombreux conseils avisés dès le début de ma thèse.

Je tiens aussi à remercier M. Dudal Yves (INRA Avignon - UMR Climat, Sol et Environnement) pour ses conseils et ses remarques enrichissantes lors des comités de thèse.

Je remercie également, le Ministère de l'environnement et de la recherche, ainsi que le CIES Provence Côte d'Azur Corse, sans qui, il ne m'aurait jamais été aussi agréable de réaliser cette thèse.

Je tiens, ensuite, à remercier particulièrement M. Martino Christian (USTV), qui a toujours pu me dépanner rapidement, et qui, grâce à ses compétences d'électronicien, m'a permis de mettre en place mon système analytique, sans lequel, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail. Je tiens aussi à remercier M. Chanut Robert (IUT) qui a accepté de mettre ses compétences à mon service afin de réaliser avec minutie l'usinage de la boîte à burettes !

J'exprime ma plus grande reconnaissance à M. Cukrov Neven ainsi qu'à M. Kwokal Željko et toute l'équipe du RBI (Croatie) pour m'avoir fait découvrir la merveilleuse station marine scientifique de Martinska et pour avoir à chaque fois rendu le séjour aussi productif qu'agréable. Je n'oublierai jamais les bons moments passés en votre compagnie, ni les grillades, et encore moins, les ronflements anonymes qui remplaçaient le champ des cigales une fois la nuit tombée !

Je tiens tout particulièrement à remercier le couple Garnier Cédric et Lenoble Véronique (USTV), qui m'ont connu avant ma thèse et qui peuvent, aujourd'hui, voir le résultat de leurs efforts. Je remercie donc très chaleureusement Cédric, pour les longs appels téléphoniques qui m'ont permis d'avancer lorsque j'étais bloqué, mais aussi, pour la disponibilité dont il a fait preuve, notamment cette dernière année, qu'il a pu passer au laboratoire en notre compagnie. Je le remercie enfin, pour les nombreuses heures de travail réalisées à mes côtés et qui m'ont permis d'avancer, d'autant plus vite, dans mon travail.

Je remercie aussi Véronique, qui m'a encadré dès son arrivée, lors de ma 2^{ème} année de thèse et qui m'a accompagné (au pays des pigeons) lors de ma toute première conférence internationale en Turquie !

Je remercie, ensuite, M. Luciani Xavier et Mlle Zhao Huiyu (USTV), pour m'avoir apporté leurs compétences et leurs savoirs pour les mesures et les interprétations des expériences de spectroscopie de fluorescence, ainsi que le Dr. Redon Roland pour son aide dans le développement des fonctions mathématiques utilisées sous Matlab.

Je remercie encore, M. Durrieu Gaël, ingénieur au laboratoire (USTV), pour sa gentillesse, mais surtout, sur sa façon de travailler et ses qualités scientifiques qui sont enviées par tous les laboratoires de la région !

Je remercie, enfin, toutes les personnes qui m'ont rendu ces 3 années agréables et qui ont aussi, parfois, eu l'occasion de me conseiller dans le cadre du monitorat, avec dans l'ordre des bureaux : Mme Ortalo-Magne Annick, Mme Praud-Tabaries Annie, M. Culioli Gérald, M. Piovetti Louis, M. Le Poupon Christophe, Mme Richou Mireille, Mme Patel-Sorrentino Nathalie, M. Benaim Jean-Yves, Mme Merdy Patricia.

Dans la famille « Thésards et Etudiants », je remercie particulièrement Mlle Rossi Nadège et son Directeur de thèse, le Professeur Jamet Jean-Louis (USTV), pour leur sympathie et les échanges que nous avons eu à l'interface chimie biologie !

Un grand merci, aussi, à tous les camarades qui ont, aussi, entamé l'aventure de la thèse et que j'apprécie particulièrement pour leur aspect humain et leurs connaissances scientifiques,

Mlle Bonnefoy Aurélie, M. Marcellino Sébastien, M. Noirtin Eric, M. Viano Yannick,... et bien sûr Mlle Zhao Huiyu à qui je souhaite une très belle réussite.

Je remercie, de plus, tous les étudiants de passage au labo, mais aussi les étudiants et les moniteurs, que j'ai eu l'occasion de rencontrer dans le cadre de mon monitorat et qui m'ont permis de m'initier à la vie d'enseignant chercheur.

Je remercie avec une attention toute particulière, les personnes sans qui je ne saurais pas là aujourd'hui : mes parents, pour m'avoir soutenu et encouragé depuis toujours et qui m'ont permis d'en arriver là, ainsi que mon frère, qui entame aussi cette aventure, et à qui je dois les cours de Maths de mes années lycée. Je leurs dédie donc ce travail, ainsi qu'à mes mamies, et plus particulièrement mamie Claire, ma grand-mère paternelle, qui aurait été très fière de moi aujourd'hui.

Enfin, je remercie très tendrement Mlle Zhao Huiyu, dite Annaëlle pour les français, de m'avoir, elle aussi, encouragé et supporté, et à qui je dois, non seulement, quelques mesures de fluorescence, mais surtout la découverte de la Chine (Guangdong / 广东), la découverte de la nourriture chinoise, mais aussi de l'amour ! Une pensée toute particulière, aussi, pour sa famille, et plus particulièrement ses parents, qui m'ont accueillis les bras grands ouverts, malgré la barrière de la langue : 谢谢 妈妈, 谢谢 爸爸!

TABLE DES MATIERES :

<u>LISTE DES ABREVIATIONS</u>	<u>1</u>
--	-----------------

<u>AVANT-PROPOS</u>	<u>5</u>
----------------------------------	-----------------

<u>CHAPITRE I. GENERALITES</u>	<u>9</u>
---	-----------------

IA. LES METAUX TRACES	9
IA1. ORIGINES ET ROLES DES METAUX TRACES.....	9
IA1a) Les sources naturelles	10
IA1b) Les sources anthropiques.....	10
IA1c) Rôles et cycle des métaux traces.....	11
IA2. METAL PRINCIPALEMENT ETUDIE DANS CE TRAVAIL : LE CUIVRE	13
IA2a) Historique	13
IA2b) Utilisation	13
IA2c) Propriétés biologiques et toxicité.....	14
IA2d) Le cuivre et la Matière Organique Naturelle	15
IB. LA MATIERE ORGANIQUE NATURELLE (MON).....	16
IB1. ORIGINE ET PROPRIETES DE LA MATIERE ORGANIQUE NATURELLE	16
IB1a) Origine de la MON	16
IB1b) Propriétés de la MON	17
IB2. CARACTERISATION ET MODELISATION DES PROPRIETES DE LA MON	19
IB2a) Techniques de concentration de la MON.....	19
IB2b) Les interactions Matière Organique Naturelle (MON)-Métaux traces	20
IB2c) Principales Techniques de caractérisation	20
IB2d) Technique de « fitting » utilisée dans cette étude	24
IC. TECHNIQUES D'ANALYSE.....	28
IC1. DIFFERENTES TECHNIQUES UTILISEES POUR L'ANALYSE DES METAUX TRACES	28
IC2. CHOIX DE LA TECHNIQUE D'ANALYSE ELECTROCHIMIQUE	29
IC3. LA DIFFERENTIAL PULSE ANODIC STRIPPING VOLTAMMETRY (DPASV)	31
IC3a) Appareillage	31
IC3b) Au niveau de l'échantillon : la cellule et les électrodes.....	32
IC3c) Pré-concentration - dépôt.....	34
IC3d) Repos et redissolution.....	35
IC3e) Procédure type de DPASV utilisée	37
IC4. LA PSEUDOPOLAROGRAPHIE	38
IC5. METHODE DE TITRATION LOGARITHMIQUE	40
IC6. LA POTENTIOMETRIE : TITRATION ACIDO-BASIQUE	41
IC6a) Appareillage utilisé	42
IC6b) Procédure de dosage	43
IC7. MESURE DU CARBONE ORGANIQUE DISSOUS (COD).....	44

<u>CHAPITRE II. DEVELOPPEMENT DE PROTOCOLES ANALYTIQUES.....</u>	<u>47</u>
---	------------------

IIA. MISE AU POINT ET AMELIORATIONS DE L'APPAREILLAGE.....	48
IIA1. PROBLEME D'EVAPORATION DE L'ECHANTILLON	48
IIA2. PROBLEMES DE PRECISION ET DE POLLUTION	49
IIA3. PROBLEME DE L'ADSORPTION DU SYSTEME A PH NATUREL	52
IIB. UTILISATION D'UNE ETAPE DE DESORPTION DES SUBSTANCES ACTIVES DE SURFACE	54
IIB1. INFLUENCE DU POTENTIEL DE DEPOT (E_{ACC}) SUR LES SAS.....	54
IIB2. INFLUENCE DES SAS SUR L'ANALYSE DU CUIVRE PAR ASV.....	56

IIB3.	INFLUENCE DE L'ETAPE DE DESORPTION SUR LES PSEUDOPOLAROGRAMMES	57
IIB4.	INFLUENCE DES INTERFERENCES CAUSEES PAR LES SAS SUR LA DETERMINATION DE CAPACITES COMPLEXANTES	60
IIC.	TRAITEMENT DES SIGNAUX OBTENUS	63
IIC1.	DETERMINATION DE LA LIGNE DE BASE	63
IIC2.	RESOLUTION D'UN MASSIF MULTI-PICS	65
IIC3.	DETERMINATION DE LA SENSIBILITE.....	66
IIC4.	APPROCHE CINETIQUE DES PROPRIETES DE COMPLEXATION DE LA MOND	67
IIC4a)	Modélisation de la courbe de cinétique	68
IIC4b)	Protocole de résolution de l'équation cinétique	71
IIC4c)	Utilisation de l'approche cinétique.....	72
IID.	MISE EN PLACE D'UN PROTOCOLE D'ANALYSE DE MOND.....	74
IID1.	PREALABLE AUX ANALYSES	74
IID2.	PROCEDURE D'ANALYSE D'UNE MOND MARINE.....	74

CHAPITRE III. APPLICATION EXPERIMENTALE : ETUDE D'UN ECHANTILLON NATUREL MARIN CONCENTRE..... 81

IIIA.	ETUDE DES INTERACTIONS DE LA MOND MARINE CONCENTREE AVEC LE CUIVRE ET LE ZINC PAR PSEUDOPOLAROGRAPHIE	83
IIIA1.	ANALYSES PREALABLES.....	83
IIIA2.	PSEUDOPOLAROGRAMMES DU CUIVRE.....	84
IIIA3.	PSEUDOPOLAROGRAMMES DU ZINC	89
IIIB.	CARACTERISATION ET MODELISATION DES INTERACTIONS DE LA MOND MARINE AVEC LE CUIVRE, LE CALCIUM ET LE PROTON.....	92
IIIB1.	ETUDE POTENTIOMETRIQUE DE L'ECHANTILLON CONCENTRE	92
IIIB2.	MESURES PSEUDOPOLAROGRAPHIQUES	95
IIIB3.	DETERMINATION DES PARAMETRES DE COMPLEXATION DU CUIVRE, CALCIUM ET PROTON	98
IIIB3a)	Expérience d'ajout logarithmique de cuivre	98
IIIB3b)	Expériences de compétition avec le calcium et le proton	99
IIIB3c)	Fitting simultané des expériences obtenues sur l'échantillon de MOND concentrée	100
IIIC.	APPLICATION DU MODELE DE MOND MARINE DEFINI A UN ECHANTILLON NATUREL MARIN NON-CONCENTRE	102
IIIC1.	DETERMINATION DE LA SPECIATION DU CUIVRE DANS L'ECHANTILLON MARIN ETUDIE.....	104
IIIC2.	CONCLUSIONS.....	105

CHAPITRE IV. ETUDE D'UN ESTUAIRE TRES PEU POLLUE : ŠIBENIK (CROATIE) 109

IVA.	MESURES PREALABLES ET OBSERVATIONS DE TERRAIN	111
IVA1.	PROFILS DE SALINITE	111
IVA2.	CARBONE	112
IVA3.	METAL TOTAL	114
IVA4.	PSEUDOPOLAROGRAMMES.....	116
IVB.	ANALYSE DES PROPRIETES DE COMPLEXATION DE LA MOND DE L'ESTUAIRE.....	118
IVB1.	ETUDE DES PROPRIETES DE COMPLEXATION DE LA MOND A L'EQUILIBRE	119
IVB1a)	Influence du temps d'équilibre sur la détermination des paramètres de complexation	119
IVB1b)	Variation théorique d'une constante de stabilité dans un estuaire	120
IVB1c)	Variation de la constante de complexation thermodynamique suivant la charge moyenne du site de complexation.....	122
IVB1d)	Résultats obtenus à l'équilibre	124
IVB1e)	Traitement d'un échantillon synthétique.....	127
IVB2.	CONSTANTES CINETIQUES D'ASSOCIATION ET DE DISSOCIATION	130

IVB3. COMPARAISON DES RESULTATS DE COMPLEXATION OBTENUS PAR LES APPROCHES A L'EQUILIBRE ET CINETIQUES	132
IVB3a) Type de résultats obtenus pour un échantillon	132
IVB3b) Comparaison des résultats de l'ensemble des échantillons.....	134
IVB3c) Avantages et inconvénients de chaque approche	135
IVB4. ETUDE DES ECHANTILLONS PAR SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE	137
IVC. APPROCHE ENVIRONNEMENTALE	142
IVC1. MODELISATION DES CONCENTRATIONS EN CUIVRE LIBRE DANS LA COLONNE D'EAU SUIVANT LA CONTAMINATION DU MILIEU	142
IVC2. PREDICTION DE LA REACTIVITE DE LA MOND, LORS D'UNE CONTAMINATION EN CUIVRE	144
IVC3. ANALYSE DES RESULTATS OBTENUS.....	147

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES..... 151

LISTE DES FIGURES..... 157

LISTE DES TABLEAUX..... 163

BIBLIOGRAPHIE..... 165

ANNEXES..... 179

ANNEXE 1 :	179
PROJET PROGRAMME SOUS GPES AFIN DE REALISER UNE TITRATION LOGARITHMIQUE.....	179
ANNEXE 2 :	180
CODE DU PROGRAMME DE RESOLUTION DES EXPERIENCES CINETIQUES POUR 1 LIGAND.....	180
ANNEXE 3 :	185
CODE DU PROGRAMME DE RESOLUTION DES EXPERIENCES CINETIQUES POUR 2 LIGANDS	185
ANNEXE 4 : PUBLICATION : LOUIS ET AL., 2008, ACA 606, 37-44.....	191
ANNEXE 5 : PUBLICATION : NICOLAU ET AL., 2008, ACA 618, 35-42.	199
ANNEXE 6 :	207
SPECTRES DE FLUORESCENCES OBTENUS SUR LES ECHANTILLONS DE LA CAMPAGNE DE PRELEVEMENTS DE 2008 (CROATIE, RIVIERE KRKA).....	207
ANNEXE 7 :	209
CODE SOUS MATLAB UTILISE POUR INTEGRER LES EQUATIONS CINETIQUES	209
ANNEXE 8 : LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS REALISEES.....	211

Liste des abréviations

COD	Carbone Organique Dissous
DGT	Diffuse Gradient in Thin film
DPASV	Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry
DPV	Differential Pulse Voltammetry
E_{dep} ou E_{acc}	Potentiel de dépôt ou d'accumulation
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
ENH	Electrode Normale à Hydrogène
E_{pic}	Potentiel de réoxydation du pic
E_{scan}	Potentiel de balayage
ETM	Elements Trace Métalliques
FEP	Fluorinated Ethylene Propylene
GFAAS	Grafiic Furnace Atomic Absorption Spectroscopy
GPES	General Purpose Electrochemical System
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy
ISE	Ionic Selective Electrode
K	Constante de complexation
k_1	Constante d'association
k_{-1}	Constante de dissociation
L	Ligand
ML	Complexe 1 :1 Métal-Ligand
M_{lab}	Métal labile
MO	Matière Organique
MOA	Matière Organique Aquagénique
MOAnt	Matière Organique Anthropique
MOF	Matière Organique Fluorescente
MON	Matière Organique Naturelle
MOND	Matière Organique Naturelle Dissoute
MOP	Matière Organique Pédogénique
MOS	Matière Organique du Sol
MOSed	Matière Organique Sédimentaire
PFA	PerFluoroAlkoxy
PM	Poids Moléculaire
PROSECE	PRogramme d'Optimisation et de SpEciation Chimique dans l'Environnement
PSA	Potentiometric stripping analysis
PTFE	PolyTétraFluoroEthylène
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SAS	Substances Actives de Surface
SCP	Stripping ChronoPotentiometry
SMDE	Static Mercury Drop Electrode
SSV	Scanned deposition potential Stripping Voltammetry
SWV	Square Wave Voltammetry
UV	Ultra Violet
$W_{1/2}$	Largeur de pic à mi-hauteur

AVANT-PROPOS

Avant-propos

Depuis maintenant plusieurs décennies, les études montrant l'importance des métaux traces dans l'environnement se succèdent ne laissant plus de doute quant à la dangerosité de ceux-ci dans le milieu naturel notamment envers les organismes vivants, et par conséquent toute la chaîne alimentaire. Il est aussi aujourd'hui largement reconnu que la matière organique (MO) joue un rôle primordial sur la distribution/spéciation de ces métaux dans l'environnement aquatique. Cependant, dans un environnement aussi complexe que le milieu naturel, personne n'est encore en mesure de prédire le comportement de la matière organique naturelle (MON), et par conséquent celui des métaux traces, lors d'un changement des conditions du milieu (modifications des concentrations des espèces, du pH, de la salinité, ...).

A l'heure où la concentration atmosphérique de CO₂ ne cesse d'augmenter, entraînant par conséquent une baisse du pH des eaux naturelles, qu'elles soient douces ou marines, il est nécessaire de pouvoir prédire le comportement de la matière organique naturelle vis-à-vis des métaux traces. En effet, ceux-ci sont connus, dans les conditions actuelles, comme étant liés à plus de 90 % avec la matière organique en milieu marin, mais cette répartition pourrait significativement être modifiée par exemple par l'augmentation du CO₂ atmosphérique qui entraînerait une acidification des océans. Cet exemple parmi d'autres, illustre l'importance de mieux connaître les caractéristiques de la MON dans le milieu aquatique.

Parmi toutes les études concernant la MON, beaucoup traitent du comportement de MON extraite de sols ou d'eaux douces, mais beaucoup moins concernent les eaux marines. Cette constatation pourrait avoir comme simple explication les nombreux problèmes engendrés par la présence de sels dans le milieu marin pouvant entraîner de sérieux problèmes analytiques.

Ainsi, l'objectif du Groupement De Recherche MONALISA (Matière Organique Naturelle en milieu SALé), auquel est rattaché le Laboratoire PROTEE (PROcessus de Transfert et d'Echange dans l'Environnement), est de comprendre le rôle de la MON dans le cycle des contaminants, de caractériser la MON des eaux côtières (nature et structure) et est aussi de mettre en relation les caractéristiques avec les propriétés complexantes vis-à-vis des contaminants chimiques. Les données ainsi obtenues contribueront à l'évaluation et la modélisation de la biodisponibilité des cations métalliques.

Ainsi, dans le cadre de ce GDR, l'objectif de ce travail de thèse est principalement la mise en place d'une systématique permettant de caractériser les interactions de la MON dissoute vis-à-vis des contaminants métalliques par des paramètres de complexation pouvant être utilisés à la fois dans des logiciels de spéciation chimique et de transports de contaminants.

Notre étude sera principalement axée sur la MON marine et plus particulièrement la partie reconnue comme étant la plus réactive : la matière organique naturelle dissoute (MOND).

Le défi réside principalement dans la difficulté d'étudier la MOND dans l'environnement marin de part sa faible concentration et la complexité du milieu. Parmi les techniques existantes permettant de concentrer la MOND afin de rendre son étude plus aisée, aucune n'a à ce jour su se montrer suffisamment efficace afin de conserver l'intégralité de l'information portée par la MOND sans en modifier ses propriétés et/ou sa structure.

Le but visé dans ce travail est donc l'étude de la MOND, principalement marine ou estuarienne, et de ses interactions avec des contaminants métalliques directement dans son environnement d'origine et à des concentrations naturelles, sans lui faire subir de traitements physiques ou chimiques importants.

Le deuxième point important de l'étude, lié au point précédent, est donc la nécessité de travailler à des concentrations métalliques très faibles identiques à celles rencontrées dans le

milieu naturel. L'approche employée fait donc appel aux analyses de métaux à l'état de trace dans un environnement marin, l'emploi de techniques électrochimiques sera une approche de choix afin d'atteindre les concentrations proches de celles rencontrées dans le milieu naturel, encore une fois sans faire subir de traitements physiques ou chimiques importants à l'échantillon.

La thèse se présente autour de 4 grandes parties représentatives de la démarche suivie. La première étape a consisté en une mise au point bibliographique concernant les métaux traces et la matière organique naturelle, ainsi que les techniques couramment utilisées pour leur étude. Cependant, cette première partie ne saurait être une liste exhaustive de toutes les techniques utilisées dans la littérature, mais plutôt un aperçu permettant de mieux comprendre le problème posé, à savoir de pouvoir caractériser les interactions entre la matière organique naturelle dissoute (MOND) dans son état naturel et les métaux traces sans avoir à utiliser de traitements susceptibles de modifier la structure ou la réactivité de la MOND.

En réponse à la problématique posée, la seconde partie du travail concerne principalement la mise au point de l'appareillage, ainsi que de la technique analytique utilisée. Le but est donc ici de résoudre un maximum de problèmes, qu'ils soient liés au matériel utilisé ou à la technique analytique elle-même, empêchant jusqu'alors l'étude directe de la MOND et de ses interactions avec les métaux traces. L'objectif final est d'arriver à étudier directement un échantillon prélevé dans un écosystème naturel, sans lui faire subir d'étapes de pré-concentration ou encore de traitements physico-chimiques pouvant entraîner des modifications de la MOND. Une fois ce but atteint, un protocole analytique permettant d'étudier directement la MOND, à sa concentration naturelle, est proposé afin de déterminer ses paramètres de complexation, notamment vis-à-vis de contaminants métalliques présents à l'état de traces, nécessaires à l'utilisation de logiciel de spéciation et/ou transport métallique.

Ensuite, la troisième partie présente l'application et la validation du protocole précédemment mis en place, sur un échantillon naturel de MOND marine concentrée obtenu dans le cadre du groupement de recherche MONALISA. L'application du protocole mis en place sur cet échantillon a permis de déterminer les paramètres de complexation d'une MOND marine concentrée de la rade de Toulon vis-à-vis du cuivre, mais aussi de cations majeurs du fait que cet échantillon était très concentré en MOND. Ensuite ces paramètres une fois obtenus, ils ont été utilisés afin de modéliser directement la courbe de titration obtenue sur l'échantillon non concentré, ceci afin de valider le protocole de caractérisation mis en place, mais aussi le protocole de concentration de la MOND mis en place dans le GDR MONALISA.

Enfin, la dernière partie du travail a consisté à utiliser le protocole mis en place directement sur des échantillons naturels, obtenus lors de 2 campagnes de prélèvements en 2007 et 2008, provenant de l'un des estuaires les moins contaminés connus : Celui de la rivière Krka (Croatie). Le but est ici d'étudier les propriétés de complexation d'une MOND, à l'équilibre mais aussi d'un point de vue cinétique, vis-à-vis du cuivre dans une colonne d'eau estuarienne stratifiée verticalement, très peu contaminée en contaminants métalliques mais aussi très peu chargée en MOND. Ceci est réalisé afin de pouvoir prédire la réponse de la MOND, en terme de spéciation métallique et donc de toxicité envers les organismes du milieu, en cas de faible contamination de cet environnement.

CHAPITRE I :

GÉNÉRALITÉS

Chapitre I. Généralités

IA. Les métaux traces

Le terme de « métaux lourds » est une appellation courante qui n'a ni fondement scientifique, ni application juridique (Miquel G., 2001). On appelle en général métaux lourds, autrefois aussi appelés « métal pesant », les éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes, désignés dans la convention de Genève par une masse volumique supérieure à 4,5 grammes par cm³. Quarante et un métaux correspondent à cette définition générale auxquels il faut ajouter cinq métalloïdes (Ge, As, Sb, Te et Po).

Les métaux lourds sont présents dans tous les compartiments de l'environnement (atmosphère, eaux, et sols), mais en général en quantités très faibles. Parmi tous les éléments métalliques du système périodique, un grand nombre n'est présent qu'à l'état de « traces » (<100ppm dans les sols; Sigg L. *et al.*, 1992); ils sont aussi « la trace » du passé géologique et de l'activité de l'homme. La classification en « métaux lourds », ne reposant sur aucune base scientifique (Duffus J.H., 2002), est d'ailleurs souvent discutée car certains métaux toxiques ne sont pas particulièrement « lourds » comme par exemple le zinc, et de même certains éléments toxiques ne sont pas tous des métaux, l'arsenic par exemple.

Pour ces différentes raisons, la communauté scientifique préférera bien souvent à l'appellation de métaux lourds celle de « éléments en traces métalliques » (ETM) ou par extension « éléments traces » (Hirose K., 2006).

Le terme de métaux traces sera donc plus approprié que celui de métaux lourds dans le cadre de ce travail où les métaux analysés dans l'environnement naturel marin se retrouvent bien souvent uniquement à l'état de trace, voire d'ultra trace. C'est d'ailleurs à cause de ces très faibles concentrations de métaux dissous dans les eaux naturelles (de l'ordre de 1.10⁻⁹M) que même de très petites augmentations peuvent engendrer des effets critiques pour tout un écosystème.

IA1. Origines et rôles des métaux traces

Le comportement des métaux dans l'environnement est parfaitement décrit par la maxime du philosophe Anaxagore de Clazomènes (500–428 av. J.-C.), souvent reprise par Lavoisier « Rien ne se perd, rien ne se crée, tout se transforme ».

L'activité humaine n'a en effet apporté aucun changement dans les volumes de métaux traces, il n'y a ni création, ni suppression. La plupart des ETM se trouve initialement dans la croûte terrestre, cependant, le flux anthropogénique de ces éléments vers l'hydrosphère ou l'atmosphère dépasse souvent le flux naturel. Ces actions entraînent un changement de la répartition des métaux, de leurs formes chimiques (ou spéciation) et des concentrations par l'introduction de nouveaux modes de dispersion (fumées, égouts, voitures...).

IA1a) Les sources naturelles

Les métaux traces, pour la plupart, sont présents sous forme de minerais à l'état naturel, plus ou moins abondant suivant le type de roche (**Tableau I-1**), et sont diffusés par l'action humaine ou naturellement avec l'érosion. Les métaux traces présents à la surface du sol ne viennent cependant pas tous de la roche, puisqu'il peut y avoir cumul entre ce qui vient du sous-sol et ce qui est apporté par l'air, qui peut provenir de très loin (plomb dans les glaces des pôles par exemple).

Tableau I-1: Concentrations de quelques éléments traces dans la couche terrestre, une roche magmatique et une roche sédimentaire. Les unités sont en $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Alloway B.J. et Ayres D.C., 1993 ; Vignati D., 2004)

Eléments en traces	Couche terrestre	Roche Magmatique :	
		Granit	Roche sédimentaire : Argiles
Ag	0,07	0,04	0,07
As	1,5	1,5	13
Au	0,004	0,002	0,0025
Cd	0,1	0,09	0,22
Co	20	1	19
Cu	50	13	39
Hg	0,005	0,08	0,18
Mn	950	400	850
Mo	1,5	2	2,6
Ni	80	0,5	68
Pb	14	24	23
U	2,4	4,4	3,7
Zn	75	52	120

En règle générale, les métaux sont fixés dans les roches sous deux formes. Il y a d'une part les oxydes et silicates, peu altérables en climat tempéré, mais qui peuvent être libérés de la roche par érosion et/ou transportés tels quels dans les sols et sédiments. Et, il y a d'autre part les sulfures et carbonates, très altérables, qui sont attaqués chimiquement et qui permettent aux métaux de migrer. La partie soluble sera évacuée avec l'eau, dans les sols, les sédiments ou la nappe phréatique. Une partie sera piégée dans les argiles qui ont un fort potentiel de sorption (Wang W. *et al.*, 2007) ou encore dans les sédiments (Nicolau R., 2005). Cependant une remobilisation de ces métaux dans la colonne d'eau, grâce à des processus biogéochimiques (Ouyang T.P. *et al.*, 2006) peut aussi se produire, pouvant même entraîner une augmentation significative de leur concentration vers des niveaux toxiques pour les organismes aquatiques (Fichet D. *et al.*, 1998).

IA1b) Les sources anthropiques

La perturbation des cycles de nombreux éléments traces a pour origine l'activité humaine et l'industrialisation. Cette activité entraîne la libération des métaux traces au niveau des bassins versants et leur dépôt sur des surfaces imperméabilisées. Les principales sources anthropiques pouvant être identifiées sont les suivantes :

- La circulation automobile (gaz d'échappement, usures des pneus et pièces métalliques, érosion de la chaussée, carburant...)
- L'industrie par des rejets directs ou diffus (lessivage par les pluies)
- Produits en fin de vie (batteries, déchets stockés à l'air libre et soumis au lessivage,...)
- L'agriculture (produits phytosanitaires et engrais)

- L'activité métallurgique et minière
- Combustion des combustibles.
- ...

Ces activités peuvent entraîner, suivant les conditions du milieu, un changement rapide des concentrations en ETM (éléments en traces métalliques), que ce soit dans l'atmosphère, dans l'eau ou les sols. La migration des éléments traces dans les sols se fait d'autant plus facilement que ces derniers sont acides ($\text{pH} < 5$) ; ce qui est le cas d'environ 60% des sols du territoire français (Pedro G. et Scherer S., 1974). Ainsi, les ETM peuvent donc facilement être lessivés par les eaux de ruissellement et entraînés dans les rivières par l'intermédiaire des réseaux d'eaux pluviales (Nicolau R., 2005), puis jusqu'au milieu marin.

Les ETM sont généralement rencontrés à l'état de traces dans les eaux réceptrices, en partie du fait de leur faible solubilité et de la sédimentation des matières en suspension sur lesquelles est adsorbée la plus grande partie de ces éléments. Une grande partie des ETM rejetés se retrouvent ainsi dans les sédiments qui jouent le rôle de véritables pièges à métaux. Leur distribution entre la phase dissoute et la phase solide est alors régulée par des facteurs hydrodynamiques, des processus biogéochimiques, ainsi que les conditions physico-chimiques du milieu (Eggleton J. et Thomas K.V., 2004).

IA1c) Rôles et cycle des métaux traces

Les métaux traces peuvent être considérés comme des éléments omniprésents dans l'environnement. Ils circulent dans les différents réservoirs sous l'action de phénomènes naturels (altération des roches, éruptions volcaniques, embruns,...) mais aussi anthropiques.

Les ETM ne sont pas nécessairement toxiques. En effet, de nombreux métaux sont même nécessaires aux plantes, aux animaux et aux humains, chez qui ils interviennent au niveau des enzymes et du métabolisme sous formes d'oligoéléments et donc par définition, présents en très faibles quantités *i.e.* : Cu, Fe, Mg, Mn, Zn ... (Sarazin M. *et al.*, 2000). Cependant, une très petite marge de concentration existe entre les niveaux essentiels et toxiques. D'autres métaux traces par contre, dont la concentration dans l'environnement est considérablement accentuée par l'activité humaine, ne sont absolument pas nécessaires aux êtres vivants et ne produisent que des effets toxiques, *i.e.* : Pb, Hg, ... (Sigg L. *et al.*, 1992).

Les comportements de certains métaux traces, ou de leurs composés, ne sont pas encore bien élucidés, en particulier les paramètres permettant de modéliser les phénomènes de bioaccumulation ou de bioamplification. En effet, les formes chimiques des éléments métalliques, *i.e.* leur spéciation, sont souvent modifiées par les paramètres physico-chimiques ou les activités biologiques, ce qui rend la tâche d'autant plus difficile.

Dans l'environnement aquatique plus particulièrement, qui représente notre domaine d'étude, quasiment tous les métaux traces présents se répartissent entre les 3 compartiments abiotiques (**A-1** à **A-3**) présentés sur la **Figure I-1** (Branica M., 1990).

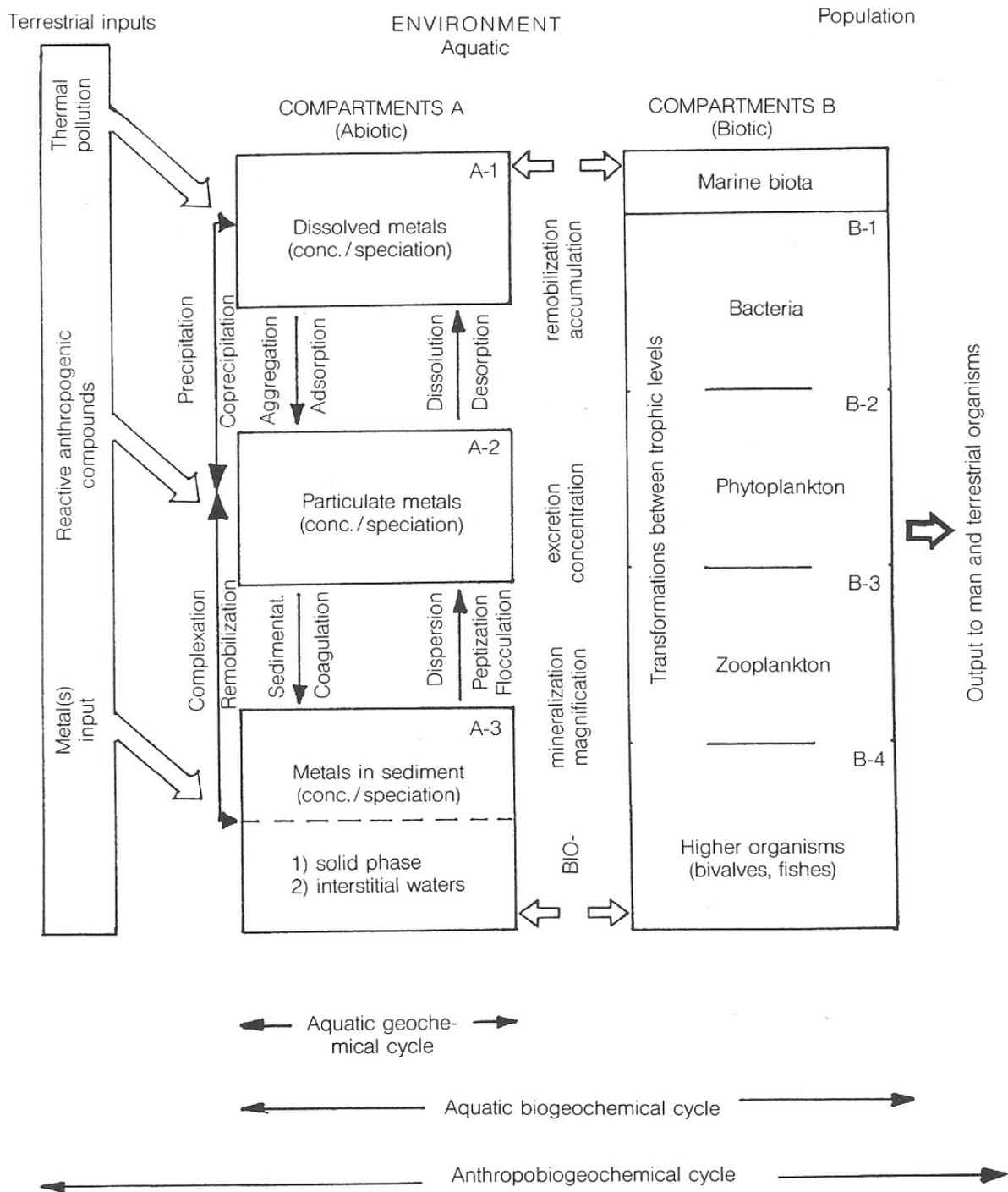


Figure I-1: Cycle des métaux traces dans l'environnement aquatique (Branica M., 1990)

Leur abondance relative dans chacun de ces compartiments est gouvernée par leurs caractéristiques physico-chimiques (*i.e.* leur spéciation), leur nature chimique et leur état d'équilibre. La complexité des échanges existants dans le système aquatique (schématisés sur la **Figure I-1**) peut plus ou moins rapidement conduire à des changements de la répartition des éléments métalliques selon les variations, aussi faibles soient elles, des caractéristiques physico-chimiques du milieu ou des concentrations en métaux de l'un des compartiments. Le terme de spéciation sera utilisé pour décrire la répartition (massique ou molaire) d'un ETM entre ses différentes formes chimiques dans un environnement donné. C'est cette spéciation

qui détermine la toxicité et la biodisponibilité d'un élément, et non sa concentration en ETM totale. Une grande variété de conditions environnementales (pH, salinité, agents de méthylation / chélation, ...) influent sur la spéciation de la plupart des métaux dans l'environnement (Eggleton J. et Thomas K.V., 2004).

Dans cette étude le compartiment étudié sera plus particulièrement celui des métaux dissous (**Figure I-1, A-1**), dans lequel ceux-ci interagissent très fortement avec la matière organique dissoute présente dans le milieu, bien qu'elle soit souvent présente à de très faibles concentrations.

IA2. Métal principalement étudié dans ce travail : Le cuivre

IA2a) Historique

Le cuivre est un des rares métaux qui existe à l'état natif ; ceci explique d'ailleurs sûrement qu'il fut le premier métal utilisé par les hommes il y a plus de 5000 ans ; des pendentifs datant d'environ 8700 avant JC auraient même été retrouvés au Nord de l'Irak selon l'association « Copper Development Association ».

L'occurrence du cuivre natif est cependant assez faible ; on le trouve d'ailleurs plus fréquemment sous forme de sulfure (la Chalcosite : Cu_2S ; la Bornite : Cu_5FeS_4 ; la Chalcopyrite : CuFeS_2 ; la Covellite : CuS), de sulfo-sel (l'Enargite : Cu_3AsS_4) ou encore d'oxyde (Cuprite : Cu_2O) (Chaumeton H. *et al.*, 1987). Le cuivre est principalement produit par broyage des minerais sulfurés, enrichissement par flottation ou par lessivage acide des minerais oxydés suivi d'une fusion et d'un raffinage électrolytique ou thermique (Ineris, 2005).

Le cuivre est l'un des 3 métaux le plus utilisé dans le monde. Pour 2009, le Groupe d'Etude International du Cuivre (ICSG) table sur une production mondiale de cuivre raffiné de 19,9 millions de tonnes, ce qui représente une augmentation de 7% par rapport à 2008. Les principaux producteurs de cuivre raffiné étaient en 2008 l'Asie (36,6 %) et l'Amérique latine (20,1 %), et à noter qu'en Europe, le principal producteur de cuivre est la Pologne, avec 4% de la production mondiale toujours selon l'ICSG.

IA2b) Utilisation

Le cuivre, de part ces propriétés physico-chimiques, est utilisable pour de nombreuses applications. Par exemple, les canalisations de distribution d'eau, la fabrication de la bière, la distillation de l'alcool, la confection de confiture ou encore dans la fabrication des fromages à pâte cuite.... (ICSG).

Les sels de cuivre, comme le sulfate ou l'oxychlorure, présentent quant à eux des propriétés fongicides mises à profit pour la viticulture et l'agriculture depuis plus de 100 ans (Flores-Veles L.M. *et al.*, 1996). Il est aussi utilisé dans la métallurgie, dans les fabrications d'alliages de bronze (avec de l'étain), de laiton (avec principalement du zinc) ou de joaillerie (avec de l'or ou de l'argent).

Il est de plus largement utilisé dans les appareils électriques à cause de son excellente conductivité électrique ($59,6 \times 10^6 \text{ S.m}^{-1}$) ; parmi les métaux, seul l'argent possède une meilleure conductivité électrique ($63 \times 10^6 \text{ S.m}^{-1}$), mais il est beaucoup moins employé de part son coût beaucoup plus élevé.

Le chlorure cuivrique est employé comme catalyseur, agent désodorisant, désulfurant ou purifiant, fixateur pour la photographie ; mais aussi pour la production de couleur en pyrotechnie ou encore pour la conservation du bois et le raffinage des métaux. Le cuivre peut encore être utilisé comme pigments dans les céramiques (Fernandez F. *et al.*, 1998) ou bien dans des teintures.

Concernant maintenant les applications marines, qui nous intéressent plus particulièrement, sa résistance à la corrosion, ou encore ses propriétés toxiques permettant d'empêcher la prolifération et la fixation d'algues et d'organismes marins, en font un métal de choix dans la composition des coques de navire et plus particulièrement dans leurs peintures anti-fouling. Depuis la restriction de l'utilisation du TBT (TriButylTin) au niveau international, sur les bateaux d'une longueur inférieure à 25m (European Community, 1989) dans les peintures anti-fouling (Schiff K. *et al.*, 2004), le cuivre, combiné à d'autres biocides, a alors été de plus en plus utilisé. Ceci a malheureusement entraîné une augmentation des concentrations de cuivre, notamment dans les marinas et les ports (Konstantinou I.K. et Albanis T.A., 2004) où il peut aussi entraîner un effet toxique sur des organismes non ciblés par la peinture utilisée (Karlsson J. et Eklund B., 2004 ; Koutsaftis A. et Aoyama I., 2007).

IA2c) Propriétés biologiques et toxicité

On sait que le cuivre est un élément essentiel chez l'homme comme chez l'animal ; il s'agit d'un oligo-élément indispensable à la vie à de faibles concentrations (Chester R., 2000). Il est impliqué dans de nombreuses fonctions de l'organisme, comme la formation de l'hémoglobine ou encore la réponse immunitaire (Huang Z.L. et Failla M.L., 2000). De même, chez les mollusques, le cuivre est impliqué dans un pigment respiratoire, appelé l'hémocyanine, permettant le transport de l'oxygène dans le sang (Decker H. *et al.*, 2007). Il est aussi un cofacteur spécifique de nombreuses enzymes et métalloprotéines intervenant dans le métabolisme oxydatif, la respiration cellulaire ou encore la pigmentation (OMS-IPCS, 1998).

De très nombreuses études ont déjà montré, que ce soit sur les végétaux ou sur des espèces marines, que de faibles, voire de très faibles concentrations de métal (pouvant même aller jusqu'à seulement quelques nano-molaires de métal total) peuvent suffire pour entraîner de graves modifications des espèces présentes dans l'environnement. Ces modifications se traduisent par exemple, soit par des problèmes de croissance de l'espèce (Jiang W. *et al.*, 2001 ; Nimmo D.W.R. *et al.*, 2003 ; Sheldon A.R. et Menzies N.W., 2005), ou encore, dans le pire des cas, la disparition de celle-ci au profit d'espèces un peu moins sensibles (Contreras L. *et al.*, 2007). La forte sensibilité de certaines espèces, et notamment certaines bactéries, a aussi pu être utilisée dans certaines études en temps qu'outil analytique, afin d'évaluer la biodisponibilité du cuivre pour des concentrations proches de celles de directives employées dans de nombreux pays dans les eaux douces, c'est-à-dire à des concentrations de l'ordre de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ (Davies C.M. *et al.*, 1998).

Les effets négatifs du cuivre en excès ont aussi pu être largement mis en évidence dans un environnement naturel (Nord du Chili), où toute la communauté benthique a été affectée par les déchets d'une mine de cuivre (Andrade S., *et al.*, 2006 ; Castilla J.C., 1996 ; Medina M. *et al.*, 2005).

Les effets néfastes du cuivre sont essentiellement dus à la forme de celui-ci dans le milieu. A titre d'exemple, une limite de toxicité du cuivre libre (Cu^{2+}), envers les micro-organismes marins, a été définie par Sunda W.G. *et al.*, en 1987, à une concentration de $10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$. Depuis, plusieurs études ont montré que les concentrations en cuivre total ou même en cuivre

libre n'étaient pas responsables de la toxicité de celui-ci, mais qu'il fallait plutôt s'intéresser à la fraction dite labile qui est, elle, biodisponible pour la plupart des espèces et qui permet de réellement établir une corrélation entre toxicité et concentration (Davies C.M. *et al.*, 1998 ; Lorenzo J.I., *et al.*, 2006).

IA2d) Le cuivre et la Matière Organique Naturelle

Le cuivre dans le milieu naturel se retrouve souvent lié à la Matière Organique Naturelle (MON). L'étude des interactions du cuivre avec la MON a commencé dans les années 1970 avec les premières mesures de capacités complexante (Chau Y.K. *et al.*, 1974) ; celles-ci représentent des quantités de métaux pouvant être liés à la MON d'un échantillon. Cette mesure reflète en fait la capacité de la matière organique à accumuler du métal, et est donc de très grande importance dans l'évaluation de la quantité de métal potentiellement libérable d'un environnement lors d'un changement de conditions physico-chimiques.

Depuis, ces mesures de capacités complexantes dans les eaux naturelles sont devenues incontournables dans les études de spéciation chimique des éléments traces métalliques dans l'environnement. Toujours dans les années 70, il a été mis en évidence que la toxicité du cuivre était principalement due à sa forme libre en solution (Sunda W.G. et Guillard R.R.L., 1976) et que la présence d'agents chélatants réduisait la toxicité du cuivre dans l'environnement étudié (Anderson D.M. et Morel F.M.M., 1978). Depuis, les métaux les plus bioactifs comme le fer (III) ou le cuivre sont reconnus pour exister à plus de 99% sous forme de complexes organiques (Kogut M.B. et Voelker B.M., 2001 ; Sunda W. et Guillard R.R.L., 1976). Contrairement aux ligands inorganiques (chlorures, sulfates, nitrates, carbonates,...) pour lesquels les constantes de complexation thermodynamiques sont a priori connues et intégrées dans les logiciels de calcul de spéciation (MINEQL, PHREEQC, ...), celles des complexes organiques, de part leur diversité, le sont beaucoup moins. C'est pourquoi la détermination de la spéciation des métaux traces, notamment dans le milieu naturel est difficile. Ainsi, pour le milieu marin, les complexes du cuivre formés avec la matière organique dissoute, présentent des constantes de stabilité pouvant aller de 10^9 à 10^{15} M^{-1} (Hirose K., 2006) ; ces constantes de stabilité sont représentatives de la force avec laquelle le métal est lié à la MON.

La forte affinité du cuivre envers la MON n'est donc plus à redémontrer. Cependant les propriétés de la MON régissant les interactions entre celle-ci et le cuivre ne sont pas encore totalement identifiées et sont encore à la source de nombreux problèmes environnementaux. C'est pourquoi l'étude et la caractérisation des interactions du cuivre avec la matière organique demeure encore de nos jours importante, afin de mieux comprendre le comportement de celui-ci dans un environnement naturel, et de prévoir l'évolution de sa concentration lors de changement des conditions physico-chimiques du milieu naturel (eaux estuariennes, pluies acides ...).

IB. La Matière Organique Naturelle (MON)

Le terme de matière organique naturelle (MON) est normalement utilisé pour désigner l'ensemble des matières organiques d'un écosystème naturel autre que les organismes vivants et les composés d'origine humaine (Filella M., 2008). Elles sont principalement issues de la décomposition des végétaux, des animaux et des micro-organismes. La MON possède donc une grande variété de propriétés et de constituants propres au milieu naturel où elle se situe (Stevenson F.J., 1994).

Les constituants de la MON ne sont, à ce jour, toujours pas tous structurellement identifiés ; dû à la diversité des processus de synthèse et de dégradation naturels, le nombre de constituants de ce mélange peut être considéré comme infini (Filella M., 2008). Il est donc difficile d'en donner une description précise ou une structure définie. C'est pour cela que la grande majorité des études menées sur la MON reposent sur une caractérisation de groupes de constituants de propriétés voisines plutôt qu'une caractérisation exacte.

La matière organique naturelle peut être responsable de la couleur, de l'odeur ou du goût de l'eau, mais sa propriété la plus intéressante d'un point de vue environnemental est sa grande affinité pour de nombreux éléments en trace métalliques (ETM) (Bruland K.W. *et al.* 1991 ; Buffle J., 1988). Selon les cas, les métaux peuvent ou se lier à la MON et alors être sous une forme peu biodisponible, ou dans d'autres cas, être libérés de la MON vers le milieu naturel provoquant alors une possible contamination du milieu.

IB1. Origine et propriétés de la Matière Organique Naturelle

IB1a) Origine de la MON

La MON se retrouve dans la plupart des milieux naturels (Buffle J., 1988) qu'ils soient :

- Terrestres (Mac Carty P., 2001) où elle prendra plutôt le nom de Matière Organique du Sol (MOS), produite essentiellement par la décomposition des plantes ;
- Aquatiques (Patel N. *et al.*, 2004 ; Vetter T.A. *et al.*, 2007) où elle sera plutôt appelée Matière Organique Pédogénique (MOP) ou Aquagénique (MOA) selon qu'elle soit d'origine terrestre ou aquatique, ou encore Sédimentaire (MOSed) si elle se trouve dans les sédiments;
- Anthropiques (MOAnt) comme dans les stations d'épuration (Imai A. *et al.*, 2002) ou les décharges (Kang K-H. *et al.*, 2002), produite par l'activité humaine.

Elle peut se définir à la fois comme l'élément et le produit majeur des processus biogéochimiques contrôlant ces milieux. En effet, elle possède un rôle essentiel et maintenant largement reconnu dans la disponibilité et la mobilité de nombreux constituants (Aoustin E. *et al.*, 2001 ; Cabaniss S.E. et Shuman M.S., 1988 ; Ma. H. *et al.*, 2001).

Elle tient, de plus, un rôle primordial dans l'activité micro et macro biologique d'un milieu. En effet, les composés organiques dissous et/ou particuliers se décomposent sous l'action de micro-organismes et constituent alors, pour l'ensemble du monde vivant, la matière première nécessaire à l'élaboration de nouveaux éléments biologiques qui seront à leur tour décomposés.

Cependant, toute MON possède une origine et une composition propres à son environnement. Les processus inhérents à un milieu donnent à la MON, par des apports et des mécanismes

spécifiques, des caractéristiques particulières responsables de sa réactivité unique. Ainsi, dans un environnement aquatique par exemple, la MON issue de débris végétaux ou de la dégradation de la biomasse des sols conduit à un apport « allochtone » auxquels peuvent être ajoutés les composés synthétiques issus des activités humaines produisant elles un apport « anthropique » (Seritti A. *et al.*, 1994). De même, l'activité biologique (photosynthèse, activité bactérienne, dégradation...), du milieu étudié, induit elle un apport dit « indigène » ou « autochtone ». Chaque environnement se compose alors de ces divers apports mais sous des proportions et des qualités variables.

La MON Dissoute (MOND) marine quant à elle, définie par son seuil de coupure (partie suivante), est une composante majeure de la MON et représente la partie la plus réactive du cycle du carbone global (Hedges J.I., 1992). Elle est produite majoritairement *in situ* (origine aquagénique) par l'accumulation et la dégradation successive des produits synthétisés par le phytoplancton marin (Biddanda B. et Benner R., 1997 ; Carlson C.A., 2002 ; Lorenzo J.I. *et al.*, 2007), et seulement 10% est d'origine pédogénique (Druffel E.R.M. *et al.*, 1992) en milieu océanique, provenant par exemple de l'écoulement d'eau de pluie sur de la MO de sols, elle-même originaire de la décomposition de plantes par les bactéries ou encore les champignons. Le mécanisme de production de MOND marine inclut l'exsudation directe par le phytoplancton marin, l'autolyse cellulaire en réponse à des conditions de stress nutritif ou encore la mort cellulaire, et une libération liée à un processus de broutage inefficace du zooplancton (Buffle J., 1988 ; Nagata T., 2000). De plus, des processus photochimiques et de respiration bactérienne, mieux connus sous le nom d'humification ou polymérisation (Hedges J.I., 1988 ; Kieber R.J. *et al.*, 1997), donnent lieu à une série de transformations complexes de la MOND.

L'étude et l'identification des divers constituants d'une matrice organique constituent une tâche bien délicate de par leur nombre et leur hétérogénéité, c'est pourquoi de nombreuses techniques analytiques et procédures opératoires ont été développées.

IB1b) Propriétés de la MON

Malgré l'extrême hétérogénéité de la MON ; il est tout de même possible de distinguer systématiquement des composés caractérisables (biopolymères : acides aminés, protéines, lipides, sucres, polysaccharides (Croué J.P. *et al.*, 2003)) et des groupes de composés réfractaires non caractérisables (géopolymères : substances humiques, humine,...), représentant de 70 à 90% de la MON suivant le protocole d'extraction utilisé. En effet, les substances humiques sont des composés de haut poids moléculaires élaborés par les micro-organismes du sol et des eaux. Elles sont majoritairement représentées dans les eaux par les acides humiques, dérivés de la lignine et insolubles à pH = 2, et les acides fulviques, provenant de la cellulose et solubles sur toute la gamme de pH. Ces substances constituent la plus grosse partie des MOND ; ce sont des molécules qui possèdent une grande variété de groupements fonctionnels ainsi qu'une forte affinité pour les ions métalliques (Thurman E.M., 1985 ; Voelker B.M. et Kogut M.B., 2001) ce qui en fait des molécules incontournables dans les études de spéciation de l'environnement naturel.

Que ce soit dans les sols, où la MOND représente la forme la plus active et la plus mobile de Matière Organique du Sol (MOS) (Corvasce M. *et al.*, 2006), ou dans les eaux naturelles, la MOND peut dominer la spéciation des métaux traces, et ainsi contrôler la toxicité et la biodisponibilité de ceux-ci.

Deux principaux types de groupements fonctionnels sont connus pour avoir une forte importance vis-à-vis de la complexation avec le proton ou les métaux : les groupements carboxyliques et phénoliques, qui ont des pKa autour de 4,5 et 10 respectivement. Les sites caractérisés comme phénoliques peuvent aussi inclure d'autres fonctionnalités comme les amines ou les amides (Lu Y. et Allen H.E., 2002).

Lorsque l'on considère le volume total des océans, la MOND peut être considérée comme étant abondante. Elle est composée approximativement de 50% en masse de carbone (Vetter T.A. *et al.*, 2007) et représente le plus gros réservoir de carbone dans les eaux naturelles. Elle se retrouve malgré tout, fréquemment à des concentrations inférieures à 1 mg de carbone dissous par litre d'eau de mer (Hansell D.A., 2002), soit 83 $\mu\text{mol}_C \cdot \text{L}^{-1}$, ce qui est un obstacle majeur pour son étude.

Pour pallier à ceci, il est nécessaire de la concentrer ou de l'extraire du milieu marin sans dénaturer sa structure ou modifier ces propriétés, ce qui n'est pas facile (Vetter T.A. *et al.*, 2007).

Au cours de cette étude, nous différencierons la MOND de la matière organique particulaire, par un seuil de coupure, quelque peu arbitraire mais universellement reconnu, de $0,45\mu\text{m}$ (Louis Y. *et al.*, 2008 ; Mariot M. *et al.*, 2007 ; Vignati D., 2004 ; Zsolnay A., 2003) permettant principalement, à l'exception du cas des colloïdes, d'éliminer les particules en suspension de la phase dissoute (Figure I-2).

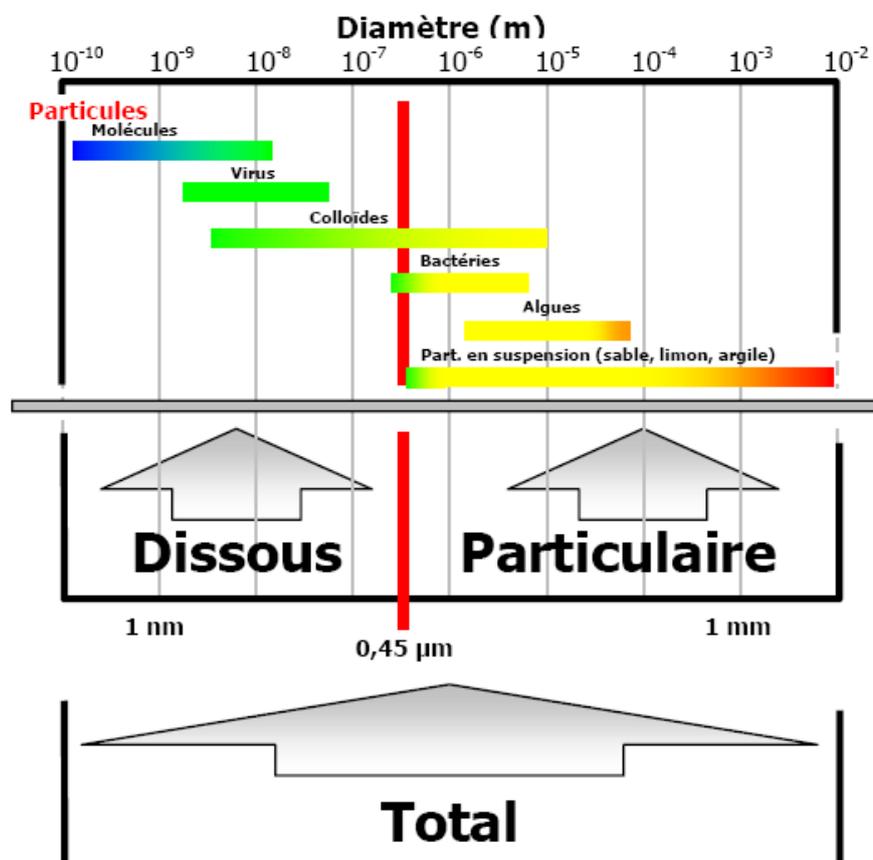


Figure I-2 : Schéma représentatif de la répartition des différentes tailles de particules dans le milieu aquatique ; séparation du dissous et du particulaire à $0,45\mu\text{m}$

Dans cette étude, la fraction de particules fines de type colloïdal, non retenue par la filtration à 0,45 µm, se retrouvant ainsi dans la fraction dissoute, sera intégralement assimilée à de la MOND.

IB2. Caractérisation et modélisation des propriétés de la MON

La MOND représente dans l'océan l'un des plus grand réservoir de carbone bioactif (Hansell D.A., 2002) ; depuis maintenant plusieurs décennies sa forte affinité reconnue pour les métaux traces en fait un sujet de recherche très répandu (Moffett J.W. *et al.*, 1997 ; Tang T. *et al.*, 2001). Cependant, comparativement aux études menées sur la MON issue d'eaux douces, d'eaux interstitielles ou encore de sols/sédiments, et malgré l'importance reconnue de la MOND dans le milieu environnemental (Hansell D.A. et Carlson C.A., 2002), peu d'études dans la littérature concernent la MOND marine dû à la difficulté de l'extraire de son environnement naturel, où elle se retrouve en très faible concentration.

IB2a) Techniques de concentration de la MON

Afin de pallier à la faible concentration de la MOND dans le milieu aquatique, et de rendre la MOND analysable, de nombreux chercheurs font appel à différentes techniques de concentration/extraction de la MOND plus ou moins efficaces.

Les techniques faisant intervenir des résines non ioniques de type XAD sont couramment utilisées par l'IHSS (International Humic Substance Society) afin d'isoler les acides humiques et fulviques à partir d'échantillons d'eaux naturelles. Cependant, cette méthode d'isolation basée sur la méthode de Thurman E.M. et Malcolm R.L. (1981) est sélective et ne permet d'isoler que les acides organiques hydrophobes. Parmi les dernières techniques développées pour concentrer la MOND, on peut citer la technique d'évaporation rotative à faible température (Thacker S.A. *et al.*, 2005), utilisée pour concentrer encore une fois des eaux douces et qui a l'avantage d'éviter de passer l'échantillon à des pH ou des températures extrêmes. Cependant, celle-ci ne permet toujours pas de conserver l'intégralité de la MOND initiale (Gondar D. *et al.*, 2008) (70 à 89 %) principalement dû à la précipitation des carbonates de calcium en fin de concentration conduisant à l'adsorption ou la co-précipitation d'une partie de la MOND.

Parmi les techniques utilisées, de nombreuses font appel à des techniques membranaires comme l'ultrafiltration (Benner R. *et al.*, 1992 ; Lu Y. et Allen H.E., 2006), l'osmose inverse (Serkiz S.M. et Perdue E.M., 1990 ; Domingos R.F. *et al.*, 2004), la nanofiltration (Her N. *et al.*, 2008), Toutes ces techniques membranaires ont comme principal inconvénient des pertes souvent sélectives et importantes, notamment des molécules de faible poids moléculaire (<1kD) (Kim S. *et al.*, 2003). Malheureusement, la diminution du seuil de coupure, pour retenir le maximum de MOND, engendre, de plus, une rétention des sels qui rend d'autant plus difficile l'utilisation de cette technique sur les eaux marines.

C'est une des raisons pour lesquelles, on ne rencontre que très peu d'études traitant de la complexation de métaux avec de la MOND dans le milieu marin.

Plus récemment, le couplage de 2 techniques, comme l'osmose inverse et l'électrodialyse (Vetter T.A. *et al.*, 2007), ou encore l'osmose inverse et la nanofiltration utilisées dans le cadre du GDR MONALISA lors de notre étude, a été utilisé afin de concentrer efficacement la MOND marine.

Les techniques les plus courantes d'extraction/purification de MOND d'eau marine obtiennent bien souvent au mieux un recouvrement de l'ordre de 30 à 35 % en poids de la quantité de Carbone Organique Dissous (COD) (Aluwihare L.I., *et al.*, 1997 ; Benner R., 2002 ; Rapport intermédiaire du GDR MONALISA, 2006), pouvant mener à une mauvaise détermination des propriétés de la MOND naturelle par rapport à la MOND extraite. C'est pourquoi, dans notre étude, un des buts sera de s'affranchir de ces étapes de concentration afin de travailler directement sur l'échantillon naturel, et donc sur la totalité de MOND présente dans le milieu en minimisant ainsi au maximum toute modification/dénaturation de l'échantillon de MOND.

IB2b) Les interactions Matière Organique Naturelle (MON)-Métaux traces

Depuis les années 70, les études de spéciation réalisées par de nombreux chercheurs ont pu mettre en évidence des phénomènes d'interaction de métaux traces avec du matériel organique dans les eaux naturelles. On peut cependant trouver des études encore plus anciennes datant des années 50, comme celle de Fogg C.E. et Westlake D.F. (1955) où il est mis en évidence un phénomène de complexation et détoxification du cuivre par des polypeptides extracellulaires d'une culture de cyanobactéries *Anabaena cylindrica*.

La MON, et plus particulièrement la MOND marine, dans le cadre de notre étude, reste à ce jour peu caractérisée (Benner R., 2002). Depuis de nombreuses années les interactions de la MOND avec les métaux traces sont majoritairement définies par 2 types de ligands (ou sites) désignés par L1 et L2. L'existence physique de ces 2 types de ligands n'est cependant pas prouvée (Town R.M. et Filella M., 2000a); en effet une répartition d'une multitude de sites de complexation avec des forces et des concentrations différentes est plus probable (Buffle J., 1988).

Pour décrire cette répartition, plusieurs types de modélisation de la MON, du plus simple au plus sophistiqué, ont été élaborées dans le but de prédire la spéciation chimique des ETM dans les eaux naturelles en présence de MOND.

IB2c) Principales Techniques de caractérisation

Afin de caractériser la MOND, différentes approches peuvent être utilisées.

Une approche quantitative permettra par exemple de déterminer la composition atomique (CHNS), les proportions d'acides humiques / fulviques, composés hydrophobes / hydrophiles..., la concentration massique (COD)... ; alors qu'une approche fonctionnelle par des techniques comme l'IRTF, l'UV, la RMN ou dernièrement, la ESI-FTICR-MS (electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry ; Sleighter R.L. et Hatcher P.G., 2008) ... pourront éventuellement permettre de caractériser une MOND suivant sa composition moléculaire et la présence de groupements spécifiques.

Enfin, une approche d'analyse de propriétés spécifiques comme la quantité de sites acides, de sites complexants métalliques, comme dans le cas de cette étude, pourront apporter des informations complémentaires nécessaires à la compréhension du comportement de la MOND vis-à-vis des métaux traces dans le milieu naturel.

Dans cette étude, le terme caractérisation sera utilisé uniquement d'un point de vue spécifique, toute caractérisation structurale étant écartée et seule la quantité de COD nécessaire dans cette étude sera utilisée en temps qu'analyse quantitative.

IB2c(1) Techniques de linéarisation

La méthode de quantification des propriétés de complexation de la MOND des eaux naturelles la plus simple a été mise au point par Chau Y.K. et Lum-Shue-Chan K. (1974). Cette méthode consiste à estimer une capacité complexante notée « CC », représentant la quantité du métal masqué à l'analyse par la complexation du milieu. Cette technique repose sur une estimation globale de concentration en ligands dans le milieu par extrapolation de la partie linéaire de la courbe $[M]_{\text{mesuré}} = f[M]_{\text{ajouté}}$ obtenue pour des ajouts croissants de métal (**Figure I-3**).

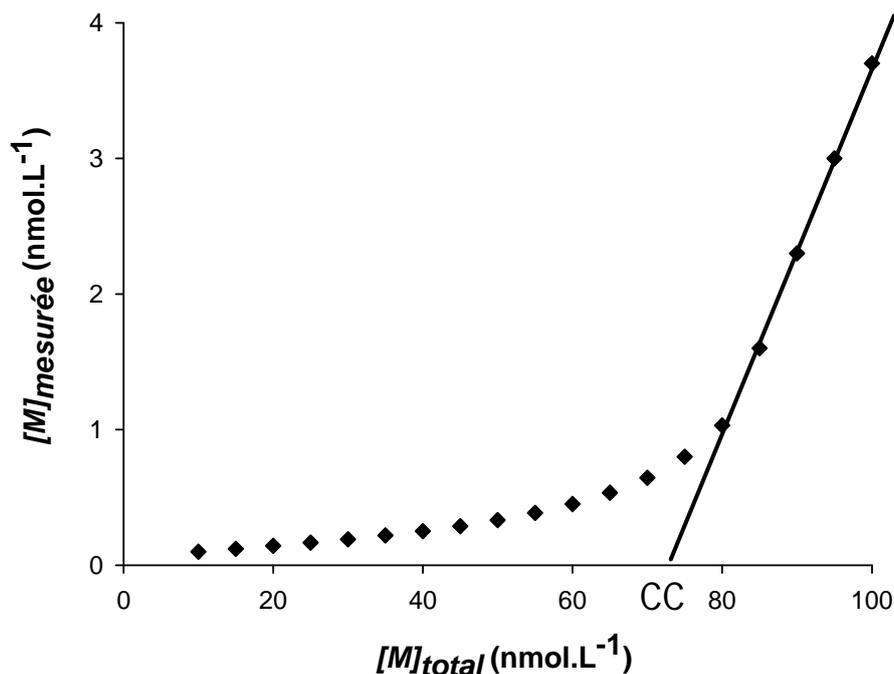


Figure I-3 : Détermination de la Capacité complexante selon la méthode de Chau

Les valeurs obtenues par cette méthode de linéarisation ne permettent pas de caractériser directement la MOND ; cette méthode permet, en effet, d'estimer seulement la capacité complexante de l'échantillon, mais pas la constante de complexation associée à cette capacité complexante comme les méthodes développées par la suite. Cette méthode est donc surtout utilisée pour comparer les caractéristiques d'échantillons analysés dans des conditions identiques.

D'autres techniques de linéarisation ont alors été développées, basées sur une étude théorique des équilibres (1 : 1) de complexation mis en jeu (Buffle J., 1981 ; Ružić I., 1982 ; Scatchard G., 1949 ; Van den Berg C.M.G., 1982 a et b, 1984), et permettent de déterminer à la fois les concentrations en sites ainsi que les constantes de complexation associées pour 1 ou 2 ligands. De part leur simplicité d'utilisation, la méthode de linéarisation de Scatchard (Scatchard G., 1949 ; Mantoura R.F.C. et Riley J.P., 1975 ; Ružić I., 1982) et celle de Langmuir/Ružić/van den Berg (Ružić I., 1982 ; Van den Berg C.M.G., 1982 a et b) sont encore beaucoup utilisées de nos jours, par exemple pour les déterminations des concentrations en ligands et des constantes de stabilité du cuivre (Buck T.K.N. et Bruland K.W., 2005). Dans le cas où il n'y a qu'une seule classe de ligands, la transformation conduit à une droite ; et s'il y a 2 classes de ligands, la linéarité n'est alors plus observée. Dans tous les cas ces méthodes se limitent à 2

classes de ligands ; s'il y a d'autres ligands présents ils ne pourront malheureusement pas être mis en évidence.

Dans les études actuelles, visant à caractériser les interactions MON-métaux, proton et/ou cations majeurs, les méthodes de linéarisation, bien que toujours utilisées, se retrouvent de plus en plus remplacées par des méthodes basées sur des programmes d'optimisation spécifiques prenant en compte un maximum de conditions chimiques du milieu grâce à un calcul de spéciation. En effet, il a été montré que ces techniques de linéarisation peuvent conduire à des erreurs importantes sur les paramètres déterminés (Garnier C. *et al.*, 2004b). Les approches utilisées sont toutefois différentes qu'il s'agisse d'une modélisation continue ou discrète des propriétés de la MON.

IB2c(2) Approche continue et approche discrète

Les techniques de linéarisation précédentes ne sont donc plus adaptées pour simuler le comportement d'une MON, car ne pouvant prendre en compte plus de deux classes de ligands et conduisant à d'importantes erreurs dans la détermination des paramètres (Garnier C. *et al.*, 2004b). De plus, ces techniques ne permettent pas d'étudier des effets de compétitions et ne prennent pas toujours en compte la spéciation inorganique. De par la complexité de la MON, il est impossible de représenter sa structure par des molécules organiques simples de caractéristiques connues. C'est pourquoi la MON est plutôt représentée par des classes de groupes de ligands « virtuels », donc de structure chimique non définie caractérisés par plusieurs propriétés.

Il existe différents modèles d'équilibres chimiques permettant de modéliser, avec leurs avantages et inconvénients, le comportement d'une MON (Dudal Y. et Gérard F., 2004). Ces différentes approches peuvent être regroupées dans deux principaux types de distribution de sites, appelés approche « continue » et approche « discrète », permettant chacune de prévoir la spéciation des éléments considérés dans l'environnement.

IB2c2(a) Approche continue

Comme son nom l'indique, ce modèle est ainsi appelé à cause de la représentation continue utilisée pour modéliser les propriétés de complexation de la MON (**Figure I-4**). La MON étant considérée comme ayant une variabilité infinie de ses propriétés de complexation, il semblerait donc légitime d'utiliser un modèle décrivant ces propriétés par un continuum. Il faut alors, afin d'obtenir une modélisation correcte, définir pour chaque MON et vis-à-vis de chaque élément (métal, cation majeur, proton, ...) une courbe d'affinité de la MON avec les métaux $f(\log(K))$ définissant un taux d'occupation des sites de complexation ou d'acidité au cours d'une titration. La modélisation de la MON vise alors à déterminer les paramètres de cette fonction mathématique simulant la distribution de chacun des ligands de la MON.

Cependant, dans la pratique, les données expérimentales sont rarement assez précises pour atteindre ce but. Les études menées par Dzombak D.A. *et al.* (1986), Fish W. *et al.* (1986) et Perdue E.M. et Lytle C.R. (1983) ont montré qu'une distribution normale de ligands pouvait être définie pour représenter les affinités d'une MON. Celle-ci est assimilée à une surface, les interactions vis-à-vis d'un élément étant alors définies par une isotherme de type Langmuir. Pour cela, une (métal, cation) ou deux (proton) fonctions gaussiennes sont utilisées. L'équation mathématique de cette distribution ne repose alors que sur un nombre restreint de paramètres à optimiser (3 par fonction normale) pour simuler les données expérimentales et donc les interactions analysées.

L'utilisation de ce type de modèle, au niveau où il est développé ici, est assez simple et ne requiert pas de logiciel élaboré ; un simple outil d'optimisation suffira à l'optimisation de ces paramètres.

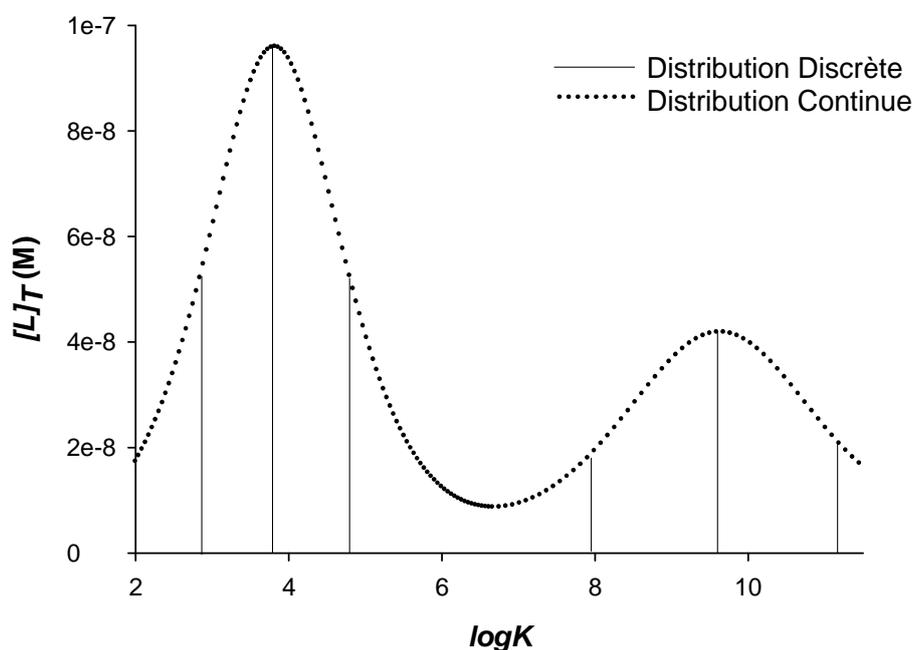


Figure I-4 : Distribution continue (bimodales) et discrète (6 sites)

Une MON sera donc représentée par plusieurs fonctions, chacune étant spécifique à un élément (Benedetti M.F. *et al.*, 1996 ; Kinniburgh D.G. *et al.*, 1999 ; Milne C.J. *et al.*, 2001 ; Ritchie J.D. et Perdue J.M., 2003). La **Figure I-4** présente une distribution continue simulant les interactions entre le proton et une MON hypothétique. Les deux fonctions gaussiennes sont respectivement centrées sur les sites de type carboxyliques et phénoliques, comme cela est souvent observé sur les MON.

Le modèle continu le plus utilisé et abouti, que nous retrouvons couramment dans la littérature, est le modèle NICA-Donnan (Kinniburgh D.G. *et al.*, 1996). Ce modèle se compose en fait de 2 parties : le modèle NICA (Non Ideal Competitive Adsorption, Koopal L.K. *et al.*, 1994) qui décrit les liaisons spécifiques qui ont lieu entre les cations et la surface chargée négativement de la MON par une distribution continue de sites d'affinités, et le modèle Donnan (Benedetti M.F., 1995), qui permet de décrire les liaisons non spécifiques, c'est-à-dire des liaisons coulombiennes existant entre les cations et une charge globale négative résiduelle présente sur la MON.

IB2c2(b) Approche discrète

A l'inverse de l'approche continue, et comme son nom l'indique, l'approche discrète repose sur la modélisation des propriétés de la MOND par une distribution discrète de ligands. Cette approche permet donc aussi de caractériser la complexation d'un mélange de molécules simples (EDTA, phénol, cystéine...), ce qui est difficile avec un modèle continu.

Ces ligands sont caractérisés à l'aide de paramètres de complexation : Concentration, constante de stabilité et/ou d'acidité. Le nombre de ligands nécessaires à une modélisation correcte est bien évidemment lié à la complexité de la MOND étudiée. Les données expérimentales seront également limitantes de par leur précision, la fenêtre analytique balayée, les capacités d'optimisation du programme utilisé (souvent limité à un nombre

restreint de paramètres), ainsi que les interactions analysées (métaux traces, proton, cations majeurs, ...).

Très souvent, le nombre de ligands utilisé et nécessaire à une modélisation correcte des données expérimentales est assez limité : 2 à 4 pour les propriétés de complexation vis-à-vis des métaux traces (Lu Y. et Allen H., 2002 ; Vasconcelos M.T.S.D. et Leal M.F.C., 2001), jusqu'à 6 pour la modélisation des sites acides (Masini J. *et al.*, 1998). La **Figure I-4** présente une distribution discrète de 6 ligands, de constantes réparties entre 4,5 et 10, donc proches des distributions discrètes utilisées pour simuler les propriétés d'acidité des MON.

Parmi tous les modèles discrets que nous pouvons trouver dans la littérature, le plus abouti est le modèle WHAM (Winderemere Humic Aqueous Model, Tipping E., 1994 ; Guthrie J.W. *et al.*, 2005).

Différentes techniques mathématiques peuvent être utilisées afin de recalculer les valeurs des paramètres de complexation de ces ligands à partir de la modélisation des données expérimentales, procédé nommé « fitting » en anglais.

IB2d) Technique de « fitting » utilisée dans cette étude

IB2d(1) Définition de l'anglicisme « fitting »

Le terme anglais « curve fitting » très souvent simplifié en « fitting » est utilisé afin de décrire l'ajustement d'une courbe théorique sur une courbe expérimentale. Dans la communauté scientifique, on retrouvera le terme français de « fitter » une courbe pour décrire l'action d'ajustement de la courbe théorique sur la courbe ou les valeurs expérimentales.

Concrètement, cela consiste à construire une courbe à partir de fonctions mathématiques et d'ajuster leurs paramètres afin de se rapprocher des points expérimentaux mesurés. On peut utiliser, pour cela, une méthode de régression : régression multilinéaire si la loi est linéaire pour tous les paramètres, interpolation polynomiale lorsque l'on utilise un polynôme pour simuler le phénomène étudié (les paramètres physico-chimiques pouvant être déduits des coefficients du polynôme).

IB2d(2) Utilisation du logiciel PROSECE

Les données expérimentales réalisées dans le cadre de ce travail ont été traitées par le logiciel PROSECE (Programme d'Optimisation et de Spéciation chimique dans l'Environnement, libre de droits). Ce programme a été développé au cours de la thèse de Garnier C. (2004) au sein du laboratoire PROTEE en collaboration avec le Professeur Seppecher P. (Laboratoire ANLA). Il a pour but de résoudre des équilibres chimiques de systèmes complexes par un calcul de spéciation, puis d'optimiser les paramètres de complexation ou d'acidité afin de fitter correctement les données expérimentales de manière non linéaire.

IB2d2(a) Concept des quasi-particules

Cette approche se base sur le concept de quasi-particules initié par Sposito G. (1981) où une quasi-particule représente une construction mathématique théorique et non pas une molécule ou un groupement complexant réel. L'emploi des quasi-particules permet alors de représenter une MON par des réactions d'équilibre pouvant mettre en jeu non plus une seule concentration et une constante de complexation liée à un ligand mais une multitude de

constantes de complexation pour chacun des éléments d'intérêt pouvant agir sur la quasi-particule (**Figure I-5**).

Cette approche discrète s'adapte mieux à la complexité de la modélisation des propriétés de complexation et d'interaction de la MOND avec les métaux traces, le proton, ou encore les cations. En effet, elle permet de s'affranchir des contraintes liées aux types de ligands utilisés habituellement.

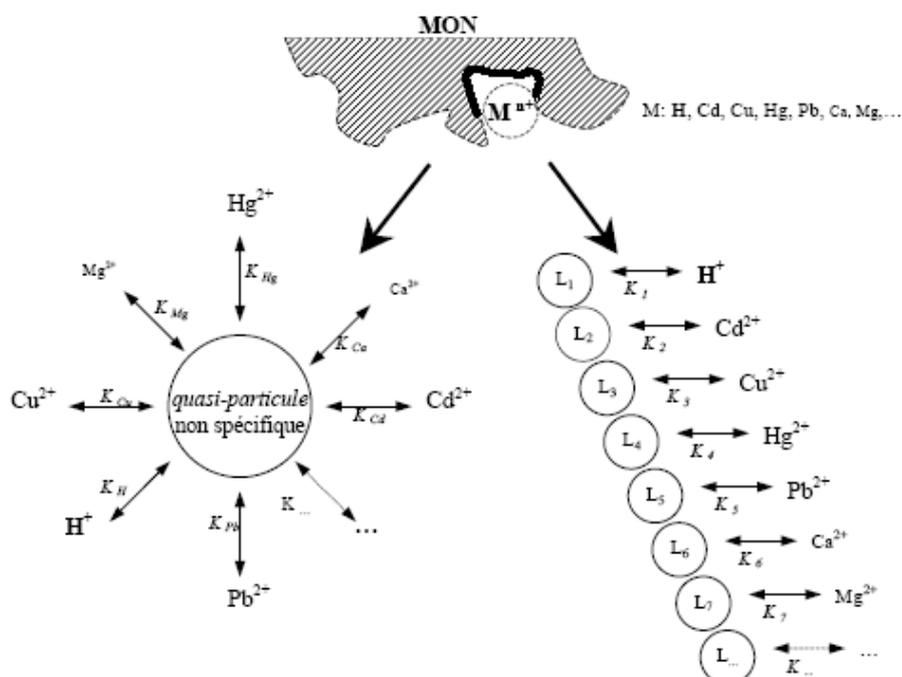


Figure I-5: Comparaison schématique des interactions d'un groupement fonctionnel d'une MON avec différents cations, représentées par N ligands ou une seule quasi-particule non spécifique à N paramètres (Garnier C., 2004)

IB2d2(b) Fonctionnement général du logiciel PROSECE

Le logiciel PROSECE est composé de 2 modules distincts :

- un calcul de spéciation,
- une optimisation des paramètres de complexation.

Le premier module, inspiré des programmes de spéciation comme CHESS, PHREEQC, MINEQL ou encore MINTEQA2, résout les équilibres chimiques existants entre les différentes espèces par l'intermédiaire de calculs de la spéciation chimique d'un système défini. Le calcul de ce système chimique, représenté mathématiquement à l'aide de tableaux d'équilibre, comme le tableau de Morel M.L.L (1983), utilise un algorithme de *Newton-Raphson* afin de minimiser l'écart au bilan de masse (Garnier C., 2004).

Le second module permet l'optimisation des paramètres de complexation inconnus (concentrations, constantes d'acidité et/ou de complexation, ...) par le biais de la méthode du simplex à taille variable (Garnier C., 2004). Le simplex est en fait une figure géométrique convexe définie par N+1 sommets, N étant le nombre de paramètres à optimiser. Il y a autant de dimensions que de paramètres (Massart *et al.*, 1997). Ce simplex va évoluer par des transformations mathématiques (symétries, élongation ou rétrécissement de ses cotés) de manière à optimiser les valeurs des paramètres permettant de minimiser l'écart entre les données mesurées (ex. concentrations en cuivre électrochimiquement labile mesurées par

DPASV) et calculées (ex. concentrations en cuivre libre et inorganique déterminées par le module de spéciation).

La mise en boucle de ces 2 modules (**Figure I-6**) permet d'optimiser les valeurs des différents paramètres recherchés jusqu'à atteindre des valeurs inférieures à l'erreur consigne (Biais) demandée.

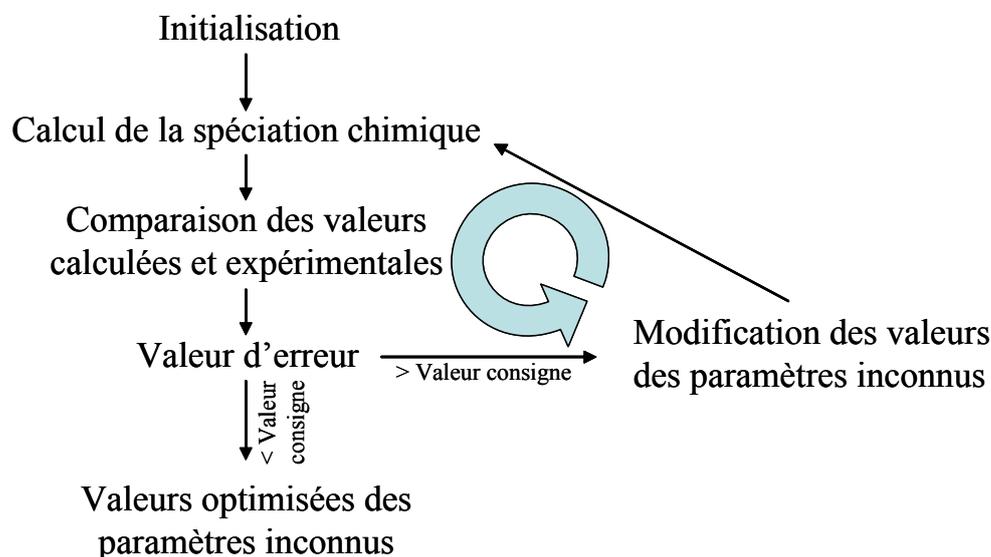


Figure I-6 : Représentation schématique simplifiée du logiciel PROSECE d'après Garnier C. (2004)

Comparé à différentes méthodes de fitting linéaire (Buffle J., 1981 ; Chau Y.K. et Lum-Shue-Chan K., 1974 ; Ružić I., 1982 ; Scatchard G., 1949 ; Van den Berg C.M.G., 1982a) et non linéaire (Pižeta I. et Branica G., 1997), le logiciel PROSECE de par sa flexibilité et son système de résolution mathématique s'est montré plus adapté à nos objectifs (Garnier C. *et al.*, 2004b) c'est pourquoi dans cette étude, nous préférons son utilisation à celles des différentes techniques de fitting citées.

Afin d'améliorer la vitesse de résolution des équilibres, il est conseillé d'initialiser le système au plus proche des conditions d'équilibre de l'échantillon. Ainsi, la spéciation inorganique sera calculée à partir de MINEQL, connaissant les valeurs de salinité de l'échantillon ou sa composition en ions majeurs à partir d'une mesure de chromatographie ionique ; de même les valeurs des constantes de complexation et de concentration en ligands devront être initialisées à des valeurs réalistes afin de partir dans des conditions assez proches des conditions de l'échantillon.

Dans le tableau de Morel, on utilisera par exemple, dans le cas de la résolution d'un système à un ligand d'un échantillon naturel marin (ce qui est la grande majorité des échantillons étudiés dans ce travail, valable pour une concentration de carbone de l'ordre de 1mg.L^{-1}), une valeur du $\log K$ de 10 avec une concentration en site de 80 nM ; et dans le cas de 2 ligands, des concentrations en ligands forts et faibles de respectivement 15 nM et 65 nM avec des constantes respectives $\log K$ de 11,5 et 9,7. Il faut noter ici que les constantes calculées seront toujours des constantes conditionnelles (ou apparentes) car la charge de la MOND n'est pas connue, tout comme les constantes d'équilibre de la MOND avec les cations majeurs.

Par rapport au code initial de PROSECE (Garnier C., 2004), quelques améliorations ont pu être apportées.

La première amélioration, consiste à réaliser un « recuit » à la fin de la première optimisation ; *i.e.*, quand le simplex ne bouge plus et qu'il a atteint un minimum local, un nouveau simplex est généré permettant de voir si il n'y a pas une meilleure solution ailleurs. Si le nouveau biais est inférieur à plus de 5% à l'ancien biais, une nouvelle optimisation est réalisée, et ce, au maximum 5 fois.

Ce nouveau code contient aussi un calcul d'intervalle de confiance sur chaque paramètre optimisée. Celle-ci est calculée, une fois le calcul d'optimisation terminé, en modifiant un à un, chacun des paramètres, jusqu'à obtenir une variation du biais de 10%.

Enfin, pour chacune des optimisations effectuées, une modélisation est effectuée systématiquement avec 1 ou 2 ligands dans le cas de calcul de complexation avec le métal, ou de 2 à 6 ligands pour celui réalisé avec le proton. Le choix du modèle se fait suivant la modélisation donnant le meilleur résultat, pour le minimum de ligands.

IC. Techniques d'analyse

IC1. Différentes techniques utilisées pour l'analyse des métaux traces

Les métaux traces sont étudiés depuis de nombreuses années à l'aide de différentes techniques analytiques. Dans le cas des études de spéciation des métaux dans la phase dissoute, on peut distinguer principalement deux approches : Electrochimique ou spectroscopiques.

La majorité des techniques d'analyse non électrochimiques sont des analyses spectroscopiques atomiques couramment employées dans les analyses du métal total, comme l'Absorption Atomique à Four Graphite (GFAAS ; Akinlua A. *et al.*, 2007) ainsi que la Spectroscopie de Masse Couplée à un Plasma Induit (ICP-MS ; Rahmi D. *et al.*, 2007) ; cependant, ces techniques utilisent des méthodes dites séparatives, nécessitant des étapes préalables de séparation et/ou pré-concentration de formes chimiques spécifiques.

Les techniques électrochimiques comme la Voltamétrie en redissolution Anodique avec balayage de potentiel linéaire ou pulsé (respectivement LASV ou DPASV), l'analyse en balayage potentiométrique (PSA) et celle de chronopotentiométrie (SCP), que nous regrouperons aussi sous le terme de techniques voltamétriques, permettent de mesurer des concentrations en métaux très faibles sans étapes de pré-concentration préalable des échantillons. A noter que la technique d'analyse en balayage potentiométrique (PSA), analogue à la technique de voltamétrie en redissolution anodique (ASV), peut s'avérer très pratique pour des mesures de routine en milieu marin (Riso R.D. *et al.*, 1997) de par l'absence d'étape de désoxygénation de l'échantillon.

Les techniques spectroscopiques citées ci-dessus ont l'avantage, comparées aux techniques voltamétriques, d'être applicables à un plus grand nombre d'éléments chimiques. Cependant, elles ont certains inconvénients majeurs comme leur coût d'achat et de fonctionnement et surtout le fait qu'elles permettent uniquement la détermination des concentrations totales de métaux (Bersier P.M., *et al.*, 1994).

Par conséquent, afin de réaliser des études de spéciation, un couplage avec des procédures de séparation et d'extraction, qui augmentent fortement les risques de modification et de contamination de l'échantillon initial, doit être entrepris. Ces procédures entraînent bien entendu encore une augmentation du coût des analyses !

A ces raisons, il faut ajouter que pour la majorité des techniques spectroscopiques, l'analyse d'échantillons d'origine marine s'avère très difficile due à la présence de sels provoquant des interférences et un vieillissement prématuré du système d'analyse (durée de vie des fours graphites dans le cas du GFAAS par exemple).

Ce sont quelques unes des principales raisons qui font que l'emploi des techniques voltamétriques est plus particulièrement adapté aux mesures de spéciation avec peu ou pas de changements de l'échantillon initial, c'est-à-dire, des conditions minimisant fortement les contaminations par les réactifs ou les pertes dues à une adsorption sur les récipients.

Il existe différentes techniques voltamétriques permettant de mesurer les métaux traces et de réaliser des analyses de spéciation. Il est donc important de sélectionner une technique appropriée afin de pouvoir analyser ces métaux dans les concentrations naturelles souvent très faibles que nous allons rencontrer.

IC2. Choix de la technique d'analyse électrochimique

Parmi les techniques électrochimiques permettant une mesure directe de la concentration (de l'activité) des ions libres présents en solution, on peut trouver l'électrode ionique spécifique (ISE). Cette technique directement utilisable *in situ* est donc attractive pour l'étude de la spéciation métallique en milieu aqueux.

Cependant, différents problèmes peuvent affecter significativement la réponse de l'électrode, comme notamment les problèmes d'interférences avec les chlorures en milieu marin, dus au manque de sélectivité de ce type d'électrode (Technical Specifications for the Cupric Ion-Selective Electrode, ELIT 8227).

Beaucoup de techniques électrochimiques s'appuient sur des techniques voltampérométriques dont la base est la polarographie, découverte en 1922 par le professeur Jaroslav Heyrovsky, récompensé pour cela par le prix Nobel de chimie en 1959 (Sawyer D. T. *et al.*, 1995).

La polarographie, au sens général du terme, est une technique électrochimique non séparative, *i.e.* qui peut s'appliquer directement à un échantillon naturel. Cette technique permet donc d'éviter les modifications de l'échantillon, comme celles entraînées par les techniques dites séparatives, où une étape d'extraction du métal ou de la MOND est nécessaire.

Le **Tableau I-2** (Buffle J. et Tercier-Waeber M.-L., 2005) répertorie différentes techniques d'analyses voltamétriques ainsi que les gammes de concentration de métaux mesurables. On peut constater que, par exemple, la voltamétrie cyclique n'est pas adaptée au type d'analyses que nous souhaitons réaliser car elle a une sensibilité insuffisante pour des analyses environnementales (10^{-2} à 10^{-6} mol.L⁻¹) qui nécessitent de mesurer des concentrations en métaux de l'ordre du nano-molaire.

Les méthodes de réduction directe comme la DPV (Differential Pulse Voltammetry) ou la SWV (Square Wave Voltammetry) montrent elles aussi des sensibilités insuffisantes pour ce type d'analyses. Il est donc nécessaire d'utiliser une technique avec une étape de pré-concentration, c'est-à-dire une étape permettant de concentrer le métal à analyser sur l'électrode de travail.

La DPASV (Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry), grâce à l'utilisation de potentiels surimposés, permet de mesurer principalement le courant faradique produit par la réaction d'oxydoréduction du métal considéré sur l'électrode de travail (le courant capacitif généré étant lui négligeable devant le courant faradique), et par conséquent de mesurer aussi la concentration du métal en solution qui est proportionnelle au courant faradique..

Comparé à l'ISE (Rozan T.F., *et al.*, 1999), en plus de l'absence d'interférences liées aux chlorures, la DPASV possède aussi une meilleure sensibilité permettant de mesurer des concentrations inférieures au nano-molaire, comme celles rencontrées dans les analyses environnementales que nous désirons effectuer, notamment en milieu marin.

Tableau I-2 : Principales techniques voltamétriques utilisées pour les analyses de métaux traces et leurs fenêtres analytiques. v = vitesse de balayage du Potentiel; ΔE = Pulse amplitude; f = Fréquence; t_d = temps de Pré-concentration ; i_p = Courant du pic; E_p = Potentiel du pic (Buffle J. et Tercier-Waeber M.-L., 2005)

Technique	Imposed function	Recorded function	Conc. range (mole L)
Linear sweep voltammetry (LSV) (cyclic voltammetry dotted line)			$10^{-2} - 10^{-6}$
Differential pulse voltammetry (DPV)			$10^{-4} - 10^{-7}$
Square wave voltammetry (SWV)			$10^{-4} - 10^{-8}$
Anodic Stripping Voltammetry (ASV) with linear scan (full line) or modulations (e.g. DP → DPASV or SW → SWASV; dotted line)			$10^{-6} - 10^{-11}$
Adsorptive stripping voltammetry (AdSV) (with or without modulation)			$10^{-6} - 10^{-12}$
Stripping Chronopotentiometry (SCP)			$10^{-5} - 10^{-9}$

IC3. La Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry (DPASV)

Dans cette étude le terme de métal labile désignera le métal libre ainsi que les complexes électrochimiquement labiles à la goutte, *i.e.* les hydroxydes et complexes inorganiques ...

La DPASV utilisée dans cette étude, permet, grâce à la formation d'un amalgame des métaux sur l'électrode de travail, durant une étape de pré-concentration (réduction), de mesurer, lors de l'étape d'oxydation, des concentrations en métal labile très faibles (inférieures au nano-molaire), proportionnelles à l'intensité du courant faradique mesuré (Bard A.J. et Faulkner L.R., 1983).

Par cette technique, en suivant le métal labile dans des échantillons naturels en fonction d'ajouts de métal total (Bruland K.W. *et al.*, 2000), il est possible d'évaluer la complexation de celui-ci par la MOND (Buffle J., 1988).

De même, par cette technique, il est possible de mesurer aussi les métaux totaux en changeant les conditions analytiques. Il sera alors nécessaire de passer l'échantillon sous UV à pH acide afin de détruire la MOND puis d'utiliser un potentiel de dépôt E_{dep} très négatif de l'ordre de -1,2 à -1,6V.

L'éventail des métaux analysables est ainsi assez limité, mais nous pourrions aisément étudier avec cette technique le zinc, le cadmium, le plomb et le cuivre, qui forment des amalgames avec le mercure. Pour les métaux ne formant pas d'amalgame, la CSV (Cathodic Stripping Voltametry) permet par complexation du métal libre avec un ligand spécifique d'étudier également les interactions métaux / MON (Achterberg E.P. et Braungardt C., 1999 ; Gun J. *et al.*, 2006 ; Mackie D.S. *et al.*, 2004 ; Van den Berg C.M.G., 1989).

IC3a) Appareillage

L'appareil de voltampérométrie utilisée (**Figure I-7**) est un stand Metrohm muni d'un système Metrohm VA 663 + IME 663. Le système est constitué de 3 électrodes (une électrode de référence, une contre-électrode et une électrode de travail) décrites ci-dessous, d'un potentiostat-galvanostat EcoChemie PGSTAT 12 (détection limite 30fA), d'un pH mètre Metrohm 713, ainsi que de 3 burettes de 500 μ l automatisées (Pump Xe 1000, TECAN) adaptées au système lors de notre développement analytique, permettant des ajouts précis de solutions métalliques. Lors des missions réalisées en collaboration avec l'Institut Ruđer Bošković, le potentiostat-galvanostat EcoChemie PGSTAT 12 a été remplacé soit par un μ Autolab type I ou II (Metrohm), ou par un PSTAT 10 (EcoChemie). Bien que différents, ces appareils offrent les mêmes performances nécessaires dans le cadre de cette étude.

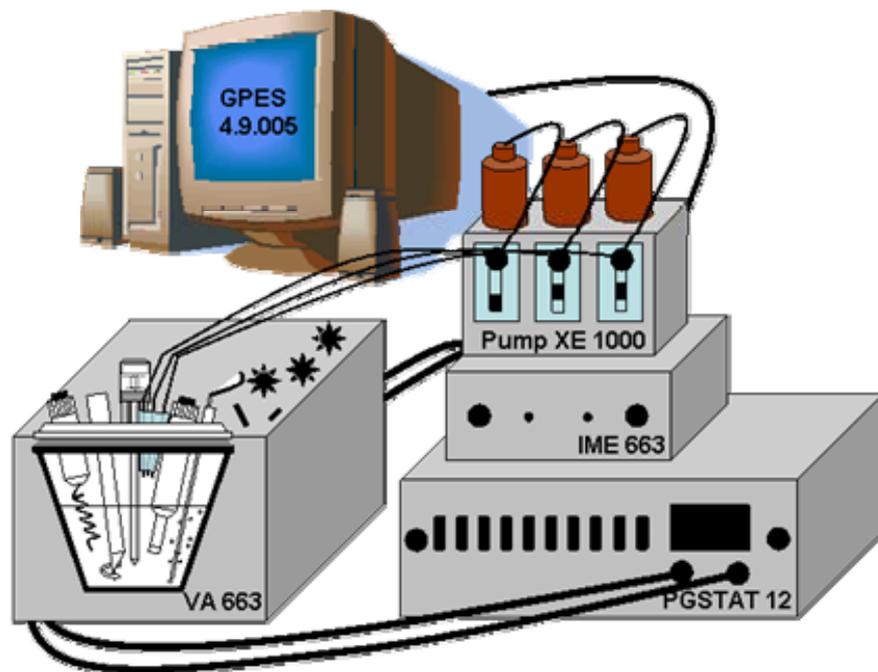


Figure I-7 : Schéma de l'appareillage utilisé en DPASV avec le système d'ajout à 3 burettes permettant de couvrir une large gamme de concentration métallique

L'ensemble est relié à un PC et est commandé par le logiciel GPES 4,9,005 (EcoChemie) complété par un programme réalisé par D. Omanović (Ruđer Bošković Institute, Zagreb, Croatie) permettant de gérer automatiquement la titration métallique et d'éviter ainsi l'utilisation de nombreuses lignes de codes normalement nécessaires au projet sous GPES afin de réaliser la titration. Ce petit programme consiste à appeler dans le projet GPES un fichier exécutable faisant lui-même appel à un fichier texte où la liste des volumes à ajouter sont inscrits, ainsi que la burette à utiliser pour chacun des ajouts.

IC3b) Au niveau de l'échantillon : la cellule et les électrodes

L'échantillon naturel, préalablement filtré à $0,45 \mu\text{m}$ afin d'en séparer la fraction dissoute de la fraction particulaire, est tout d'abord placé dans une cellule électrochimique (**Figure I-8**), généralement en verre, téflon ou quartz de 10 à 100 ml, située sur le stand VA 663. Nous utiliserons dans notre étude une cellule en téflon, électrochimiquement inerte, permettant ainsi de minimiser au maximum les phénomènes d'adsorption des métaux à la surface de la cellule électrochimique.

De plus, celle-ci est bien plus solide et moins coûteuse que les cellules en quartz pour des propriétés physico-chimiques toutes aussi satisfaisantes (quasiment aucune adsorption et peu de relargage de métaux traces).

Afin d'éviter toute contamination, la cellule est préalablement plongée dans un bain d'acide nitrique 10% (trace analysis) pendant 24 heures puis soigneusement rincée à l'eau ultra pure. Toute la verrerie utilisée en polarographie subira au minimum ce protocole de nettoyage.

Afin de s'assurer de la propreté du système, un contrôle est réalisé avant toute analyse sur de l'eau mQ, acidifiée avec du HNO_3 suprapur (Merck).

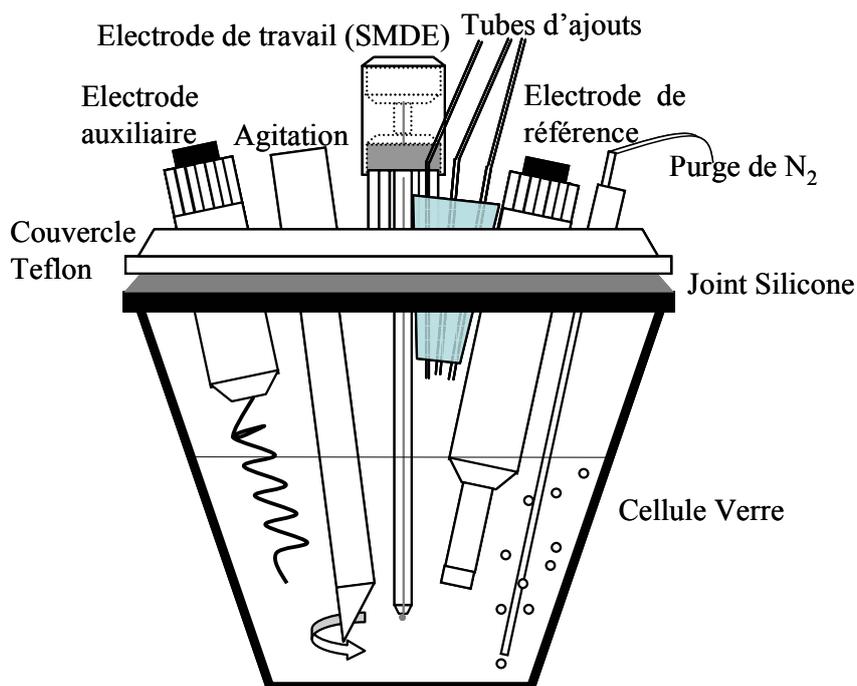


Figure I-8 : Représentation schématique de la cellule électrochimique décrivant les principaux composants du système en rapport avec celle-ci

La DPASV nécessite trois électrodes : une de travail, une de référence et une auxiliaire (**Figure I-8**), qui plongent dans la solution à analyser ainsi qu'un système d'agitation (stirrer: tige de téflon rotative) et un tube de purge, l'ensemble étant supporté par un couvercle en téflon. Ce couvercle permet, de plus, d'y joindre le système d'ajout de métaux, ou éventuellement une électrode de pH.

Les réactions électrochimiques d'intérêt se produisent à la surface de l'électrode de travail ; elle est donc au cœur du système voltamétrique utilisé. Les électrodes les plus couramment utilisées sont les électrodes de mercure : soit à film de mercure, soit à goutte de mercure ; c'est ce dernier type d'électrode que nous utiliserons ; ou encore les électrodes solides formées par des métaux nobles (Au, Pt, Ir). La SMDE (Static Mercury Drop Electrode) utilisée est caractérisée par une faible surface ($0,25 \text{ mm}^2$) ce qui améliore la polarisation. De plus cette électrode est renouvelée après chaque mesure et est caractérisée par une surface spécifique très précise, ce qui permet de travailler à chaque fois sur une électrode propre et en conservant les mêmes conditions d'analyses. Le potentiel pour lequel l'électrode de mercure n'est pas chargée, appelé potentiel de charge nulle, se situe aux alentours de $-0,6 \text{ V/Ag/AgCl/KCl}$; la goutte sera donc chargée négativement pour des potentiels inférieurs à cette valeur et une charge positive pour des potentiels imposés supérieurs. La fenêtre de potentiel utilisable avec ce type d'électrode est limitée par la réduction du proton pour les potentiels négatifs (de l'ordre de $-1,65 \text{ V}$ dans des conditions de pH naturel) et par l'oxydation du mercure pour les potentiels positifs (aux alentours de $0,25 \text{ V}$ dans le cas d'eaux douces). La fenêtre de potentiel disponible est donc environ de $-1,65 \text{ V}$ à $+0,25 \text{ V}$ par rapport à $\text{Ag/AgCl/KCl}_{\text{saturé}}$ et selon les milieux analysés. En effet, dans l'eau de mer et pour un $\text{pH} < 2$, cette fenêtre est réduite de -1 V à $+0,05 \text{ V}$.

L'électrode de référence, quant à elle, est une électrode Ag/AgCl reliée à la solution par un pont salin (KCl saturé, permettant de conserver une concentration en KCl constante au cours du temps pour de longues expériences), elle possède un potentiel spécifique et constant

d'environ 199 mV/ENH (Electrode Normale à Hydrogène). Dans les cas d'analyses d'eaux douces, afin de ne pas être gêné par la diffusion d'ions chlorures du pont salin, de l'eau milliQ avec 20 μ L de HNO₃ 10% ou du NaNO₃ (5 M) sera utilisée dans le pont salin en lieu et place du KCl saturé ; ce système permet une conduction suffisante et un signal du cuivre beaucoup mieux défini dû à l'absence de chlorures.

Enfin, la troisième électrode dite électrode auxiliaire ou contre électrode, est fabriquée en matériel chimiquement inerte. Tout d'abord une électrode en graphite a été utilisée dans cette étude, puis remplacée par une électrode de platine, car très souvent rencontrée dans les systèmes électrochimiques, et aussi beaucoup plus solide que l'électrode de graphite. Le rôle de cette électrode est d'assurer le passage du courant ainsi que la mesure de celui-ci.

Durant les étapes de pré-concentration et de mesure, le potentiel est appliqué entre l'électrode de référence et l'électrode de travail, le courant, lui, est mesuré entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire. Ce circuit permet de ne pas faire passer de courant dans l'électrode de référence, et ainsi de s'affranchir de la chute ohmique.

Enfin, le bullage d'un gaz électro-inactif, (ici l'azote, car moins onéreux que l'argon), *via* le tube de purge, permet d'éliminer l'oxygène dissous présent dans l'échantillon à de fortes concentrations à température et pression ambiantes, comparé aux concentrations de métaux. L'Oxygène est en effet une source d'interférences sur le polarogramme dû à sa réduction en H₂O₂ puis en H₂O, respectivement à -0,10 V et -0,95 V (par rapport à une électrode Ag/AgCl/KCl_{saturé}). Un temps de 5 à 10 minutes est donc nécessaire suivant les échantillons afin d'éliminer l'oxygène dissous présent.

IC3c) Pré-concentration - dépôt

La sensibilité de la technique utilisée repose principalement sur la durée de cette étape dite de pré-concentration. En effet, comme décrit ci-dessus, lors de cette étape de dépôt, un potentiel est appliqué entre l'électrode de référence et l'électrode de travail généralement dans notre étude pendant 300 secondes, permettant de pré-concentrer les espèces métalliques électro-actives se trouvant en solution. Pour se faire, le potentiel appliqué doit être plus négatif (de l'ordre de -0,3 à -0,5 V) que le potentiel standard du métal à analyser (Bard A.J. et Faulkner L.R., 1983).

Il se produit alors la réduction du métal puis la formation d'un amalgame à l'électrode de travail, suivant la réaction (**Figure I-9**) :

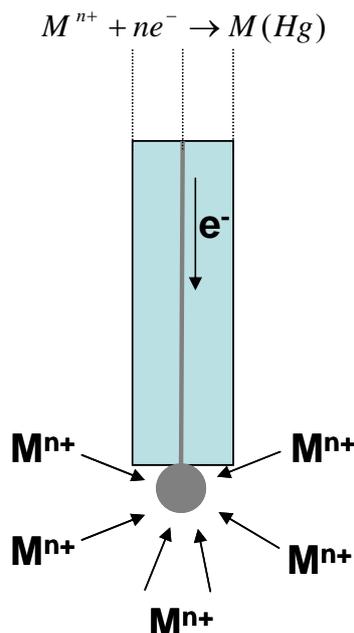


Figure I-9 : Etape de pré-concentration du métal sur l'électrode de travail (SMDE)

La formation de l'amalgame est conditionnée par la solubilité du métal considéré dans le mercure. A titre d'exemple, celle-ci peut varier de $4,7 \times 10^{-5}$ (en % atomique) pour l'antimoine à 70 pour l'indium. Dans la fenêtre analytique utilisée et pour les métaux couramment étudiés, les solubilités du Zn, Cd, Pb et Cu sont respectivement de 5,83, 10, 1,3, et 0,006. C'est cette solubilité qui va déterminer la capacité à analyser ou non certains métaux et entraîner la possibilité de saturer la goutte de mercure plus ou moins rapidement, rendant alors le signal de redissolution non analysable.

Les conditions de dépôt sont primordiales en ASV, et doivent être les plus reproductibles possibles (volume de la goutte, vitesse d'agitation et temps de dépôt). Une grande attention doit donc être apportée au réglage de la taille de la goutte avant chaque analyse. Il est donc nécessaire de réaliser régulièrement des tests utilisant une goutte de mercure tombante toute les 0,5 ou 1 secondes afin de pouvoir vérifier la reproductibilité de la taille de la goutte, par l'observation du potentiel mesuré au cours du balayage de potentiels, et au nécessaire de procéder au réglage minutieux de celle-ci.

IC3d) Repos et redissolution

Après l'étape de dépôt, il est nécessaire de procéder à une étape de repos, qui dure entre 5 et 10 secondes, permettant au métal de se répartir uniformément dans le mercure. Cette étape se fait sans agitation et doit demeurer assez courte, sans quoi il pourrait se produire prématurément et sans aucun contrôle, la réduction des métaux électro-actifs, car l'électrode de travail se trouve à ce moment là à un potentiel voisin de celui de début de balayage.

Ensuite, l'étape de redissolution consiste en un balayage vers des potentiels plus positifs, et lorsque le potentiel d'un couple métal amalgamé - métal ionique est atteint, le métal se trouve alors ré-oxydé et un courant résultant de cette ré-oxydation est observé (**Figure I-10**). L'intensité maximum de ce courant de ré-oxydation, appelé courant limite, est alors directement proportionnel à la concentration du métal dans la goutte et par conséquent aussi à la concentration de celui-ci dans la solution.

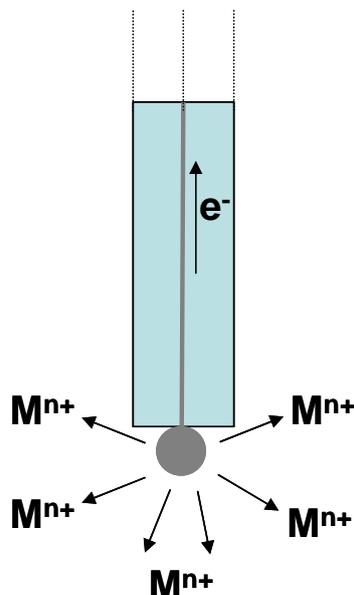


Figure I-10 : Etape de ré-oxydation du métal fixé sur l'électrode de travail (SMDE)

Concernant la DPASV, des impulsions de potentiel d'amplitude constante de 25 à 50 mV (**Figure I-11, 1**) et d'une durée d'environ 50 ms (**Figure I-11, 2**) sont surimposées au balayage linéaire toutes les 0,5 à 5 secondes (**Figure I-11, 3**). Cette technique permet la mesure du courant une fois avant et une fois après l'impulsion (**Figure I-11, respectivement 4 et 5**) ; le voltamogramme obtenu (**Tableau I-2**) est construit à partir de la différence entre ces deux mesures (Δi , **Tableau I-2**) en fonction du potentiel de balayage (E , **Tableau I-2**).

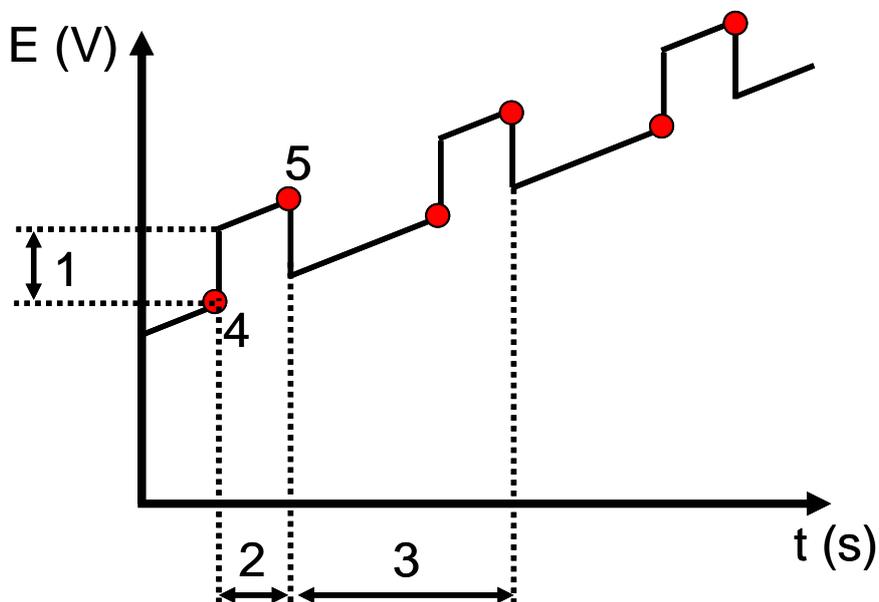


Figure I-11 : Représentation schématique des caractéristiques du signal de DPASV utilisé, 1/ Amplitude, 2/ durée de l'impulsion, 3/ temps entre les impulsions, 4 et 5/ points de mesures de l'intensité du courant

Ceci permet de minimiser l'influence de la composante capacitive de l'intensité mesurée due à la présence de la double couche ionique à l'interface électrode / solution (qui donne un signal comparable à celui d'une espèce électro-active de l'ordre de plusieurs micro-ampères

dans le cas de la polarographie classique), au profit de la composante faradique, *i.e.* celle qui est représentative des réactions redox mises en jeu.

Cependant, malgré le gain en sensibilité offert par cette technique, par rapport à la polarographie classique, le temps de balayage demeure lui assez long (1 à 3 minutes) selon la fenêtre analytique utilisée.

IC3e) Procédure type de DPASV utilisée

Suivant le type d'échantillon à analyser (eau marine, eau douce, échantillon à pH naturel ou tamponné....) et les métaux étudiés, il est nécessaire d'utiliser des procédures quelques peu différentes.

Il est présenté ici le type de procédure, utilisé pour des analyses concernant le cuivre, réalisée sur des eaux marines à pH naturel (**Tableau I-3**) et permettant d'atteindre une limite de détection, correspondant à 10 fois l'écart type du blanc, inférieure à 0,1 nM (0,066 nM mesuré).

Tableau I-3 : Procédure utilisée pour les mesures de cuivre sur des échantillons d'eau de mer à pH naturel

Temps de purge	30 secondes
Potentiel de dépôt	-0,6 à -0,4 V
Durée de dépôt	297 secondes
Conditionnement	-1,6 V
Durée de conditionnement	3 secondes
Temps d'équilibre	10 secondes
Potentiels balayés	-0,6/-0,4 à \approx 0,01 V

Cette procédure est celle qui est utilisée dans le projet GPES et qui est donc appelée automatiquement avant chaque mesure.

Cependant, comme nous l'avons dit précédemment, il est nécessaire avant toute analyse de procéder à un bullage à l'azote afin d'éliminer l'oxygène, source d'interférences, qui est présent dans la solution. Une technique simple consiste, après avoir placé notre échantillon dans le système préalablement nettoyé comme nous avons pu le décrire dans la partie précédente, à suivre l'intensité du courant pendant le bullage et l'agitation de la solution à un certain potentiel (0V par exemple) jusqu'à la stabilisation de celui-ci aux environs du nano-ampère. Dans la majorité des cas, un bullage de 10 minutes (600s) est suffisant afin de retirer tout l'oxygène des échantillons de type marin et permet de travailler sur la gamme de balayage allant de -1,2 V à +0,2 V sans aucune interférence due à l'oxygène.

Le potentiel de dépôt est choisi en fonction des analyses à réaliser. Dans le cas d'analyses de propriétés de complexation, la réalisation d'un pseudopolarogramme aide à choisir le potentiel de dépôt permettant de mesurer uniquement le métal labile, évitant un potentiel de dépôt trop négatif qui pourrait détruire en partie certains complexes MOND/Métal. Dans le cas d'analyses de métaux totaux, ce risque n'existe plus et un potentiel inférieur de 0,3 V à celui du potentiel d'oxydation de l'espèce analysée sera utilisé.

De même, la durée de dépôt sera systématiquement de 297 secondes dans le cas d'analyses de propriétés de complexation, où il est nécessaire d'avoir une bonne précision sur les faibles concentrations rencontrées en début de titration ; alors qu'elle pourra varier de 60 à 300 secondes pour les analyses de métaux totaux où les concentrations en métaux mesurées sont souvent plus importantes.

Le potentiel de conditionnement de -1,6 V utilisé pendant 3 secondes a été mis en place durant ce travail de thèse et sera expliqué en détail dans le **Chapitre II**. L'idée consiste à appliquer un potentiel supplémentaire surimposé, afin de porter la charge de l'électrode à un potentiel très négatif. Ceci permet de repousser la MOND globalement chargée négativement adsorbée à la surface de l'électrode de travail durant l'étape de réduction et qui gêne ensuite la ré-oxydation du métal amalgamé.

Le potentiel balayé lors de la ré-oxydation doit, quant à lui, partir d'un potentiel suffisamment négatif afin de pouvoir mesurer l'oxydation du ou des métaux voulus. Celui-ci ne doit cependant pas être trop négatif car, vu la faible vitesse de balayage utilisée en DPASV, celui-ci engendrerait un temps de dépôt supplémentaire à un potentiel plus négatif que celui utilisé lors de l'étape de réduction. Son effet est surtout visible lors de la réalisation de pseudopolarogrammes où le choix de potentiels trop négatifs permet de voir des signaux d'oxydations uniquement engendrés par la réduction des métaux pendant la durée de l'étape de ré-oxydation.

IC4. La pseudopolarographie

La technique de la pseudopolarographie, aussi appelée néopolarographie, pseudovoltamétrie ou encore SSV pour « scanned (deposition potential) stripping voltammetry » est utilisée dans les études de spéciation depuis plus de 35 ans (Bubić S. et Branica M., 1973).

Cependant, cette technique très longue à mettre en œuvre, n'a été que peu utilisée jusqu'à l'apparition de moyens permettant une certaine automatisation du système (Omanović D. et Branica M., 1998).

Le principal avantage de cette technique comparée à la polarographie/voltamétrie classique, est qu'elle permet de mesurer la spéciation d'un métal directement sur l'échantillon naturel (Croot P.L. *et al.*, 1999 ; Lewis B.L. *et al.*, 1995 ; Pižeta I. *et al.*, 2005 ; Tsang J.J. *et al.*, 2006 ; respectivement pour le cuivre, zinc, plomb et cadmium) dans les conditions initiales pour des concentrations en métaux traces très faibles ($<10^{-8}$ M).

Le principe de cette technique repose sur l'utilisation de la DPASV employée avec une gamme de balayage en potentiel de dépôt. Le pseudopolarogramme résultant en 3D est en fait une succession de voltamogrammes obtenus pour des potentiels de dépôts croissants (ou décroissants) comme le montre la **Figure I-12 A**.

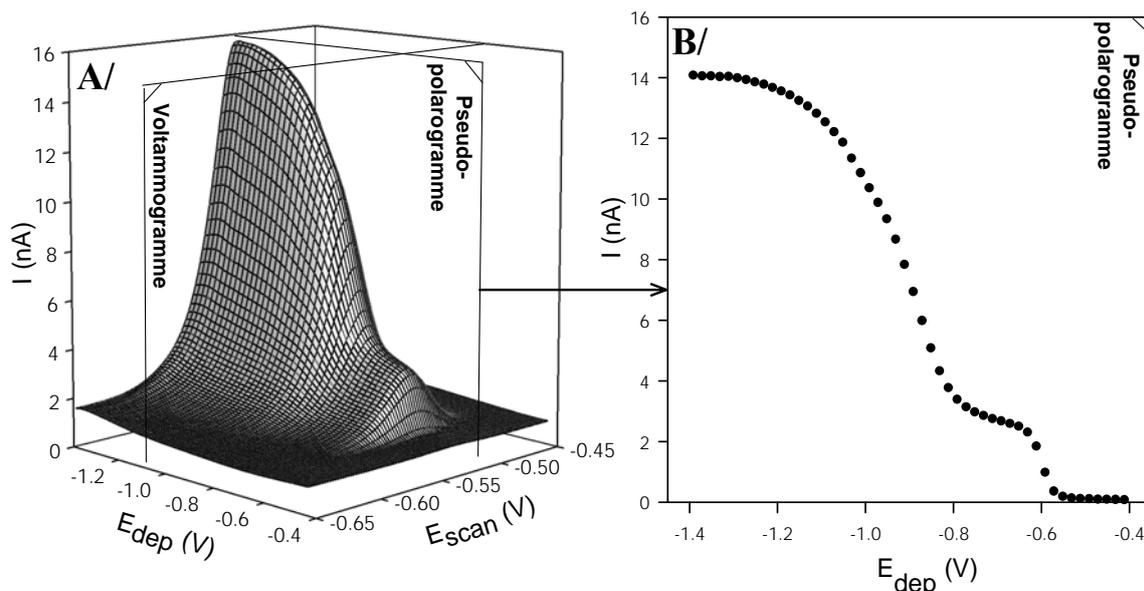


Figure I-12 : Construction d'un pseudopolarogramme avec I (nA) l'intensité du pic d'oxydation du métal considéré ; E_{dep} (V) le potentiel de dépôt ou d'accumulation imposé durant l'étape de pré-concentration ; E_{scan} (V) le potentiel de balayage couramment utilisé dans les mesures de DPASV

Pour chaque voltamogramme ($I=f(E_{scan})$) obtenu à un potentiel de dépôt (E_{dep}) défini, on utilise l'intensité maximale ($I_{max}(E_{dep})$, ou courant limite) du métal considéré pour obtenir un pseudopolarogramme en 2D comme représenté sur la **Figure I-12 B**.

Les différentes vagues pouvant être alors observées correspondent pour les potentiels les plus positifs aux espèces labiles/libres du métal, majoritairement composées de complexes inorganiques ; et pour les potentiels les plus négatifs, à une fraction organique du métal pouvant être partiellement réduite dans la fenêtre analytique étudiée.

Enfin, une forme inerte (Buffle J. *et al.*, 1987) peut aussi être mise en évidence, correspondant à la fraction du métal qui n'est pas dissociable de son complexe, et donc non mesurée, dans la fenêtre analytique étudiée lors de l'étape de réduction. L'accès à cette fraction se fait par différence de la concentration en métal total avec la concentration en métal électro-labile mesurée.

Si l'on suppose que les coefficients de diffusion des complexes du cuivre sont relativement constants, l'intensité du courant mesuré peut alors être reliée à la concentration de métal labile en utilisant une sensibilité appropriée (Croot P.L. *et al.*, 1999).

Les sauts d'intensité des vagues de réduction observés ($E_{dep1/2}$) sont dépendants de la force des complexes présents dans l'échantillon ; ainsi, à partir de ces pseudopolarogrammes, en s'appuyant sur l'approche de la « Chelate Scale » présentée par Croot P.L. *et al.* (1999), on peut alors déterminer par extrapolation les constantes de stabilité thermodynamiques (K_{th}) de ces complexes organiques. Les constantes ainsi déterminées ne sont cependant pas comparables à celles obtenues par des titrations plus classiques (Croot P.L. *et al.*, 1999).

Selon d'autres auteurs (Chakraborty *et al.*, 2007), tous les complexes de cuivre avec la MON sont labiles et donnent une seule vague pseudopolarographique correspondante à la réduction des complexes de cuivre labiles. D'après eux, la diminution du courant limite de la vague pseudopolarographique est causée par un plus faible coefficient de diffusion des complexes de cuivre. Cependant, les potentiels de dépôt utilisés dans ce type d'étude sont limités, dans le cas du cuivre par exemple, de 0 à -0,7 V, ce qui correspond à la zone de potentiels où le métal est majoritairement sous forme labile si l'on utilise une fenêtre de potentiel de dépôt beaucoup

plus large allant jusqu'à -1,6V. Cette dernière approche n'est pas celle qui a été utilisée dans cette étude.

Afin de pouvoir s'appuyer préférentiellement sur l'une ou l'autre de ces deux approches, il serait nécessaire d'effectuer une étude théorique (non réalisée dans cette thèse) comparant ces 2 approches, la réalité se situant probablement au milieu de celles-ci.

Dans cette étude, la pseudopolarographie est le plus souvent uniquement employée afin de déterminer, le plus précisément possible, le potentiel de dépôt à utiliser. Pour cela, un pseudopolarogramme est effectué en présence de métal. Le potentiel est choisi de manière à se trouver dans la zone du pseudopolarogramme où l'intensité mesurée, correspondant au métal labile, est la plus forte, au potentiel de dépôt le plus positif (*i.e.* juste en dessous du potentiel d'oxydoréduction du métal labile). Ceci permet d'avoir une bonne intensité du signal permettant par la suite de réaliser des études de capacité complexante qui ne soient pas biaisées par l'emploi d'un potentiel non approprié.

En effet, l'utilisation d'un potentiel trop négatif peut entraîner la destruction partielle de certains complexes MOND-métal, conduisant indéniablement à une sous estimation de la capacité complexante réelle de l'échantillon et pouvant ainsi par la suite entraîner des erreurs lors de l'utilisation de nos paramètres de complexation dans des logiciels de modélisation de spéciation ou encore de transport de contaminants.

Un autre paramètre intéressant sur les pseudopolarogrammes concerne l'étude de la largeur du pic à mi-hauteur. Ce paramètre étant lié au nombre d'électrons impliqués dans la réaction électrochimique (Honeychurch K.C., *et al.*, 2002 ; Omanović D., 2006), il nous permet de savoir par exemple si la réaction se fait suivant l'échange d'un seul ou de plusieurs électrons ou encore si le signal mesuré est dû à la présence d'un multi-pic mis en évidence par une augmentation de ce paramètre.

IC5. Méthode de titration logarithmique

Une fois le potentiel de dépôt correctement choisi après une mesure de pseudopolarographie, comme expliqué dans la partie précédente, il faut procéder à des additions métalliques afin de pouvoir calculer les propriétés de complexation de la MOND étudiée. Pour se faire, il existe différentes techniques de titration.

La plus simple consiste à ajouter de manière linéaire, une certaine quantité de métal. En pratique, cette technique nécessite une seule burette délivrant toujours le même volume de solution, ce qui est assez pratique d'un point de vue expérimental. Cependant, ce type de technique ne permet pas de couvrir uniformément une large gamme de concentrations métalliques.

Ainsi, il est plus judicieux, afin de pouvoir couvrir une plus large gamme de concentration, d'utiliser une titration avec ajout de métal en décade ou logarithmique. L'approche choisie dans cette étude consiste à faire des ajouts de métal total correspondant à des incréments de logarithme de concentration constant. Pour ce faire, il est nécessaire de posséder au moins 3 burettes d'ajouts avec des concentrations métalliques couvrant 3 ordres de grandeur (1 μ M, 10 μ M et 100 μ M) et permettant d'avoir une fenêtre de concentration en solution s'étendant du nano-molaire au micro-molaire (**Tableau I-4**) dans le cas d'échantillons naturels non contaminés, mais aussi de ne pas modifier grandement le volume final de la solution par l'emploi de plus faibles volumes.

Tableau I-4 : Exemple de titration utilisée pour 20 ml d'échantillon, permettant de couvrir une large gamme analytique allant du nano molaire au micro molaire en 17 ajouts

	Vajouté (μ l)	[cuivre] (μ M)			Volume Total (L)	[cuivre] total Ajouté (M)
		Burette 1	Burette 2	Burette 3		
Aj 1	15	1	0	0	2.00E-2	7.5E-10
Aj 2	15	1	0	0	2.00E-2	1.5E-09
Aj 3	20	1	0	0	2.01E-2	2.5E-09
Aj 4	30	1	0	0	2.01E-2	4.5E-09
Aj 5	50	1	0	0	2.01E-2	6.5E-09
Aj 6	80	1	0	0	2.02E-2	1.0E-08
Aj 7	15	0	10	0	2.02E-2	1.8E-08
Aj 8	18	0	10	0	2.02E-2	2.7E-08
Aj 9	25	0	10	0	2.03E-2	3.9E-08
Aj 10	45	0	10	0	2.03E-2	6.1E-08
Aj 11	70	0	10	0	2.04E-2	9.5E-08
Aj 12	10	0	0	100	2.04E-2	1.4E-07
Aj 13	15	0	0	100	2.04E-2	2.2E-07
Aj 14	25	0	0	100	2.04E-2	3.4E-07
Aj 15	40	0	0	100	2.05E-2	5.3E-07
Aj 16	50	0	0	100	2.05E-2	7.8E-07
Aj 17	60	0	0	100	2.06E-2	1.1E-06

Avec ce type de titration, la dilution engendrée par tous les ajouts est de l'ordre de 3% et n'a donc que très peu d'influence sur les résultats obtenus vis-à-vis de la matière organique étudiée.

Par rapport aux ajouts linéaires, il a été montré que cette technique d'ajout en mode logarithmique, où un balayage important du ratio métal sur ligand est effectué, permettait d'augmenter considérablement la justesse des paramètres de complexation modélisables à partir des données expérimentales, et ceci quelque soit le type de modélisation utilisée pour traiter les données (Garnier C. *et al.*, 2004b).

IC6. La potentiométrie : Titration acido-basique

Afin de pouvoir déterminer la composition d'une MOND en sites acides, la technique la plus appropriée, permettant de modéliser les interactions entre la MOND et le proton dans les échantillons naturels peu concentrés, est la potentiométrie. Celle-ci permet en effet d'étudier, avec suffisamment de précision, les propriétés acido-basiques d'un échantillon de MOND pour peu qu'il soit tout de même suffisamment concentré en matière organique (Garnier C. *et al.*, 2004c).

Le but de cette technique, qui n'est autre qu'une titration acido-basique, est de caractériser l'échantillon par des constantes d'acidité et des densités de sites acides de façon à décrire les interactions de la MOND vis-à-vis du proton pour des échantillons concentrés ou des échantillons d'eaux naturelles concentrées en carbone.

Cette technique est indispensable à la caractérisation des propriétés d'acidité d'une MON mais aussi à la compréhension de son pouvoir complexant vis-à-vis des métaux. Nous trouverons globalement toujours 2 grands types de sites acides définis comme étant des sites dits carboxyliques avec par définition un comportement similaire à celui d'une titration d'acides carboxyliques avec des pKa voisins de 4,5 ainsi que des sites phénoliques pour des sites présentant des pKa voisins de 10 (Perdue E.M., 1985).

IC6a) Appareillage utilisé

Le système utilisé (**Figure I-13**) est composé d'un stand de micro titration (Metrohm), piloté par le logiciel Tinet 2,4 (Metrohm), relié à 2 burettes Titrino 719 composées chacune d'un potentiomètre (une entrée électrode de référence, deux entrées indicatrices), d'une cellule thermostatée en verre (20 à 200ml) reliée à un cryothermostat (Fischer Bioblock Scientific), de manière à pouvoir conserver une température constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, d'une électrode de pH combinée (Mettler, Inlab422, référence: Ag/AgCl/KCl 3,0 M) calibrée quotidiennement par des solutions tampons (HANNA 4,01, 7,01 et 10,01), d'une agitation magnétique (stirrer Metrohm 728) et d'un tube de purge d'azote ultra pur (saturé en eau et décarbonaté par un bullage dans une solution de NaOH 1M).

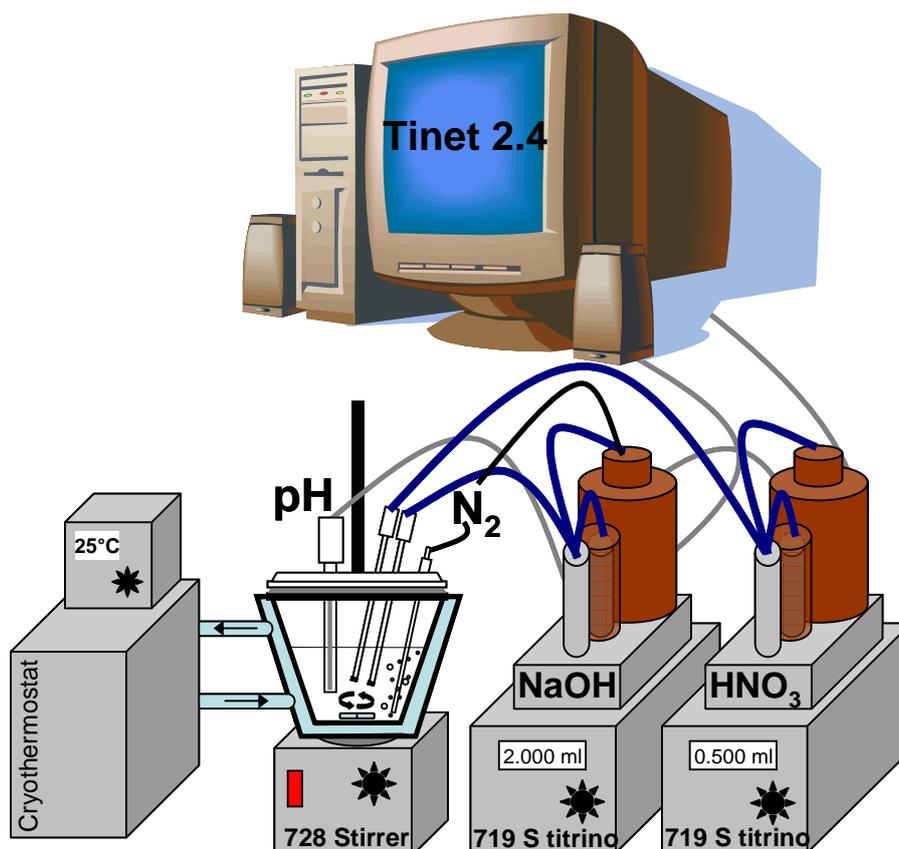


Figure I-13 : Représentation schématique de l'appareillage utilisé en potentiométrie

Les burettes titrino sont remplies l'une de HNO₃ 0,2 à 0,5 M (préparé à partir de HNO₃ 69%, J.T. Baker) et l'autre de NaOH 0,10 M (à partir de NaOH 10 M concentré, Fisher Chemicals) purgé par le même système d'azote afin d'éviter la carbonatation.

La solution de NaOH est titrée (sous bullage d'azote) par du dihydrogénophthalate de potassium (R.P. Normapur pour analyse, Prolabo), monoacide, dont le poids moléculaire très élevé ($204,22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) permet de titrer de manière très précise la solution de soude utilisée. De même, la solution de HNO₃ est ensuite titrée par la soude dont on vient de déterminer la concentration afin d'en déterminer précisément le titre.

IC6b) Procédure de dosage

L'analyse se fait préférentiellement sur un volume d'échantillon de 100ml afin d'augmenter le nombre de sites acides à titrer et donc de gagner en précision. La procédure d'analyse est automatisée grâce au logiciel Tinet 2,4 où la programmation par blocs de commande permet d'ajuster les quantités des solutions titrantes selon le pH de l'échantillon au cours de la mesure.

Le protocole utilisé s'appuie sur celui de Garnier *et al.* (2004c) avec l'utilisation de 3 à 4 blocs de commandes permettant tout d'abord d'amener l'échantillon du pH naturel à un pH = 2 afin d'éliminer les carbonates en le maintenant sous un bullage d'azote pendant une vingtaine de minutes. Ensuite, une première étape consiste à passer de pH = 2 à pH = 3,5, puis de 3,5 à 10,5 et enfin de 10,5 à 11,5 (à condition qu'il n'y ait pas de formation de précipités, ou de gels, empêchant d'atteindre cette dernière valeur) avec à chaque fois des additions de soude allant de 5 à 200 μ l et des temps de stabilisations adaptés (30 sec à 120 sec). Dans le cas de formation de précipités ou de gels, le titrage est interrompu juste avant leur formation.

Ensuite, les points expérimentaux dont les pH sont compris entre 2,5 et 10,5 à 11,5 (qui correspond au domaine de linéarité de l'électrode de pH) sont récupérés afin de fitter la courbe expérimentale et d'en tirer les constantes d'acidité et les concentrations en différents sites acides.

Afin d'obtenir ces données, le protocole de traitement utilisé est celui mis au point par Garnier C. (2004). Dans ce protocole, les données expérimentales obtenues (V_{NaOH} , pH), avant d'être traitées par le logiciel PROSECE (partie IB2d(2)) doivent subir certaines transformations permettant par exemple de connaître ou d'estimer la concentration totale en protons (H_T) ; ensuite, la densité totale en sites acides est calculée en comparant la courbe expérimentale à celle théorique que l'on aurait obtenue pour un même volume d'eau ultra pure.

Les données sont ensuite entrées dans le logiciel PROSECE où l'on réalise successivement des calculs de spéciation puis des optimisations des paramètres d'acidité jusqu'à atteindre une valeur d'erreur minimum entre la courbe modélisée et la courbe expérimentale. Lorsque cette valeur limite est atteinte, les valeurs de concentrations en sites acides ainsi que les constantes d'acidités représentatives de l'échantillon analysé sont obtenues.

Il faut noter que ce protocole n'est utilisable que sur des MOND concentrées et passées sur une résine d'échange cationique afin d'éviter la formation de précipités aux pH les plus basiques, due à la présence de magnésium. Cette procédure ne sera donc pas appliquée sur les échantillons naturels marins de MOND non concentrée.

IC7. Mesure du Carbone Organique Dissous (COD)

Afin de pouvoir estimer la quantité de MOND présente dans un échantillon, une mesure de Carbone Organique Dissous (COD), basé sur une oxydation thermique, est réalisée par un analyseur TOC-V (Shimadzu) muni d'un passeur d'échantillon ASI-V.

Cette mesure, aussi appelé Carbone Organique Non Purgeable (NPOC en anglais) du fait de la méthode utilisée, permet la mesure directe de l'ensemble des composés organiques dissous, à l'exception des composés organiques volatils, grâce à l'élimination des carbonates avant l'analyse.

Il faut souligner que cette mesure est une approche quantitative permettant uniquement de mesurer une quantité de carbone présente dans un échantillon, sans aucune information concernant la nature ou les propriétés des molécules présentes.

La courbe d'étalonnage utilisée (1 à 5 mg_C.L⁻¹) est faite à partir d'une solution d'hydrogénophthalate de potassium (PM: 204,22 g.mol⁻¹ dont 96 g de carbone). Ce composé organique est facilement soluble dans l'eau (80g.L⁻¹) et présente un point de fusion élevé (295-300°C), ce qui confère une bonne stabilité du produit dans le temps (peu biodégradable et peu volatil).

Les tubes en verre, nécessaires à l'analyse, sont tout d'abord lavés à l'acide nitrique 10% puis à l'eau milliQ, avant d'être passés au four à 450°C pendant 4h afin d'éliminer toute trace de carbone résiduel. Les tubes sont ensuite rincés 3 fois avec l'échantillon naturel filtré à 0,45 µm puis remplis avec ce dernier.

Avant la mesure, l'échantillon est acidifié avec de l'acide chlorhydrique 2 M puis purgé pendant 10 minutes avec de l'oxygène afin d'éliminer le carbone inorganique (CO₃²⁻) présent en solution d'après la réaction suivante : $CO_3^{2-} + 2H^+ \rightarrow H_2O + CO_{2(g)}$

20 à 100 µl d'échantillon sont ensuite introduits dans le tube à combustion en quartz muni d'un catalyseur de platine chauffé à 680°C. Le carbone présent dans l'échantillon se trouve alors décomposé en CO₂ qui est ensuite séché, passe dans un piège à halogénures puis est transporté grâce à un flux d'oxygène dans un détecteur infrarouge afin d'en déterminer sa teneur.

Le carbone étant le composé élémentaire majoritaire (~ 50%) de la MOND (Buffle J., 1988 ; Vetter T.A. *et al.*, 2007) ; la mesure de celui-ci est donc représentative de la quantité de matière organique dissoute initialement présente dans l'échantillon.

CHAPITRE II :
DEVELOPPEMENT DE PROTOCOLES
ANALYTIQUES

Chapitre II. Développement de protocoles analytiques

Le principal travail de thèse, réparti sur les deux premières années, a consisté à améliorer le système analytique existant de manière à mettre en place un système qui permette l'analyse d'échantillons naturels, principalement marins mais aussi estuariens, caractérisés par la présence de sels et de très faibles teneurs en MOND et métaux traces, par une méthode voltampérométrique.

Afin d'atteindre le but fixé, il a tout d'abord été nécessaire de faire quelques modifications sur l'appareillage utilisé afin de résoudre ou minimiser différents problèmes comme l'évaporation de l'échantillon lors des analyses qui peuvent durer plusieurs jours, les pollutions engendrées par le système de titration métallique, ou encore l'adsorption d'une partie du métal ajouté sur le système analytique.

Ensuite, une fois le système en place, il a fallu encore régler différents problèmes électrochimiques, comme l'adsorption de substances actives à la surface de l'électrode de travail qui déforme les pics voltamétriques et empêche une bonne détermination de la concentration de métal mesuré. Il a ensuite encore fallu trouver une manière de traiter les signaux obtenus (ligne de base et intégration des pics) afin de déterminer de la façon la plus correcte possible les aires des pics expérimentaux obtenus, surtout à de très faibles concentrations. Un des paramètres très important auquel il faut accorder beaucoup d'intérêt est la bonne détermination de la sensibilité de la technique vis-à-vis de l'échantillon permettant de calculer la concentration en métal correspondante réellement à l'intensité mesurée. En effet, une mauvaise détermination de cette sensibilité entraînera systématiquement une erreur sur les concentrations métalliques mesurées et donc ensuite sur les paramètres pouvant être calculés.

Et enfin, il a fallu mettre en place le protocole permettant de caractériser les interactions d'un métal avec de la matière organique dissoute (MOND) directement à partir de l'échantillon naturel, en opposition avec les techniques utilisant des étapes de pré-concentration de l'échantillon et conduisant soit à des pertes, soit à des modifications importantes de la structure de la MOND.

IIA. Mise au point et améliorations de l'appareillage

IIA1. Problème d'évaporation de l'échantillon

Tout d'abord, les manipulations prévues, comme les ajouts logarithmiques, ou bien les pseudopolarogrammes, sont des expériences qui peuvent s'étendre sur plus de 24 heures ; un problème d'évaporation de l'échantillon a alors rapidement été mis en évidence. Celui-ci est en fait principalement dû à un flux d'azote continu balayant le dessus de notre solution.

Ce problème déjà soulevé lors de la thèse de Garnier C. en 2004 avait entraîné l'essai d'un système de bullage externe mais qui conduit malheureusement à une corrosion rapide des électrovannes, rendant le système inutilisable. La solution finale utilisée afin de minimiser cette évaporation avait consisté à maintenir la solution à 25°C, grâce notamment à la mise en place d'une climatisation dans la salle et à la diminution du débit d'azote.

Malgré ces mesures, il existait toujours une évaporation non négligeable de l'échantillon, peut être accentuée, dans cette étude, par l'utilisation d'une cellule en téflon ne permettant pas de thermostatier la solution.

La solution adoptée au cours de cette étude consiste en une déviation du flux d'azote grâce à un simple raccord en T (**Figure II-1**) permettant de séparer le flux d'azote hydraté du flux d'azote non hydraté en amont du système voltamétrique.

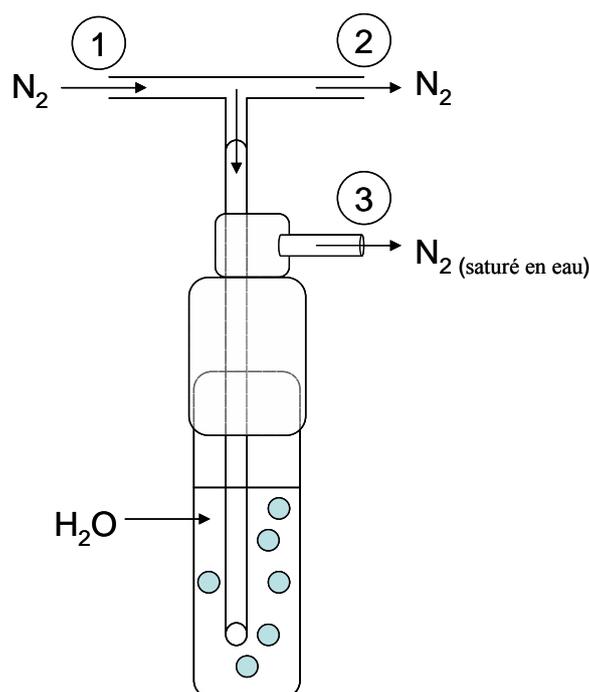


Figure II-1 : Montage utilisé pour diviser le flux d'azote en 2 en amont du stand de polarographie afin de limiter l'évaporation de l'échantillon par bullage dans de l'eau milliQ

Ainsi, une partie de l'azote non hydraté 1 et 2 sur la **Figure II-1** va pouvoir alimenter le système d'électrovannes sans causer de corrosion tout en conservant une pression d'azote suffisante afin d'entraîner la percussion correcte du système d'aimants contre le capillaire, responsable du bon renouvellement de la goutte.

La deuxième sortie du T est raccordée à un tube rempli d'eau ultra pure ; le bullage dans ce système permet de produire de l'azote saturé en eau (**Figure II-1, 3**) utilisé pour balayer le dessus de la solution en diminuant fortement l'évaporation et tout en conservant un débit

suffisant afin d'éviter la présence d'oxygène dans la cellule. Ce système s'est avéré efficace sur des manipulations de plusieurs jours (7 jours) avec une variation du volume de l'échantillon négligeable (évaporation inférieure à 5% mesurée par pesée de l'échantillon après 7 jours d'expérience).

Le système Metrohm VA 797, adapté à des analyses de routines plutôt qu'à de la recherche, pallie à ce problème en présentant 2 systèmes de saturation en eau du N₂ en aval des électrovannes, solution malheureusement pas retenue par Metrohm sur le système VA 663 utilisé dans cette thèse.

IIA2. Problèmes de précision et de pollution

Ensuite, la plus grande partie du travail d'amélioration du système utilisé, a consisté à trouver une solution permettant de pouvoir utiliser convenablement la technique d'ajouts logarithmiques de métal (Garnier C. *et al.*, 2004a) avec surtout une précision en volume suffisante.

Le principal problème rencontré jusqu'ici a été la pollution causée par les 3 burettes utilisées, contenant chacune des concentrations très différentes (un facteur 10 minimum en concentration), sur les premiers ajouts métalliques de faible concentration (de l'ordre du nM). En effet, les concentrations utilisées allant, pour des échantillons marins naturels, de 1µM à 100µM, il faut absolument éviter toute contamination de la chambre d'ajout d'une burette par une autre.

Le principal problème réside dans le fait que le système d'ajout développé par Metrohm, consiste à relier tous les tubes d'additions au niveau du système (Téflon) de purge d'azote. Il a fallu ainsi régler de nombreux problèmes :

- Le volume ajouté doit être correct :

En effet, la chambre d'ajout présente un volume mort assez important ne permettant pas l'addition correcte de faibles volumes. Pour cela, des billes de téflon avaient été rajoutées dans le système afin de réduire ce volume mort (**Figure II-2**).

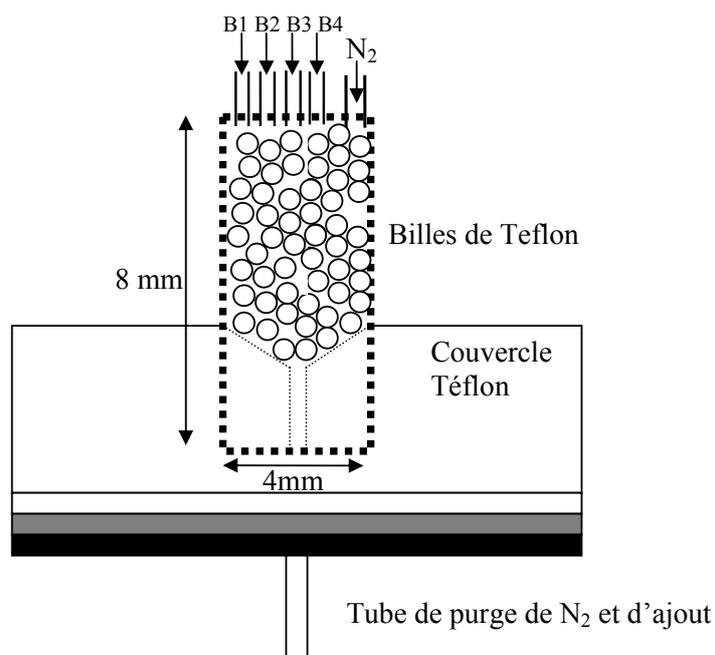


Figure II-2 : Système d'ajout Initial avec le volume mort comblé par des billes en Téflon

Ce système a bien résolu le problème du volume mort, mais celui-ci a fait apparaître une pollution importante des ajouts de la burette 1 (100 fois moins concentrée que la burette 3) par diffusion des autres burettes, ce qui rendait les premiers ajouts imperceptibles, vu la pollution causée par les autres burettes, entraînant par conséquent des résultats d'analyses inutilisables.

- Limiter au maximum la pollution des burettes entre elles :

Dans le cas précédent, la contamination provenait sûrement du passage des ajouts de faibles concentrations contre les capillaires d'ajouts de plus fortes concentrations. Pour cela, les billes de Téflon ont été retirées et les micro-tubes décalés de façon à ce qu'à la fois, ceux-ci combrent une grosse partie du volume mort, mais aussi que la solution délivrée par la burette la moins concentrée ne s'écoule plus le long des autres tubes (**Figure II-3**).

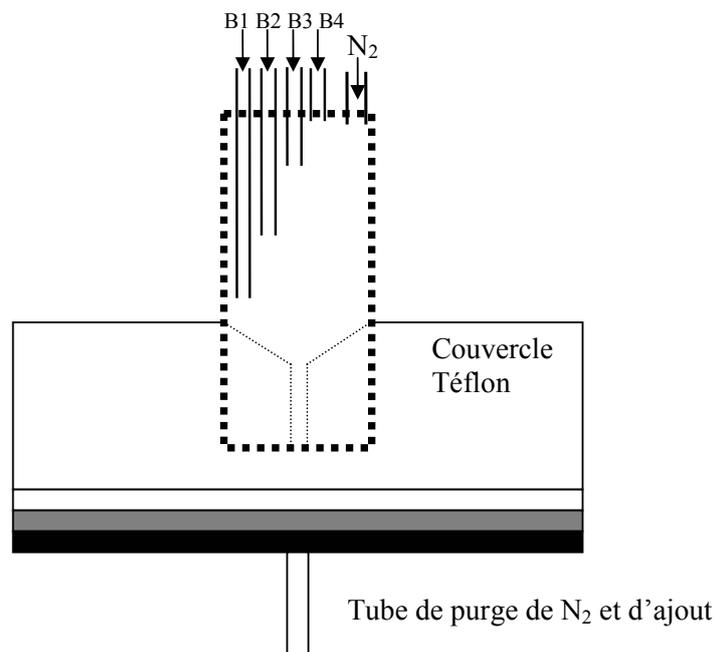


Figure II-3 : Système d'ajout numéro 2 avec les tubes d'ajout en décalé pour éviter la contamination causée par la burette la plus concentrée sur les autres

Ceci a bien réglé le problème de contamination, mais les premiers volumes distribués, pour les burettes 2 et 3, devenaient alors incorrects dû à un volume mort restant trop important, bien que le décalage des tubes ait déjà réduit celui-ci.

- Réduire le volume mort et limiter le contact des burettes :

Les billes de Téflon ont alors été réintroduites dans la chambre d'ajout (**Figure II-4**), et plusieurs tests ont été réalisés jusqu'à obtenir des volumes ajoutés corrects pour les premiers ajouts de chaque burette. Pour ce faire, les tests sont réalisés dans de l'eau milliQ afin de pouvoir contrôler la linéarité du signal obtenu.

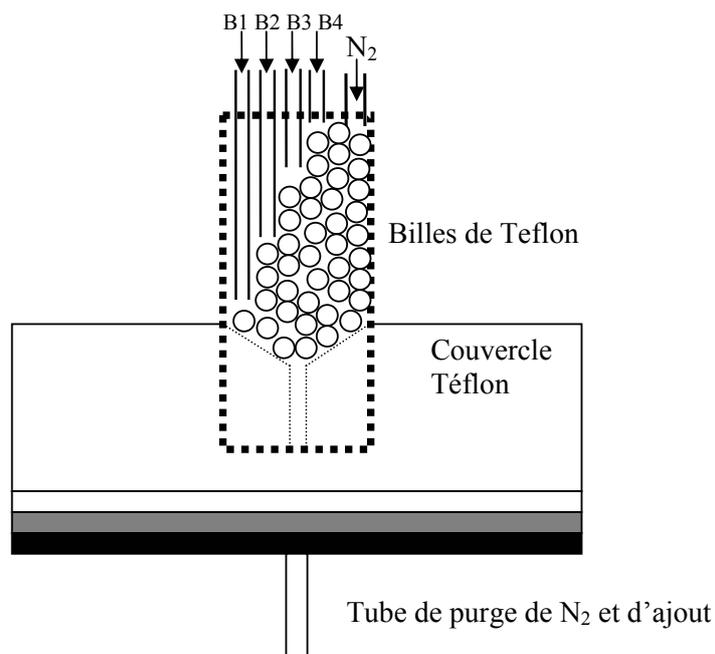


Figure II-4 : Système d'ajout numéro 3 avec à nouveau les billes téflon et les tubes d'ajout décalés

Cependant, après interprétation, les résultats montraient toujours une pollution rémanente pour les premiers ajouts ; ceci nous a amené à dire qu'une certaine quantité de solution assez concentrée devait rester dans la chambre d'ajout. Il a donc été nécessaire de mettre en place un système de nettoyage de celle-ci.

Tout d'abord, un nettoyage manuel a été essayé à l'aide d'une seringue remplie d'acide nitrique 10%, mais la vitesse d'ajout était alors trop importante et menait à une diffusion de l'acide dans les autres burettes.

Ensuite, la burette 4, remplie d'acide nitrique 10% a été branchée sur le dernier tube restant de la chambre d'ajout et placé au dessus de tous les autres tubes afin d'obtenir un nettoyage complet de la chambre d'ajout. En suivant la concentration du métal considéré, dans un échantillon d'eau milliQ, au cours d'ajouts de 40 μ l d'acide nitrique 10%, nous pouvons alors savoir à partir de quel moment la chambre peut être considérée comme propre, lorsque l'on observe une stabilisation du signal.

Ce système, considéré comme le plus efficace pouvant être obtenu avec les burettes Metrohm utilisées, n'a malheureusement pas, non plus, pu être conservé.

En effet, les burettes ne permettaient toujours pas d'ajouts de faibles volumes suffisamment corrects avec des seringues de 5ml pour des ajouts d'une dizaine, ou même d'une vingtaine de microlitres. Un système d'ajout externe faisant arriver directement les tubes au dessus de la solution, sans passer par la chambre d'ajout, a été expérimenté. Mais celui-ci n'a pas, non plus, montré de résultats satisfaisants. En effet, la vitesse d'ajout des burettes était alors insuffisante pour faire tomber avec reproductibilité les volumes ajoutés (des gouttes de l'ordre de 10 à 20 μ l restaient accrochées aux tubes), même avec la mise en place d'un système sur l'électrode de travail qui permettait de venir heurter les tubes d'ajout pour faire tomber systématiquement les gouttes restant pendues, et qui s'est traduit par un changement de la sensibilité de la technique pouvant évoluer durant la titration.

Enfin, malgré les nombreux tests effectués et faute de pouvoir travailler dans des conditions satisfaisantes avec les burettes Metrohm existantes, la solution finalement adoptée a consisté à changer de système d'addition, occasionnant quelques tests supplémentaires.

Comme il n'existe pas de burettes de faibles volumes sur le marché, compatibles avec le stand utilisé. Il a donc été nécessaire de trouver des pompes (= burettes) pouvant commander des seringues de 100 à 500 μ l et de les adapter au système d'exploitation utilisé afin de pouvoir ensuite les commander grâce à un programme (Dario Omanović, IRB, Croatie) compatible avec le logiciel GPES utilisé, dans le but de réaliser les ajouts d'un volume précis au moment voulu.



Figure II-5 : Pompes (burettes) XE 1000 (TECAN) munies de seringues de 100 ou 500 μ l utilisées pour les ajouts en mode logarithmique en voltamétrie

Les pompes XE 1000 de la société TECAN (**Figure II-5**) conviennent parfaitement à notre but analytique. Une fois le système assemblé et enfin mis en place, il a été testé puis déclaré conforme à nos attentes.

Avec ce système, les volumes distribués peuvent en effet maintenant atteindre 10 μ l avec une erreur maximale observée de 5% ou voire même jusqu'à 5 μ l avec une erreur maximale de 12%. Les volumes utilisés dans cette étude commenceront donc aux alentours de 15 μ l (3% d'erreur maximale observée) afin de minimiser au maximum les erreurs sur les faibles volumes injectés.

Ces valeurs sont en aucun cas comparables à celles pouvant être obtenues avec l'ancien système de burettes Metrohm qui n'étaient à priori pas prévues pour être employées avec de si faibles volumes (10 à 20 μ l) pour lesquels on obtenait des erreurs de plus de 100% et non reproductibles.

IIA3. Problème de l'adsorption du système à pH naturel

L'étude des métaux à l'état de traces nécessite, comme nous avons pu le voir, d'éviter toute contamination de l'échantillon ou du système analytique ; cependant un problème bien plus compliqué à prendre en compte, est le problème de l'adsorption du métal sur le système électrochimique.

En effet, le phénomène d'adsorption du métal sur le système lors de l'analyse d'un échantillon naturel est peu discernable du phénomène de complexation. Van Elteren J.T. et Woroniecka D.W. (2003) ont développé une méthode de correction basée sur la détection du ^{64}Cu sur les différentes parties du système expérimental et ont montrés par exemple qu'une cellule en verre borosilicaté pouvait adsorbé plus de 25 % du métal ajouté. Cependant, dans le cadre de notre étude sur des échantillons naturels, il n'est pas possible de différencier le métal directement adsorbé sur les parois du système de celui associé à un système ternaire métaux/matière organique/parois. Nous ne pouvons donc qu'essayer de limiter l'adsorption par l'emploi de matériaux reconnus comme étant « inertes » chimiquement.

Ce phénomène, trop souvent non pris en compte dans la littérature, a tout de même été observé par certains auteurs (Cuculic V. et Branica M., 1996 ; Omanovic D. *et al.*, 1997 ; Van Elteren J.T. et Woroniecka D.W., 2003) qui ont tous reporté une forte adsorption engendrée par l'emploi de cellule en verre borosilicaté, mais aussi d'électrode de référence en verre, ou de stirrer et tube de purge en plastique.

Nous avons donc utilisé dans notre étude une cellule en Téflon, un tube de purge en téflon pour remplacer celui d'origine, un stirrer en PTFE d'origine, et une électrode de référence en PTCFE (Poly Tetra-ChloroFluoroEthylene) à la place de celle en verre.

Après avoir réalisé des tests d'adsorption, indépendamment sur la cellule puis sur le reste du système, la cellule en téflon n'a montré aucune adsorption notable (<1%) pouvant influencer les résultats, tandis qu'une partie pouvant aller dans le pire des cas jusqu'à 30% (pour 200nM de cuivre ajouté), en l'absence de compétition par la MON, a tout de même pu être observée sur le système d'électrodes. Ceci pourrait principalement être dû à l'emploi du capillaire en verre, utilisé comme électrode de travail et pour lequel il n'existe aucune autre alternative. Ce dernier ne pouvant être remplacé, il a été décidé de minimiser le volume d'échantillon à 20 ml, afin d'une part, de diminuer au maximum le volume d'échantillon en contact avec les composants plongeants dans la solution, et, d'autre part, de travailler toujours avec un volume de solution constant d'une expérience à l'autre. Ceci permet d'avoir toujours une surface d'adsorption du système au contact de la solution comparable entre les différentes expériences et donc de pouvoir dans tous les cas comparer les échantillons entre eux.

Personne n'ayant à ce jour pu réellement réglé le problème de l'adsorption, les résultats seront néanmoins comparables à ceux déjà obtenus dans la littérature dans des conditions analytiques similaires.

Le problème d'adsorption du cuivre (phénomène non observé lors de test identiques avec le cadmium) ayant été soulevé dans cette étude, toutes les expériences ont été réalisées de manière à diminuer autant que possible ce phénomène, mais une étude beaucoup plus approfondie serait tout de même nécessaire afin de pouvoir éliminer ou du moins quantifier, selon les paramètres physico-chimiques des échantillons analysés, les propriétés d'adsorption du système.

Il est aussi intéressant de noter que des expériences ayant été réalisées sur du matériel différent et pour un même échantillon (IVB1a) n'ont pas montré d'écarts significatifs, malgré les différences d'adsorption pouvant être attendue par l'emploi de matériel quelque peu différent.

Pour des analyses d'échantillons salins, on peut s'attendre à ce que la présence des cations majeurs diminue significativement l'adsorption du cuivre sur le système par un effet de compétition.

IIB. Utilisation d'une étape de désorption des substances actives de surface

La technique de DPASV est soumise à de nombreuses interférences pendant les réactions redox mises en jeu, pouvant fortement influencer la détermination des paramètres de complexation de la MOND vis-à-vis des métaux étudiés. Une des principales interférences mise en évidence est l'adsorption de substances actives de surfaces (SAS) sur l'électrode de mercure. Cette partie du développement analytique a donné lieu à une publication dans *Analytica Chimica Acta* (Louis Y. *et al.*, 2008, **Annexe 4**).

La MOND contient généralement des quantités de SAS non négligeables (Hunter K.A. et Liss P.S., 1982) obligeant à prendre quelques précautions lors des analyses d'échantillons de MOND par DPASV. De plus, il est déjà reconnu dans la littérature que les SAS influencent principalement et fortement les réactions avec le cuivre (Scarano G. et Bramanti E., 1993), et qu'une désorption peut avoir lieu pour des potentiels très négatifs, ce qui peut être utile pour les mesures de DPASV (Bruland K.W. *et al.*, 2000). Malheureusement, cette technique n'est actuellement pas largement appliquée dans les mesures environnementales.

Chaque interférence observée affectant les mesures de DPASV se traduit par des erreurs dans les résultats de spéciation, entraînant ensuite un biais plus ou moins important dans les valeurs utilisées dans des bases de données.

Dans cette partie, l'objectif du travail a été de limiter au maximum les interférences dues aux SAS durant les mesures de DPASV réalisées par la suite sur les échantillons de MOND.

Les échantillons utilisés dans cette partie ont été prélevés dans l'estuaire du Gapeau (Salinité 35, Hyères, France), ainsi que dans un petit port de l'île Prvić (salinité 38, Šepurine, Croatie) et sur l'estuaire de la Krka (Salinité 24, Šibenik, Croatie).

IIB1. Influence du potentiel de dépôt (E_{acc}) sur les SAS

L'échantillon utilisé ici est celui de l'estuaire du Gapeau.

Tout d'abord, afin de mieux comprendre le phénomène d'adsorption des SAS sur l'électrode de travail, il faut utiliser la technique de voltamétrie AC (Alternating Current) en phase qui permet de séparer le signal faradique du signal capacitif par l'emploi d'un potentiel sinusoïdal surimposé à la rampe de balayage linéaire. Cette technique peut être utilisée afin de quantifier, et même de caractériser, les SAS présentes en solution (Gašparović B., *et al.*, 2007). Le principe utilisé est la mesure du courant capacitif au potentiel de charge nul (autour de -0,6V), qui est celui où se produit le maximum d'adsorption sur la goutte de mercure, car celle-ci n'est pas chargée à ce potentiel, pour un potentiel d'accumulation couramment utilisé de -0,6V pendant différents temps d'accumulation.

Afin de trouver le potentiel d'accumulation le mieux adapté permettant la désorption des SAS, une expérience avec différents potentiels d'accumulation a été mise en place avec une mesure de l'intensité aux alentours de -0,6V. La **Figure II-6** présente les 3 expériences réalisées, permettant de mettre en évidence la formation d'un film de surface sur l'électrode de travail empêchant de correctement interpréter les mesures effectuées sur le cuivre à un potentiel de dépôt autour de -0,6V.

Tout d'abord, nous avons déterminé (courbe 1 encart **Figure II-6**) un temps de dépôt suffisant afin de pouvoir observer l'adsorption des SAS. Les résultats obtenus avec un temps de dépôt de 60 secondes permettent d'observer une différence importante sur le courant capacitif et donc une adsorption notable de SAS durant la première minute.

Etant donné que le potentiel de dépôt utilisé lors des mesures du cuivre se trouve autour de -0,6V, qui correspond au potentiel de charge nul où le maximum d'adsorption est attendue, on comprend mieux ici, voyant la courbe 1 (**Figure II-6**), que la mesure du cuivre se trouve alors grandement affectée par la présence de SAS sur l'électrode de travail. C'est en effet bien à ce potentiel de -0,6V que la courbe 1 présente la plus forte différence d'intensité, entraînée par l'adsorption de MOND à la surface de l'électrode de travail.

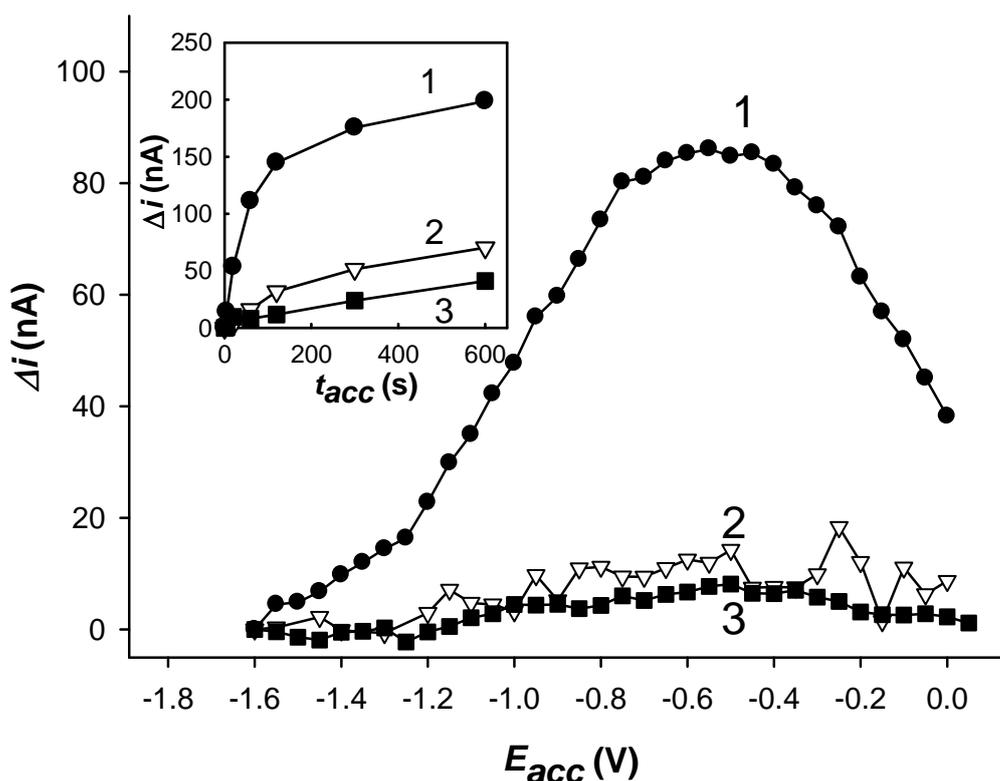


Figure II-6 : Différence observée sur le courant capacitif (mesuré à -0,6V) en fonction du potentiel d'accumulation (E_{acc}) utilisé pour l'échantillon du Gapeau (salinité 35) avec un temps d'accumulation de 60 s. (1) sans et (2) avec 1 seconde à -1,6V à la fin du potentiel d'accumulation (avec -1,6V utilisé comme potentiel de référence ou l'adsorption est mineure). (3) échantillon passé aux UV sans 1 s à -1,6V. Encart : Evolution du courant capacitif en fonction du temps d'accumulation : (1) $E_{acc} = -0,6$ V; (2) $E_{acc} = -0,6$ V et $E_{acc} = -1,6$ V pendant 1 s; (3) $E_{acc} = -1,6$ V. Paramètres : $F = 75,12$ Hz, $t_{mod} = 0,21$ s, $t_{int} = 0,61$ s, angle de phase = 90°

La courbe 3 a été obtenue en passant l'échantillon du Gapeau utilisé lors de cette étude aux UV durant 14H (450W), détruisant donc les SAS présentes dans l'échantillon et pouvant donc être utilisée comme référence. La courbe 1 représente l'échantillon marin pour différents potentiels de dépôt allant de -1,6V à 0V. On observe donc ici aux alentours de -0,6V, un maximum d'adsorption des SAS, le minimum étant observé en limite de la fenêtre analytique à -1,6V.

La deuxième expérience a donc consisté à employer un potentiel de dépôt supplémentaire à celui de 60s utilisé, d'une durée de 1 seconde au potentiel très négatif de -1,6V. La courbe 2 ainsi obtenue montre que quasiment toute la couche de SAS subit une désorption car les résultats sont comparables à ceux obtenus dans l'expérience de référence (**Figure II-6**, courbe 3). Il subsiste cependant (encart **Figure II-6** courbe 2) encore un peu de SAS sur l'électrode de mercure, ce qui est beaucoup plus visible pour des temps de dépôts plus importants.

La grande majorité des SAS se trouve largement désorbée par l'emploi d'un temps court (1s) à un potentiel très négatif (-1,6V). Cette méthode sera utilisée par la suite afin de détruire la couche de SAS présente à la surface de l'électrode.

II B2. Influence des SAS sur l'analyse du cuivre par ASV

La **Figure II-7** montre les différents voltamogrammes obtenus sur l'échantillon du Gapeau pour différentes conditions expérimentales de dépôt permettant de mettre en évidence l'influence des SAS sur les mesures de cuivre par DPASV.

Les mesures ont été réalisées sans addition de cuivre car l'échantillon présentait déjà naturellement une concentration en cuivre totale suffisamment élevée ($1,4 \times 10^{-7} \text{M}$). Après avoir déterminé le potentiel de dépôt adéquat permettant la mesure du métal labile (-0,45V) par pseudopolarographie, différentes expériences représentées par les 3 courbes sur la **Figure II-7** ont été réalisées.

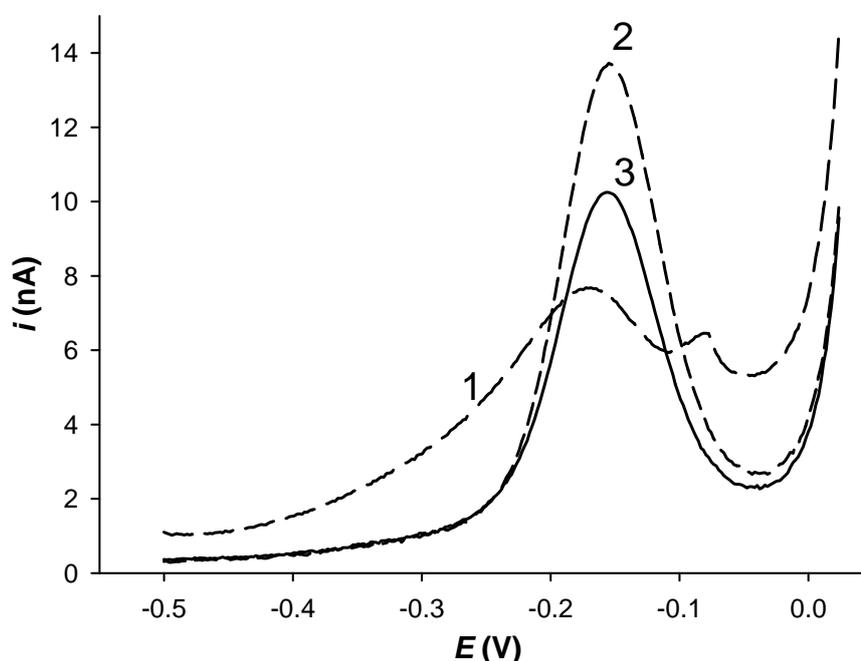


Figure II-7 : DPAS voltamogrammes du cuivre dans l'échantillon du Gapeau (salinité 35) obtenus avec les paramètres expérimentaux suivants : (1) $t_{\text{acc}} = 300 \text{ s}$ à $E_{\text{acc}} = -0,45 \text{ V}$; (2) $t_{\text{acc}} = 300 \text{ s}$ à $E_{\text{acc}} = -1,6 \text{ V}$; (3) $t_{\text{acc}} = 297 \text{ s}$ à $E_{\text{acc}} = -0,45 \text{ V}$ et $t_{\text{acc}} = 3 \text{ s}$ à $E_{\text{acc}} = -1,6 \text{ V}$

En DPASV, l'intensité du pic de cuivre en présence de chlorure, pour une même concentration, est 2 fois moins intense que pour une eau sans chlorures. Contrairement à ce qui se passe en l'absence de chlorure, la réaction d'oxydation du cuivre à la goutte en présence de chlorure, a lieu *via* un intermédiaire monovalent, Cu(I), (Plavšić M. *et al.*, 1994). Ceci produit un déplacement du pic vers des potentiels plus négatifs et une largeur à mi hauteur correspondante à un transfert d'un seul électron (environ 85 mV). L'oxydation directe du Cu (II) se produit aussi, mais pour des potentiels plus positifs, au-delà du mur de réoxydation du mercure.

La courbe 1, correspondant au type d'expérience couramment réalisée dans la littérature sur un échantillon marin, est obtenue grâce à un potentiel de dépôt de -0,45V pendant 300 secondes. Le pic d'oxydation du cuivre apparaît alors à un potentiel de -0,17V pour une largeur à mi hauteur de 115mV, ce qui est plus large que prévu (**Figure II-7**, courbe 1). Ce type de pic proche du mur d'oxydation du mercure, avec une ligne de base assez haute et avec

une base très évasée est assez difficile à intégrer. De plus, un petit pic peut être observé du côté anodique du pic principal ; ce genre de pic est souvent observé dans les analyses de complexation du cuivre utilisant la technique de l'ASV (Scarano G. et Bramanti E., 1993 ; Boussemart M. *et al.*, 1993). Sa largeur très faible indique qu'une réaction non faradique de surface a lieu, due à une couche adsorbée à la surface de l'électrode de travail.

La courbe 2 représente le même échantillon mesuré avec un potentiel de dépôt très négatif de -1,6V pendant 300 secondes. Comparativement à la courbe 1, un pic d'oxydation beaucoup plus prononcé d'une intensité 3 fois supérieure au pic 1 peut être observé, ainsi qu'un courant de base plus faible et d'une largeur à mi hauteur de 85mV correspondant bien à un transfert électronique réversible d'un électron. Cependant, à des potentiels aussi négatifs, il peut se produire la réduction de complexes métalliques inertes (Omanović D. *et al.*, 1996). C'est pourquoi, pour les analyses de capacités complexantes, il est utile de déposer uniquement le métal labile sans détruire les complexes inertes ; on ne peut donc pas utiliser uniquement ce potentiel négatif par la suite.

La courbe 3 est obtenue en utilisant un potentiel de dépôt de -0,45V pendant 297 secondes puis un second potentiel de dépôt plus négatif de -1,6V pendant 3 secondes (<1% du temps total de dépôt). Un pic d'oxydation d'une forme très voisine du pic 2 est ainsi obtenu. La hauteur du pic décroît d'environ 30% comparée à la courbe 2 tandis que la largeur de pic à mi-hauteur reste quasiment inchangée (87mV).

Il est donc évident que le fait d'appliquer ce potentiel très négatif pendant même moins de 1% du temps de dépôt total, change/clarifie radicalement les processus électrochimiques se produisant à la surface de la goutte de mercure.

On peut supposer que la couche de SAS adsorbée à la surface de l'électrode de travail gêne les réactions électrochimiques du cuivre pendant la phase de ré-oxydation, alors que, l'application de ce potentiel très négatif engendre la désorption de cette couche de SAS, permettant alors d'observer la ré-oxydation du cuivre sans interférences majeures (**Figure II-7**, courbe 3).

II B3. Influence de l'étape de désorption sur les pseudopolarogrammes

Les pseudopolarogrammes sont principalement caractérisés par la position du ou des pics du métal considéré, *i.e.* leur potentiel de demi vague, l'intensité du courant limite, ainsi que la forme du pseudopolarogramme. Suivant les espèces présentes en solution, il peut être observé une ou plusieurs vagues pseudopolarographiques caractérisées par leur potentiel de dépôt (Omanović D., 2006). La vague la plus positive représente la réduction du métal labile /libre dont la position est dépendante des concentrations en ligands. La réduction du métal plus fortement complexé, ou de complexes métalliques inertes, se produit à des potentiels plus négatifs de quelques centaines de millivolts.

Le but de ces expériences est de montrer les influences des phénomènes de surface engendrés par les SAS sur les caractéristiques des pseudopolarogrammes, que ce soit leur forme, la position, ainsi que la largeur à mi-hauteur de chacun des pics servant à leur construction.

Les expériences ont été menées sur un échantillon d'eau de mer (port de Prvić, Croatie) avec une concentration naturelle en cuivre relativement élevée ($1,8 \times 10^{-7} \text{M}$), permettant de travailler sans addition supplémentaire de métal. Les pseudopolarogrammes sont obtenus avec ou sans l'emploi des 3 secondes à -1,6V (**Figure II-8**).

Afin d'éviter les changements de conditions de l'échantillon pendant la durée de la mesure (une dizaine d'heures), les polarogrammes ont été enregistrés alternativement pour un même potentiel, avec et sans les 3 secondes à -1,6V.

La courbe 1 représente le pseudopolarogramme obtenu sans l'étape de désorption à -1,6V après le potentiel de dépôt, et la courbe 2 le même pseudopolarogramme obtenu avec l'étape de désorption pendant 3 secondes à -1,6V après le potentiel de dépôt. La différence entre ces 2 expériences est assez claire : l'étape de désorption permet de différencier nettement 2 vagues bien définies. La première à un potentiel de -0,2V indique la réduction des complexes de cuivre labiles/libres ; ensuite, un plateau entre les potentiels de -0,4 et -1,15V signale qu'aucune nouvelle espèce de cuivre n'est réduite sur cette gamme de potentiel ; et enfin, pour des potentiels inférieurs à environ -1,15V, où le courant augmente sur une rampe d'environ 300mV, plusieurs hypothèses peuvent être émises. Celle qui est retenue est la réduction d'un groupe de complexes inertes avec de grandes constantes de stabilité comme récemment observé par Tsang J.J. *et al.* (2006) dans le cas du cadmium. L'hypothèse de la formation d'un complexe intermétallique avec le zinc qui serait à la source de l'augmentation de la hauteur de pic du cuivre a été écartée (Chakraborty P. *et al.*, 2007 ; Town R.M. et Van Leeuwen H.P., 2006). En effet, s'il y avait eu la formation d'un composé intermétallique formé de cuivre et de zinc, le pseudopolarogramme du cuivre devrait montrer un début d'augmentation du potentiel pour des potentiels d'accumulations plus positifs, identiques à ceux observés pour la vague de zinc (**Figure II-8.a**).

En observant les graphiques de la **Figure II-8**, on peut voir que l'effet de l'étape de désorption sur les SAS est beaucoup plus faible à partir du potentiel de -1,4V, et qu'il diminue ensuite fortement avec le potentiel d'accumulation, jusqu'au potentiel de charge nul (-0,6V), ce qui est surtout visible sur la **Figure II-8.c** montrant l'évolution de la largeur à mi hauteur du pic. Pour des potentiels plus positifs que -0,2V, la hauteur du pic diminue (**Figure II-8.a**) et on observe un shift dans le potentiel du pic (**Figure II-8.b**) représentant la vague de réduction du cuivre labile.

L'importance de l'emploi de cette étape de désorption est ainsi bien mis en évidence sur les courbes 2 des **Figure II-8.b** et **c**, qui montrent un potentiel de pic ainsi qu'une largeur à mi hauteur reproductible tout au long du pseudopolarogramme, ce qui n'est pas le cas sur les courbes 1 obtenues sans cette étape où l'on peut voir que les signaux sont largement modifiés par la présence des SAS.

Ces expériences montrent donc, encore une fois, la forte perturbation provoquée par les SAS sur le signal du cuivre durant les processus d'oxydation. Le but de notre étude étant l'interaction du cuivre avec les ligands organiques en solution, il est alors nécessaire d'éliminer ces interférences afin de pouvoir correctement caractériser les interactions métaux traces-MOND dans des échantillons naturels.

Comme nous allons le voir, de telles interférences peuvent mener à une détermination incorrecte des paramètres de complexation des échantillons analysés ; ce qui peut avoir de fortes conséquences lors de l'utilisation de ces données dans des logiciels de modélisation de la spéciation métallique dans l'environnement.

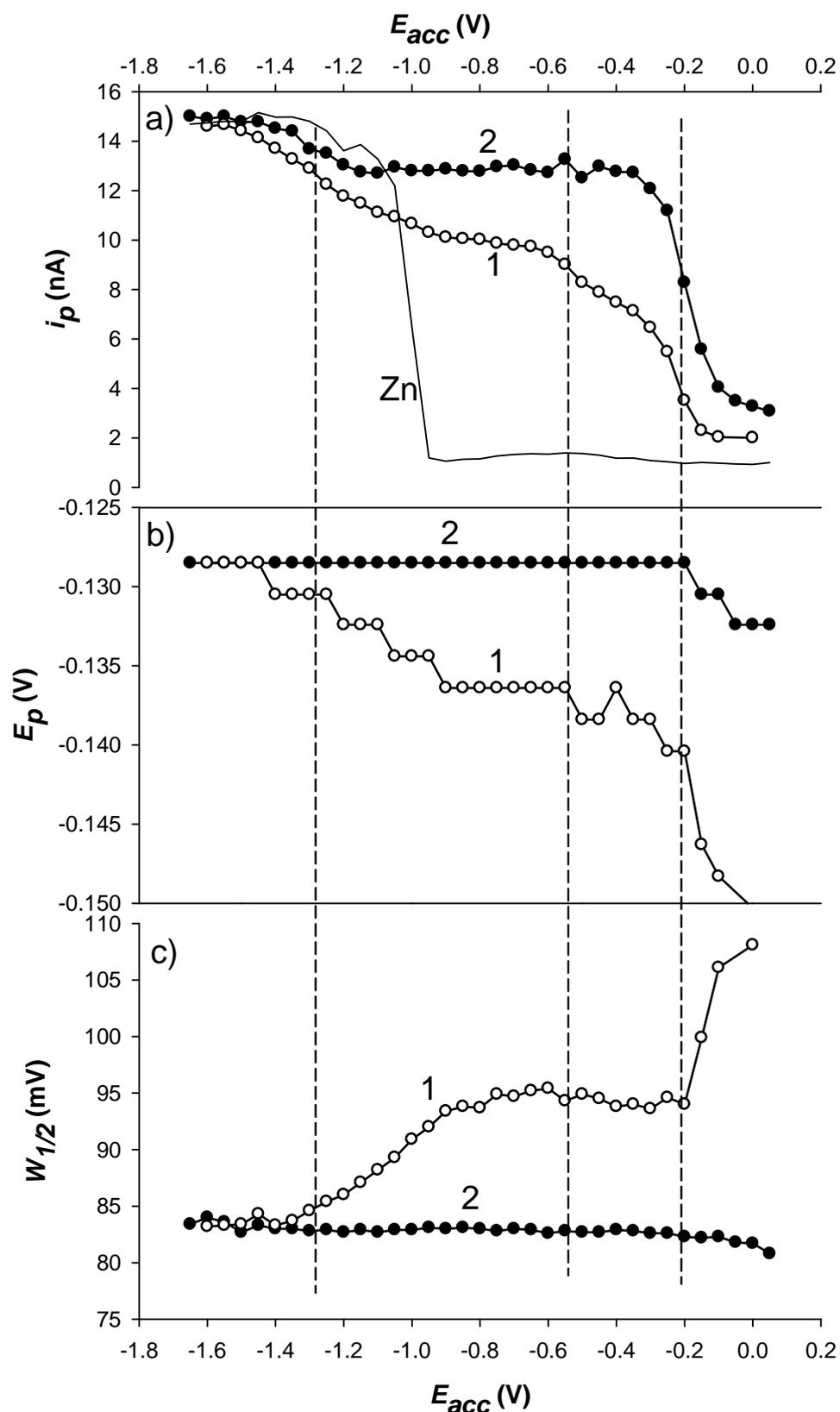


Figure II-8 : Pseudopolarogrammes du cuivre obtenus pour un échantillon d'eau de mer sans (courbes 1) et avec (courbes 2) l'étape de désorption à $-1,6$ V pendant 3 secondes. Sont exprimés en ordonnée : la hauteur du pic (a), le potentiel du pic (b) et la largeur à mi hauteur du pic (c). Le temps de dépôt est de $t_{acc} = 300$ s. La courbe en trait plein dans la Figure (a) correspond au pseudopolarogramme du zinc réalisé dans un second échantillon (le courant du pic du zinc a été normalisé de façon à pouvoir être comparé à celui du cuivre)

II B4. Influence des interférences causées par les SAS sur la détermination de capacités complexantes

Comme il a été démontré dans la partie précédente, les SAS interfèrent avec les signaux de ré-oxxydation du cuivre et peuvent mener à des résultats biaisés des paramètres de caractérisation de la MOND comme la capacité complexante dans les études environnementales.

La **Figure II-9 a** montre un exemple de détermination des capacités complexantes vis à vis du cuivre pour un échantillon d'eau estuarienne (Šibenik, salinité 24, Croatie), utilisant, ou non, l'étape de désorption vue précédemment. Les courbes 1 représentent les expériences menées sans l'étape de désorption, et les courbes 2 représentent ces mêmes expériences avec l'étape de désorption de 3 secondes imposée dans cette série d'expériences à -1,65V à la fin du potentiel de dépôt de 297 secondes à -0,5V. Ce dernier potentiel a été déterminé à partir du pseudopolarogramme de la **Figure II-8** (courbes 2), où pour cette valeur, seul le cuivre labile est réduit durant l'étape de dépôt.

Encore une fois, la différence entre les 2 expériences est évidente. Les graphiques b et c montrent que le signal du cuivre a un potentiel et une forme différente lorsque l'étape de désorption n'est pas employée ; mais le plus important à noter ici est la variation observée sur les intensités de courant des pics mesurés (**Figure II-9 a**).

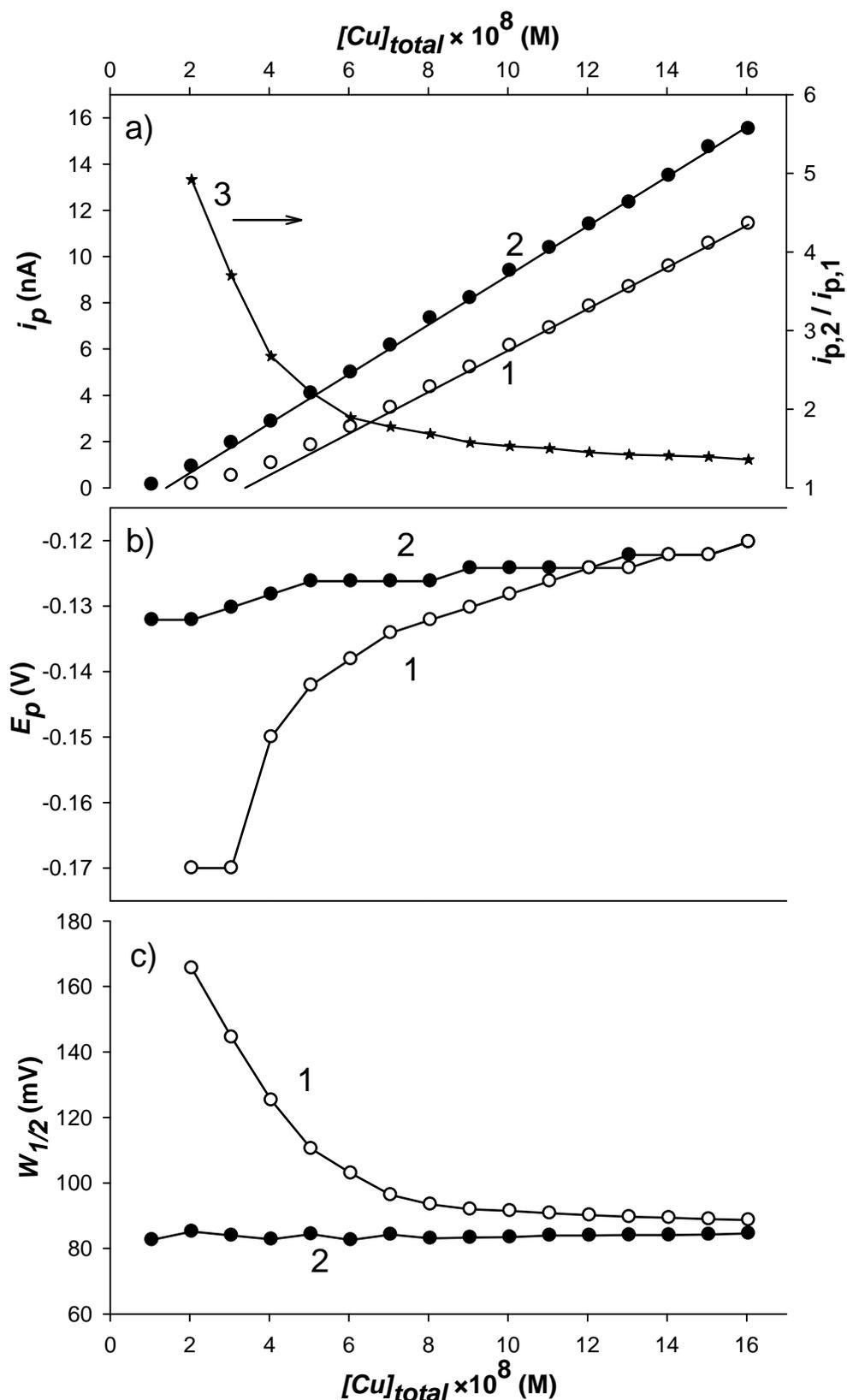


Figure II-9 : Courbes de titration d'une eau estuarienne pour la détermination de la capacité complexante sans (courbes 1) et avec (courbes 2) l'étape de désorption à -1,65V. Temps d'accumulation total $t_{acc} = 300$ s, $E_{acc} = -0,5$ V, Etape de désorption $E_{acc} = -1,65$ V. Sur la figure « a » représentant l'intensité du signal mesurée en fonction du métal ajouté, la courbe 3 correspond au ratio de la hauteur de pic de la courbe 2 sur la courbe 1. La figure « b » représente le potentiel du pic de ré-oxydation et la figure « c » sa largeur à mi-hauteur

Le ratio de ces pics (**Figure II-9.a**, courbe 3) décroît avec l'addition de cuivre, ce qui montre une moindre influence des SAS lors de la ré-oxydation pour de plus fortes concentrations en cuivre. A partir de ces 2 courbes (1 et 2 **Figure II-9.a**), les paramètres de complexation (constante de stabilité et capacité complexante) ont été déterminés pour les 2 types d'expériences, grâce à la linéarisation de Ružić-Van den Berg pour une interaction de type 1 ligand pour 1 métal (**Tableau II-1**).

Tableau II-1 : Concentration en ligand [L] et constante de stabilité apparente K' vis-à-vis du cuivre obtenues pour une eau estuarienne avec et sans l'étape de désorption

	[L] (mol.L ⁻¹)	K' (mol ⁻¹ .L)
Sans l'étape de désorption	$3,40 \times 10^{-8}$	$4,14 \times 10^8$ (log $K' = 8,62$)
Avec l'étape de désorption	$1,41 \times 10^{-8}$	$2,70 \times 10^8$ (log $K' = 8,43$)

Une concentration en ligand 2,5 fois supérieure est observée dans le cas où l'étape de désorption n'est pas utilisée par rapport à l'expérience avec cette étape, tandis que la constante de stabilité n'augmente que plus légèrement.

On voit alors bien l'importance des SAS avec leur effet notable sur la capacité complexante qui se retrouve largement surestimée, entraînant par conséquent une mauvaise estimation de la spéciation du cuivre dans l'échantillon.

Nous avons ici mis en évidence que les SAS, qui sont, en fait, une variété de matière organique, adsorbées sur l'électrode de travail sont responsables de fortes interférences avec les réactions électrochimiques mises en jeu à la surface de celle-ci lors d'analyses d'ASV.

Dans les analyses d'échantillons naturels, ces interférences peuvent mener à des résultats biaisés des paramètres de complexation et, par conséquent, des erreurs lors de l'utilisation de ces résultats dans les logiciels de spéciation chimique appliqués à l'environnement.

L'utilisation d'un potentiel très négatif (environ -1,6V) pendant une très courte période (de l'ordre de 1% du temps total de dépôt) à la fin du potentiel de dépôt permet de s'affranchir de ces interférences et d'obtenir des résultats plus proche de la réalité. C'est ce qui sera donc systématiquement utilisé lors des expériences de complexation pour des échantillons naturels étudiés dans ce travail.

IIC. Traitement des signaux obtenus

La polarographie, malgré sa simplicité apparente (analyse dans les conditions naturelles pour un échantillon marin, système à 3 électrodes, ...) demande une extrême vigilance quant au traitement des voltamogrammes obtenus. Vu les très faibles concentrations de métaux détectées (inférieures au nano-molaire), une simple erreur d'interprétation de la ligne de base ou de la définition du signal obtenu, peut entraîner de grosses erreurs sur la détermination des pics et par conséquent sur les constantes calculées après traitement de toutes les données. Bien souvent, dans notre cas, un œil expérimenté ne pourra pas être remplacé par un calcul aussi compliqué qu'il soit.

Afin de minimiser les erreurs de traitement du signal, il faut tout d'abord déterminer les paramètres électrochimiques permettant la meilleure détermination possible du pic. Ainsi, il est nécessaire d'utiliser, dans ce type d'étude avec des concentrations en métaux très faibles, des temps de dépôts relativement importants et d'appliquer l'étape de désorption des SAS, mise au point dans la partie précédente, afin d'avoir la plus forte intensité possible des pics les plus faibles. Ces précautions permettent de minimiser les pertes d'informations sur les plus faibles concentrations, qui nous empêchent bien souvent d'avoir accès à la détermination des ligands les plus forts.

Les voltamogrammes expérimentaux des échantillons naturels étudiés peuvent présenter, suivant le type d'échantillon analysé, soit un simple pic bien défini ou alors, un massif de pics moins bien défini et demandant alors, de mieux étudier le signal afin de déterminer précisément le ou les pics caractéristiques de l'espèce métallique étudiée. Suivant le type de voltamogramme obtenu, il faut donc traiter les résultats de deux façons différentes :

- Dans le premier cas, une bonne définition de la ligne de base sera nécessaire (voir la partie suivante) afin de déterminer l'intensité maximale du pic proportionnelle à la concentration en métal mesurée ; mais il faudra tout de même veiller à l'évolution de la ligne de base dans le temps, pouvant, elle aussi, entraîner d'importantes erreurs.
- Sinon, en présence d'un massif multi-pics, il faudra ajouter, à la définition de la ligne de base, une modélisation du signal mesuré afin de séparer les différentes contributions dans le massif, de façon à extraire l'aire de chacun des pics.

Le traitement finalement choisi pour le voltamogramme est celui qui reproduit au mieux le signal d'intensité obtenu expérimentalement.

IIC1. Détermination de la ligne de base

Le logiciel GPES (Metrohm) utilisé permet de calculer l'intensité d'un pic à partir d'une ligne de base (appelée « tangent fit ») reliant linéairement les pieds d'un pic. Ceci est utile uniquement dans le cas d'analyses de métaux totaux, réalisées en milieu acide car elle présente un pic bien défini, avec peu de variation de ligne de base.

L'utilisation de ce type d'intégration, pour un échantillon de MOND marine à un pH naturel, conduit systématiquement à une surestimation de la capacité complexante de l'échantillon. En effet, la ligne de base du polarogramme a tendance à s'élever au fur à mesure que les ajouts métalliques deviennent importants. Le fait que le pied du pic, du côté des potentiels positifs, s'élève plus vite que l'autre, masque une partie du métal labile lors de l'intégration, situé sous la ligne définissant l'aire du pic. Cette erreur, due à la détermination de la ligne de base,

diminue le métal labile mesuré et se traduit, à la modélisation, par l'apparition d'un ligand supplémentaire n'ayant aucune existence physique et correspondant uniquement à la valeur de métal masquée par la ligne de base.

Le logiciel GPES permet aussi l'utilisation d'une ligne de base polynomiale, mais il n'y a aucun moyen de contrôler les paramètres de l'équation mathématique utilisée. Or, il est nécessaire, dans le cas d'études de paramètres de complexation, de contrôler tous ces paramètres mathématiques avec la plus grande précision.

C'est pourquoi, les résultats bruts sont systématiquement repris dans un tableur afin de recalculer une ligne de base correcte pour chaque polarogramme (**Figure II-10**).

Dans le cas d'un pic bien défini, une bonne modélisation de la ligne de base est alors suffisante pour obtenir l'aire du pic. Une fois les paramètres de la ligne de base obtenus, les valeurs sont directement retranchées au polarogramme expérimental. L'aire restante correspond alors à l'aire du pic. La définition de la ligne de base est d'autant plus aisée que la concentration en métal est faible.

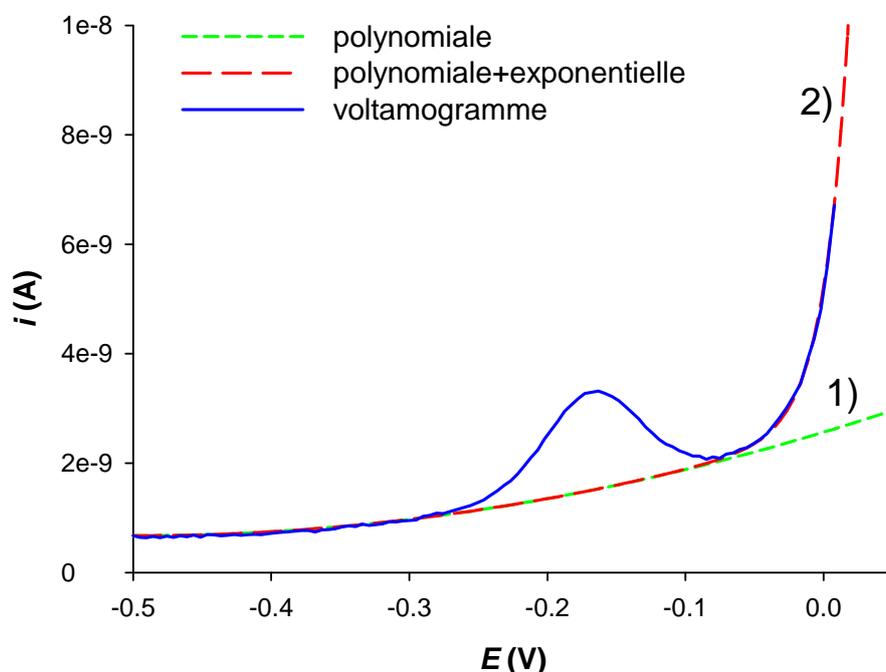


Figure II-10 : Modélisation d'une ligne de base pour les voltamogrammes. 1) partie polynomiale, 2) partie polynomiale + exponentielle

La ligne de base théorique est calculée grâce à la somme d'une équation polynomiale de degré 3 à 5, pour les cas plus compliqués, et d'une courbe exponentielle (**Équation II-1** et **Figure II-10**).

$$I_{base} = (aE^5 + bE^4 + cE^3 + dE^2 + eE + f) + (\alpha \exp(\beta + \gamma E) + \delta)$$

Équation II-1: Equation utilisée pour modéliser la ligne de base d'un voltamogramme près du mur d'oxydation du Hg. Equation composée d'un polynôme de degré 5 et d'une courbe exponentielle. $a, b, c, d, e, f, \alpha, \beta, \gamma$ et δ sont ajustés pour fitter la ligne de base ; E : potentiel mesuré ; I_{base} : courant de la ligne de base

La partie polynomiale (**Figure II-10, 1**) sert à modéliser la partie située avant et après le pic ou le massif de pics de cuivre, et la partie exponentielle (**Figure II-10, 2**), ajoutée à la partie polynomiale, sert à modéliser le mur d'oxydation du mercure souvent très proche du pic du

cuivre pour les échantillons marins. La résultante de ces deux équations (**Figure II-10, 2**) donne alors une ligne de base tout à fait satisfaisante pour interpréter ensuite les pics de cuivre obtenus.

Il faut cependant faire attention lors d'ajouts multiples au déplacement de la ligne de base ; on aura alors une ligne de base définie pour chacun des polarogrammes obtenus. Malheureusement, le signal mesuré est bien souvent plus compliqué et nécessite une meilleure définition des pics.

IIC2. Résolution d'un massif multi-pics

Dans le cas où la modélisation simple de la ligne de base avec l'utilisation d'un seul pic ne suffirait pas à correctement modéliser le signal obtenu, il est nécessaire de modéliser le signal expérimental à l'aide de plusieurs signaux, c'est-à-dire de décomposer le massif de pics mesuré (**Figure II-11**).

Un simple solveur comme Excel Solver (Microsoft) est suffisant pour réaliser cette opération.

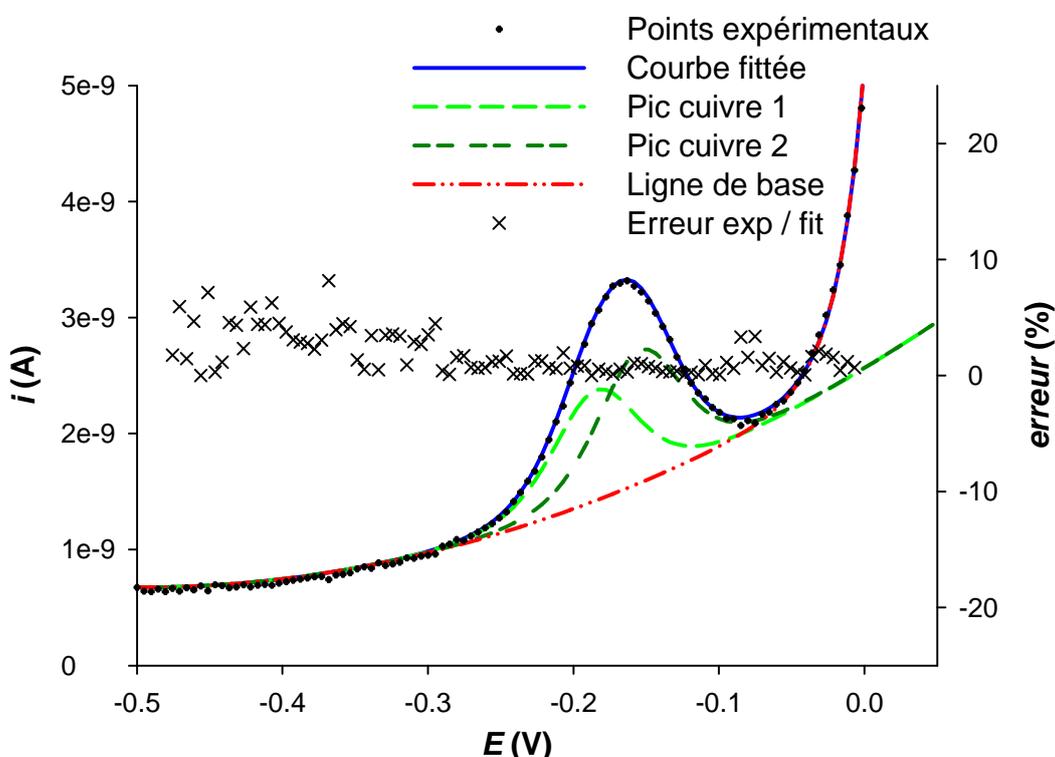


Figure II-11 : Exemple de déconvolution d'un voltammogramme afin d'en extraire l'aire du ou des pics caractéristiques de l'espèce étudiée. Exemple avec 2 pics de cuivre

Une fois que la ligne de base a été définie comme vu précédemment, il faut alors décomposer le signal en utilisant k pics, comme décrit dans l'**Équation II-2**, qui est en fait une dérivée de l'équation utilisée par Heyrovsky J. et Kuta J. (1966) et Bard A.J. et Faulkner L.R. (1983), pour décrire une vague voltampérométrique.

$$I = \sum_{i=1}^k I_{\max}^i \times \left(\frac{1}{\left(\cosh\left(\frac{E - E_i^0}{P_i} \right) \right)^2} \right) + I_{\text{base}}$$

Équation II-2 : Fonction utilisée pour le “fitting” du multi-pic du cuivre. i : nombre de pics de 1 à k , E : potentiel mesuré, E_i^0 : potentiel standard de l'espèce étudiée ; P_i pour (RT/nF) tiré de l'équation de Nernst où R est la constante universelle des gaz parfaits, T : température en Kelvin, n : nombre d'électrons transférés dans la demi-réaction, F : constante de Faraday, I_{base} : cf. **Équation II-1**. I_{\max}^i : intensité maximum de l'espèce étudiée

La détermination de ces pics, souvent au nombre de 2 et pouvant aller jusqu'à 4, permet de reproduire précisément le signal. La valeur de k est déterminée de manière à avoir une erreur minimale sur la modélisation du voltamogramme expérimental. L'intégration de ces pics permet d'obtenir l'aire du multi-pic. En considérant que ces réponses proviennent d'espèces labiles du cuivre, elle est alors utilisée pour calculer la concentration en cuivre labile total. La sensibilité S de la technique vis-à-vis de l'échantillon étudié est considérée identique pour ces espèces. Ce paramètre est l'un des plus importants à déterminer pour chaque nouvel échantillon car il est dépendant des conditions physico-chimiques du milieu et de l'appareillage utilisé.

II C3. Détermination de la Sensibilité

La valeur de la sensibilité notée S (**Équation II-3**) est l'une des valeurs les plus importantes à déterminer dans une mesure de voltamétrie. C'est en effet cette valeur qui va permettre de faire correspondre une concentration en métal électro-labile à une intensité de courant mesurée par l'électrode en l'absence de complexation.

$$I_{\text{pic}} = S \times [M]_{\text{labile}}$$

Équation II-3 : I_{pic} : intensité ou aire du pic; S : sensibilité de la technique utilisée; $[M]_{\text{labile}}$: concentration en métal labile

Cette valeur est dépendante de nombreux paramètres plus ou moins contrôlables :

- Physico-chimiques : température, pH, salinité....,
- Electrochimiques : temps de dépôt, vitesse d'agitation, taille de la goutte de mercure....

En considérant que les paramètres électrochimiques peuvent être contrôlés, la meilleure façon de déterminer la sensibilité est donc de travailler dans les conditions physico-chimiques les plus proches possibles de l'échantillon que l'on veut étudier, mais en l'absence de matière organique pour éviter toute complexation, ce qui implique $[M]_{\text{labile}} = [M]_{\text{T}}$.

La technique la plus appropriée consiste à irradier l'échantillon aux UV pendant une durée de 2 à 12H selon la lampe utilisée à un $\text{pH} < 2$, de manière à détruire tous les ligands organiques présents en solution (Shank G.C. *et al.*, 2004). Dans notre étude, une irradiation de 2 h avec une lampe UV haute pression de 500W s'est montrée suffisante ($[\text{COD}] < \text{détection limite}$). Après l'irradiation, le pH de l'échantillon est réajusté manuellement à sa valeur initiale afin de se placer au plus proche des conditions naturelles pour ne pas modifier la sensibilité de la technique.

On peut aussi utiliser un échantillon synthétique ayant des propriétés physico-chimiques proches de l'échantillon étudié afin de faire cette mesure en s'affranchissant de l'utilisation de la lampe UV, mais en prenant soin d'avoir des produits suffisamment propres en carbone !! Les mesures de DPASV sont ensuite réalisées en mode logarithmique, afin de contrôler la linéarité de la réponse en fonction de la concentration en métal, et de rester au plus proche des conditions de l'échantillon naturel, et en l'absence de MON.

La pente de la droite, représentant l'intensité du signal (en A.L.mol⁻¹ si l'on prend la hauteur du pic, ou en A.V.L.mol⁻¹ si l'on prend l'aire du pic) en fonction de la quantité de métal ajouté, obtenue en fin de titration, doit alors être égale à la valeur de la sensibilité de l'échantillon dans les conditions analytiques choisies pour l'expérience. Dans notre étude, afin d'obtenir une sensibilité précise correspondante à l'échantillon étudié, nous prendrons la valeur de sensibilité obtenue en fin de titration logarithmique comme étant la sensibilité de l'échantillon. On suppose alors que la totalité des ligands ont été saturés.

A titre d'exemple, la sensibilité obtenue (avec l'aire des pics) dans un échantillon synthétique correspondant à de l'eau douce, à savoir de l'eau milliQ et du NaNO₃ à 0.05M avec un tampon borax (pH = 8), sera de l'ordre de 5.10⁻³ A.V.L.mol⁻¹; tandis qu'un échantillon salin synthétique préparé avec du NaCl 35 g.L⁻¹ et du tampon borax, donnera une sensibilité d'environ 1.10⁻² A.V.L.mol⁻¹. Pour les échantillons marins étudiés, les valeurs de sensibilité obtenues en fin de titrations logarithmiques sont toujours de cet ordre de grandeur.

IIC4. Approche cinétique des propriétés de complexation de la MOND

Les cinétiques des réactions de complexation de la MOND avec les métaux traces peuvent avoir d'importantes implications dans les mesures des paramètres de complexation. Afin de déterminer ces paramètres dans les eaux naturelles, de nombreuses techniques nécessitent des additions de métaux dans les échantillons (Garnier C. *et al.*, 2004b). Ainsi un temps d'équilibre mal choisi après l'addition de métal peut entraîner des observations biaisées des mécanismes pouvant se produire.

Dans les eaux les métaux alcalino-terreux peuvent contrôler la spéciation des ligands organiques naturellement présents (Lu Y. et Allen H.E., 2002). Ceci est d'autant plus vrai dans les eaux marines où les alcalino-terreux sont abondants. Ainsi, la vitesse de complexation du métal ajouté peut être ralentie par compétition des alcalino-terreux en milieu marin, alors qu'en leur absence, cette complexation pourrait être beaucoup plus rapide. Les constantes d'équilibres conditionnelles de ces métaux avec les complexes présents dans le milieu se trouvent, de même, affectées par la présence de ces compétiteurs qui diminuent les constantes conditionnelles apparentes mesurées.

Dû à l'extrême complexité de la MOND, les phénomènes cinétiques et d'échanges intervenant dans le milieu naturel, sont extrêmement complexes et rendent ce type d'étude très difficile.

Un temps de stabilisation de deux heures, après chaque addition de métal, peut être utilisé afin de suivre la cinétique de complexation du métal par la MOND, dans des conditions naturelles, et en temps réel, avec des mesures toutes les 6 minutes.

Ce temps de 6 minutes, correspond au temps de dépôt et d'analyse de l'échantillon dans des conditions optimales et n'est donc pas modifiable. On obtient ainsi pour chaque addition métallique, 20 polarogrammes permettant d'étudier la cinétique de complexation de l'échantillon sur une durée de 2 heures.

Des expériences de cinétique, menées sur des échantillons naturels marins avec un seul ajout de métal supérieur à la capacité complexante de l'échantillon, ont montré que, globalement, l'équilibre était atteint au bout d'une quinzaine d'heures. Cependant, cette technique ne permettait pas d'obtenir une bonne précision sur les constantes cinétiques et sur la concentration totale en site complexant, à cause de l'étroitesse de la fenêtre analytique. La technique d'ajout logarithmique, présentée précédemment, a donc l'avantage, avec des ajouts successifs de métal assez faibles, d'atteindre un équilibre intermédiaire pour chaque ajout assez rapidement (de l'ordre de 2 heures) et au final, avec une durée expérimentale de l'ordre de 35 heures, d'atteindre un équilibre avec tous les sites complexants saturés.

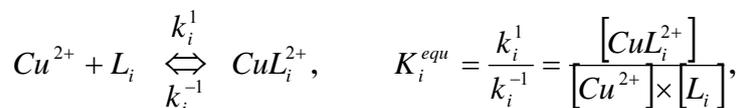
On supposera que durant ce temps d'analyse, les échantillons filtrés à 0,45 µm ne subissent aucune modification structurale importante. Cette technique permet de plus une bonne détermination à la fois des constantes cinétiques, grâce à de multiples expériences, et aussi de la quantité de sites complexants, grâce à un balayage important du rapport métal sur ligand.

IIC4a) Modélisation de la courbe de cinétique

Afin d'obtenir des paramètres de complexation cinétiques, il est nécessaire de modéliser la courbe cinétique obtenue expérimentalement.

- *Cas d'un système composé d'un seul ligand monodentate.*

Si l'on considère un système composé d'un ligand monodentate « L_i », l'équilibre chimique de la complexation mise en jeu avec le cuivre est alors le suivant:



Équation II-4 : équilibre mis en jeu dans une réaction de complexation avec un ligand monodentate

avec k_i^1 et k_i^{-1} respectivement les constantes d'association et de dissociation pouvant être reliées à la constante d'équilibre K_i^{equ} exprimée en M^{-1} par l'**Équation II-4**.

Il est nécessaire de noter ici que la cinétique de complexation du cuivre par les ligands inorganiques est considérée comme étant très rapide par rapport à celle des ligands organiques.

L'approche cinétique utilisée est basée sur un modèle cinétique simple où l'on considère uniquement une constante de formation k_i^1 et une constante de dissociation k_i^{-1} par type de ligand.

On peut ensuite définir l'équation cinétique de premier ordre représentant la complexation du cuivre libre Cu^{2+} par le ligand L_i par l'équation suivante :

$$\frac{dCu^{2+}}{dt} = \sum_i \left(-k_i^1 [Cu^{2+}] [L_i] + k_i^{-1} [CuL_i^{2+}] \right)$$

Équation II-5 : Equation cinétique de premier ordre utilisée pour décrire la complexation du cuivre libre pour « i » ligands « L » avec les constantes d'association k_i^1 et de dissociation k_i^{-1}

Où k_i^1 représente la constante de formation du complexe exprimée en $M^{-1}.s^{-1}$, k_i^{-1} la constante de dissociation exprimée en s^{-1} et $\frac{dCu^{2+}}{dt}$ exprimée en $M.s^{-1}$.

Cependant, en DPASV, on ne mesure pas la concentration $[Cu^{2+}]$ mais plutôt $[Cu]_{labile}$; il faut donc résoudre une équation cinétique fonction de $[Cu]_{labile}$; pour cela, il faut poser tout d'abord les équations correspondantes au bilan de matière pour le cuivre (**Équation II-6**) et le ligand (**Équation II-7**).

$$[Cu]_T = [Cu]_{labile} + \sum_i [CuL_i^{2+}]$$

Équation II-6 : Bilan de matière du cuivre

$$[L_i]_T = \sum_i [CuL_i^{2+}] + [L_i]$$

Équation II-7 : Bilan de matière du ligand L_i

Puis, il faut aussi utiliser la relation liant le cuivre libre au cuivre labile mesuré en DPASV (**Équation II-8**), dont le terme α a préalablement été déterminé par un calcul de spéciation réalisé lors de l'approche à l'équilibre avec le logiciel PROSECE. Ce coefficient présente des valeurs pouvant varier de 0,005 à 0,015 (*i.e.* 0,5 à 1,5% de Cu^{2+} dans la fraction inorganique) suivant le type d'échantillons étudiés. On fera donc l'hypothèse que celui-ci ne varie pas lors des additions.

$$[Cu]_{labile} = \frac{[Cu]^{2+}}{\alpha}$$

Équation II-8 : Equation reliant le cuivre labile au cuivre libre, le terme α est calculé à partir d'un calcul de spéciation réalisé dans PROSECE

On peut alors déterminer à partir de l'**Équation II-5** et de l'**Équation II-8**, l'équation cinétique qu'il faut utiliser pour modéliser les courbes faisant intervenir un seul ligand (**Équation II-9**).

$$\frac{dCu_{labile}}{dt} = -k_1^1 [Cu_{labile}] [L_1] + \frac{k_1^{-1} [CuL_1^{2+}]}{\alpha}$$

Équation II-9 : Equation cinétique à 1 ligand monodentate

Cependant, l'équation à résoudre doit être uniquement fonction de $[Cu]_{labile}$ qui est mesuré, $[Cu]_T$ qui est connu, α qui est calculé par l'approche à l'équilibre pour un échantillon donné, $[L_1]_T$, k_1^1 , k_1^{-1} qui sont les termes à résoudre. En se basant sur les équations de bilan de matière (**Équation II-6** et **Équation II-7**), l'équation à résoudre devient alors dans le cas d'un système mono ligand monodentate de la forme suivante :

$$\frac{dCu_{labile}}{dt} = -k_1^1 [Cu_{labile}] \left([L_1]_T - ([Cu]_T - [Cu_{labile}]) \right) + \frac{k_1^{-1} ([Cu]_T - [Cu_{labile}])}{\alpha}$$

Équation II-10 : Equation cinétique utilisée pour modéliser une cinétique de premier ordre faisant intervenir un seul ligand monodentate et du cuivre labile

Cette équation, ne présentant pas de solution analytique, est résolue de façon numérique grâce à un calcul d'intégration par la fonction « Lsode » d'Octave, puis une optimisation des paramètres inconnus $[L_i]_T$, k_i^1 et k_i^{-1} pour chaque série de données correspondant à une nouvelle addition de métal.

- Cas d'un système composé de deux ligands monodentate.

Si l'on considère maintenant un système à 2 ligands monodentates « L_1 » et « L_2 » l'équation cinétique pour 2 ligands prend alors la forme suivante :

$$\frac{dCu^{2+}}{dt} = -k_1^1 [Cu^{2+}] [L_1] + k_1^{-1} [CuL_1^{2+}] - k_2^1 [Cu^{2+}] [L_2] + k_2^{-1} [CuL_2^{2+}]$$

Équation II-11 : Equation cinétique de premier ordre faisant intervenir 2 ligands monodentates

De même que pour l'équation à un seul ligand, l'équation à résoudre fait intervenir le cuivre labile et doit être fonction de $[Cu]_{labile}$, $[Cu]_T$, α , $[L_i]_T$, k_i^1 et k_i^{-1} qui sont les termes à résoudre pour chacun des i ligands. En utilisant les équations de bilan de matière ainsi que l'**Équation II-8**, l'équation à utiliser pour modéliser un système à 2 ligands devient alors :

$$\begin{aligned} \frac{dCu_{labile}}{dt} = & -k_1^1 [Cu_{labile}] \left([L_1]_T - [CuL_1^{2+}] \right) - k_2^1 [Cu_{labile}] \left([L_2]_T - [CuL_2^{2+}] \right) + \frac{k_1^{-1} [CuL_1^{2+}]}{\alpha} \\ & + \frac{k_2^{-1} \left([Cu]_T - [Cu_{labile}] - [CuL_1^{2+}] \right)}{\alpha} \end{aligned}$$

Ensuite, on regroupe les termes $[CuL_1^{2+}]$ et on remplace $[CuL_2^{2+}]$ grâce à l'**Équation II-6**.

$$\begin{aligned} \frac{dCu_{labile}}{dt} = & -k_1^1 [Cu_{labile}] [L_1]_T - k_2^1 [Cu_{labile}] [L_2]_T + \frac{k_2^{-1} \left([Cu]_T - [Cu_{labile}] \right)}{\alpha} + k_1^1 [Cu_{labile}] [CuL_1^{2+}] \\ & + k_2^1 [Cu_{labile}] \left([Cu]_T - [Cu_{labile}] - [CuL_1^{2+}] \right) + \frac{k_1^{-1} [CuL_1^{2+}]}{\alpha} - \frac{k_2^{-1} [CuL_1^{2+}]}{\alpha} \end{aligned}$$

puis, on remplace le terme $[CuL_1^{2+}]$ grâce à l'**Équation II-4** et encore à l'**Équation II-8**.

$$\begin{aligned} \frac{dCu_{labile}}{dt} = & -k_1^1 [Cu_{labile}] [L_1]_T - k_2^1 [Cu_{labile}] [L_2]_T + \frac{k_2^{-1} \left([Cu]_T - [Cu_{labile}] \right)}{\alpha} + k_1^1 [Cu_{labile}] \left(\frac{K_1^{equ} \alpha [Cu_{labile}] [L_1]_T}{1 + K_1^{equ} \alpha [Cu_{labile}]} \right) \\ & + k_2^1 [Cu_{labile}] \left([Cu]_T - [Cu_{labile}] - \left(\frac{K_1^{equ} \alpha [Cu_{labile}] [L_1]_T}{1 + K_1^{equ} \alpha [Cu_{labile}]} \right) \right) + \left(\frac{k_1^{-1} - k_2^{-1}}{\alpha} \right) \left(\frac{K_1^{equ} \alpha [Cu_{labile}] [L_1]_T}{1 + K_1^{equ} \alpha [Cu_{labile}]} \right) \end{aligned}$$

Après factorisations, on obtient l'équation pouvant être utilisée pour modéliser une courbe cinétique expérimentale pour une cinétique de premier ordre où 2 ligands monodentates seraient présents.

$$\frac{dCu_{labile}}{dt} = \frac{1}{\alpha} \left(\alpha [Cu_{labile}] \left(-k_1^1 [L_1]_T - k_2^1 [L_2]_T \right) + \left([Cu]_T - [Cu_{labile}] \right) \left(\frac{k_2^1}{K_2^{equ}} + \alpha k_2^1 [Cu_{labile}] \right) \right) + \left(\frac{K_1^{equ} \alpha [Cu_{labile}] [L_1]_T}{1 + K_1^{equ} \alpha [Cu_{labile}]} \right) \left((k_1^1 - k_2^1) [Cu_{labile}] \alpha + \left(\frac{k_1^1}{K_1^{equ}} - \frac{k_2^1}{K_2^{equ}} \right) \right)$$

Équation II-12 : Equation cinétique utilisée pour modéliser une cinétique de premier ordre faisant intervenir 2 ligands monodentates et du cuivre labile

IIC4b) Protocole de résolution de l'équation cinétique

Afin de pouvoir modéliser les courbes de cinétiques expérimentales, il est nécessaire de résoudre les équations différentielles présentées précédemment. Pour parvenir à trouver une solution à ces équations, il faut utiliser un programme de résolution (code fourni en Annexe 2 et 3), utilisable sous un logiciel open source GNU-GPL, et basé sur l'utilisation d'un simplexe modifié, permettant de parvenir assez rapidement à une solution numérique.

Le principe de fonctionnement simplifié de ce programme est présenté sur la **Figure II-12**. Celui-ci, développé grâce à Garnier C., est basé sur le même type de résolution mathématique que le programme PROSECE ; c'est-à-dire l'utilisation d'un simplexe à taille variable (Garnier C., 2004) permettant de modifier efficacement les paramètres jusqu'à obtenir une solution numérique à l'équation posée.

Pour chaque ajout, à partir de l'état d'équilibre, le terme α est calculé à partir de l'optimisation de la titration logarithmique. Puis un programme d'optimisation calcule les constantes cinétiques et les concentrations en ligands à partir des données cinétiques. Contrairement au logiciel PROSECE, ce programme ne nécessite donc pas de nouveau le calcul de la spéciation.

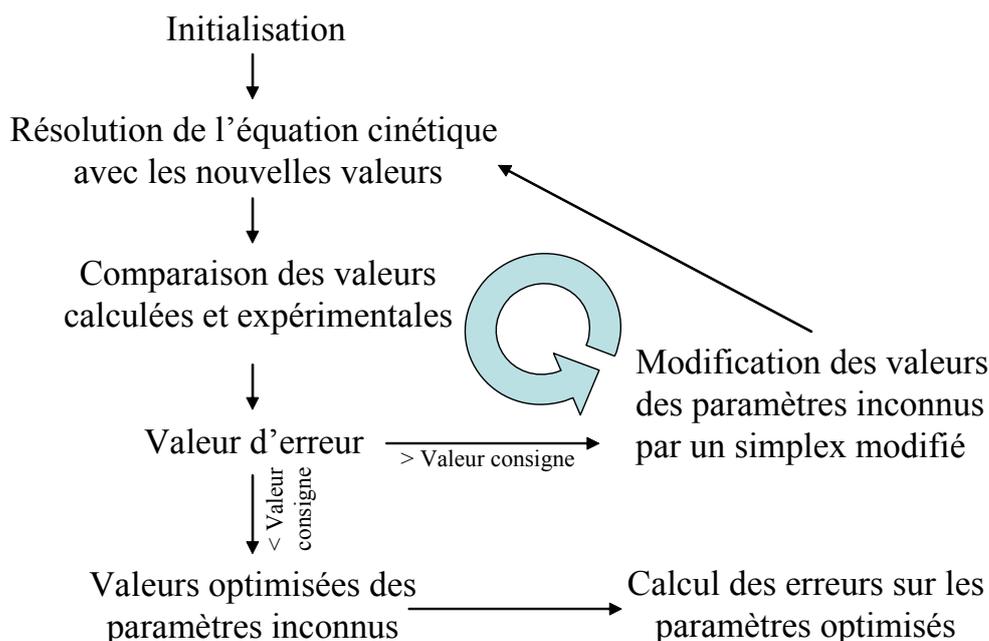


Figure II-12 : Schéma de fonctionnement du programme de résolution des équilibres cinétiques

Le fonctionnement général de ce programme suit les étapes suivantes :

- Etape d'initialisation : On introduit, tout d'abord, sous forme de matrice à 2 colonnes les valeurs du métal labile (Cu_{labile}) mesuré pour chacun des temps (t) mesurés. Ensuite, les valeurs des concentrations en ligands, ainsi que les constantes cinétiques sont définies manuellement, et la valeur α est introduite à partir des résultats donnés par PROSECE pour le même échantillon. Une première intégration numérique de l'équation cinétique différentielle pour chaque temps t permet de donner les valeurs de métal calculé pour chacun des temps utilisés, et une valeur de biais est calculée en comparant les concentrations de métal calculées à celles du métal mesurées.

- Etape de définition et de modification du simplexe : la taille du simplexe dépend du nombre de paramètres à optimiser. Par exemple, dans le cas d'un système à 1 ligand où il faut optimiser 1 concentration en site et 2 constantes cinétiques, la forme du simplexe sera définie par un tétraèdre correspondant au nombre de paramètres à optimiser + 1. Le simplexe va servir à modifier les valeurs de concentration en sites et des constantes cinétiques, afin de se rapprocher, le plus rapidement possible, d'une solution numérique satisfaisante. Dans le cas où la nouvelle valeur calculée s'éloigne de la solution numérique (nouveau biais calculé plus important), le simplexe va augmenter sa taille ; dans le cas contraire, il réduira sa taille afin de se rapprocher au maximum de la solution analytique.
- Etape d'optimisation : L'étape d'optimisation consiste à faire tourner une boucle comparant à chaque fois la variation du biais dernièrement obtenue par rapport à la valeur précédente, afin de modifier à chaque fois les valeurs des paramètres à optimiser par l'intermédiaire du simplexe, jusqu'à obtenir une variation du biais, un nombre d'itération, ou une déviation standard correspondant aux conditions fixées par l'expérimentateur.
- Une fois les paramètres optimisés, un test de sensibilité est utilisé pour déterminer les valeurs donnant une variation du biais de plus de 10%. Ces valeurs sont considérés comme étant la variabilité de la mesure

IIC4c) Utilisation de l'approche cinétique

Ainsi, pour les différents échantillons étudiés, cette approche sera utilisée afin de modéliser les courbes de cinétique de complexation du cuivre obtenues après les ajouts sur une durée de 2 heures. Les observations expérimentales ont montré, que, pour les premiers ajouts, lorsque la concentration en métal labile est proche de la limite de détection de l'appareil, la variation de concentration de métal due à la cinétique de complexation n'est pas suffisamment différentiable du bruit de fond de la mesure pour en tirer des résultats exploitables. De même, pour des concentrations métalliques bien supérieures à la quantité de ligands, la variation de concentration en Cu_{labile} due à la cinétique devient alors trop faible pour déterminer des paramètres de complexation à partir de ces expériences.

Le traitement cinétique, lorsqu'il est applicable, sera donc systématiquement effectué sur la gamme d'additions globalement comprise entre des ajouts de 20 à 200 nM pour les analyses d'échantillons naturels. D'une manière générale, la cinétique est assez facilement observable tant que l'on se situe dans une gamme de concentration métallique correspondant à la capacité complexante de l'échantillon, *i.e.* pour une concentration en métal inférieure ou égale à cette capacité complexante (usuellement de 20 à 200 nM pour les échantillons marins et estuariens naturels étudiés).

Les courbes expérimentales de cinétiques ainsi que les courbes modélisées, représentatives des courbes généralement obtenues pour les différents ajouts de métal réalisés, sont représentées sur la **Figure II-13**.

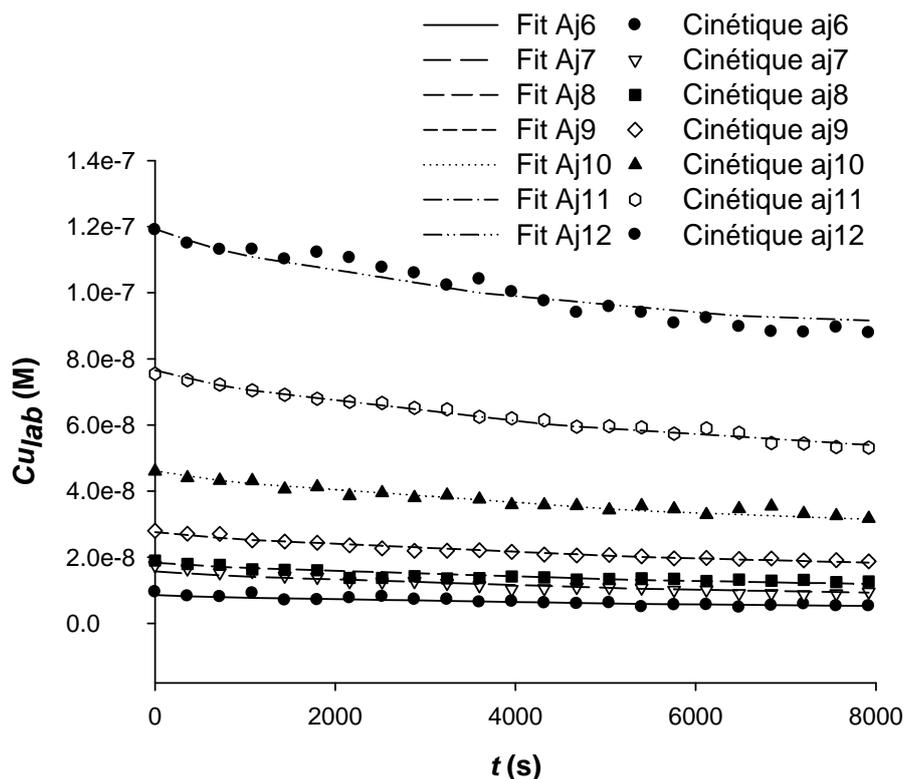


Figure II-13 : Exemple de résultats de cinétique obtenus pour un échantillon estuarien (Šibenik, Croatie) de Salinité 31 en 2008 pour des ajouts métalliques allant de 10 à environ 150 nM de métal total présent en solution. Les courbes tracées représentent les fitting associés à chacune des courbes cinétiques expérimentales

Concernant la modélisation des courbes cinétiques, deux techniques différentes peuvent être utilisées. La première consiste à modéliser séparément toutes les courbes cinétiques d'un seul et même échantillon, obtenant ainsi, pour chaque ajout, un set de valeurs de $[L_T]$, k_1 , k_{-1} , donc K_{equ} . La moyenne de ces constantes est alors utilisée afin de déterminer les paramètres de cinétique de complexation de l'échantillon.

La deuxième technique pouvant être illustrée par la **Figure II-13** consiste à modéliser simultanément toutes les courbes de cinétique d'un échantillon avec un seul set de valeurs de k_1 , k_{-1} et $[L_T]$. Afin de laisser suffisamment de degré de liberté au calcul d'optimisation, les concentrations en cuivre à $t = 0$ secondes pour chaque ajout sont également optimisées contrairement à la première technique où ces valeurs étaient estimées à partir de l'ajout précédent. Ceci permet de mieux fitter l'ensemble des données en donnant un peu de liberté au système sur cette valeur qui n'est de toute façon pas mesurable expérimentalement et qui conditionne fortement l'allure de la courbe de cinétique.

Cette approche cinétique permet donc, tout comme l'approche à l'équilibre, de caractériser la MOND par des constantes de complexation $\log K$ et des concentrations en sites L ; mais aussi de déterminer des valeurs de constantes cinétiques d'association k_1 et dissociation k_{-1} , permettant d'estimer des vitesses de complexation / décomplexation du métal avec la MOND.

Afin de différencier les constantes déterminées par une approche cinétique de celles déterminées à l'équilibre, nous utiliserons dans la suite de cette étude, le terme de constante cinétique pour la première approche et le terme de constante à l'équilibre pour la seconde.

IID. Mise en place d'un protocole d'analyse de MOND

Les analyses environnementales de métaux traces demandent de grandes précautions afin d'éviter les contaminations de l'échantillon naturel. Pour ce faire, il est utile de connaître les étapes clés pouvant entraîner des contaminations et d'y remédier en utilisant les moyens les plus appropriés. Il est aussi nécessaire d'avoir un protocole d'analyse assez précis afin d'éviter tout traitement de l'échantillon pouvant le rendre inutilisable. Le but du protocole mis en place est d'éviter, autant que possible, tout traitement chimique ou physique de l'échantillon avant l'analyse permettant la caractérisation de ses propriétés de complexation.

IID1. Préalable aux analyses

Tout d'abord, les échantillons prélevés et filtrés doivent être conditionnés dans des flacons en Téflon (PFA), préalablement nettoyés avec de l'acide nitrique 10% pendant au moins 24H puis un rinçage abondant à l'eau milliQ. Le stockage de ces bouteilles remplies d'eau milliQ et acidifiées à pH = 2 avec de l'acide nitrique suprapur est conseillé, après nettoyage, afin d'améliorer encore le nettoyage. Il faudra bien sûr prévoir un dernier lavage à l'eau milliQ avant tout prélèvement.

Ces flacons, contrairement aux flacons en polyéthylène haute densité utilisés habituellement, ne montrent pas d'adsorption métallique à leur surface, ce qui permet de mesurer le métal total sans avoir à acidifier l'échantillon prélevé dans cette bouteille. Ces flacons permettent de plus d'éviter les contaminations en carbone pouvant provenir du flaconnage.

Il est conseillé, tout de même, d'étudier l'échantillon le plus vite possible après le prélèvement et de le conserver à l'obscurité à 4°C, après azidification (NaN_3), afin d'éviter tout risque de développement bactérien.

IID2. Procédure d'analyse d'une MOND marine

Afin d'obtenir une caractérisation de la MOND, un protocole expérimental a été mis en place. Ce protocole permet notamment, après étude d'une MOND marine concentrée, d'obtenir des paramètres de complexation caractéristiques d'une MOND marine et pouvant alors être utilisé comme modèle dans les logiciels de calcul de spéciation. En effet, dans la littérature on retrouve bien souvent des acides humiques extraits de sols (Hamilton-Taylor J. *et al.*, 2002) utilisés pour modéliser des phénomènes se produisant dans le milieu marin, et non réellement une MOND d'origine marine.

Ce protocole a été principalement mis en place pour l'étude d'échantillons marins ou estuariens très faiblement concentrés en métaux et nécessite donc de prendre des précautions très strictes (multiples rinçages) lors des différentes étapes de nettoyage afin de s'assurer de ne pas polluer l'échantillon.

L'échantillon initial doit tout d'abord être filtré afin de travailler uniquement sur la fraction dissoute (**Figure II-14, 1**). L'utilisation de filtre en acétate ou nitrate de cellulose ou encore de Nylon est préconisée afin d'éviter la contamination métallique de notre échantillon. L'utilisation de ces filtres, même rincés préalablement uniquement avec 200ml d'eau milliQ, ne montre aucune contamination, que ce soit métallique ou carbonée ($\text{TC}_{\text{milliQ}} = 0,418 \pm 0,029 \text{ mg}_C \cdot \text{L}^{-1}$ et $\text{TC}_{\text{milliQfiltrée}}(\text{pour } 30\text{ml filtrés}) = 0,420 \pm 0,024 \text{ mg}_C \cdot \text{L}^{-1}$) (Métaux totaux $\text{Cd} < 0,2\text{nM}$, $\text{Pb} < 0,2\text{nM}$, $\text{Cu} < 0,5\text{nM}$), mais une étape de nettoyage avec de l'acide nitrique 10%, suivie d'un rinçage abondant à l'eau milliQ peut être ajoutée.

Une quantité raisonnable de 1L d'échantillon filtré est nécessaire afin de pouvoir réaliser toutes les analyses et de s'affranchir totalement d'une éventuelle contamination du filtre.

Une fois le prélèvement effectué, la concentration en ions majeurs est déterminée (**Figure II-14, 2**) soit par chromatographie ionique, soit par mesure de la salinité pour les échantillons marins ou estuariens ; dans ce cas, les concentrations sont alors recalculées à partir de la Loi de Dittmar. Ces valeurs sont nécessaires afin de tenir compte de la concentration en ions majeurs lors du calcul de spéciation.

Une des mesures importantes est la mesure du carbone organique dissous (COD), représentatif de la quantité de MOND présente dans l'échantillon, qui nous permettra de caractériser les sites de notre matière organique naturelle rapporté à des quantités de carbone en solution (**Figure II-14, 3**).

Cette même valeur permet d'estimer une borne supérieure à la concentration métallique à utiliser lors de la titration métallique en mode logarithmique. Celle-ci est définie comme étant $1\mu\text{M}$ de métal à ajouter pour $1\text{mg}_C\cdot\text{L}^{-1}$ (soit $83\mu\text{mol}_C\cdot\text{L}^{-1}$) ; dans la plupart des échantillons naturels non contaminés, au delà de cette valeur, tous les sites de complexations sont saturés et le signal mesuré en DPASV est lui aussi proche de la saturation. Cette valeur, à prendre donc uniquement comme une valeur indicative peut être dépassée si la saturation du signal électrochimique n'est pas atteinte.

La technique de potentiométrie (**Figure II-14, 4 ; partie IC6**) est ensuite utilisée afin de déterminer la concentration en sites acides ; l'utilisation du logiciel PROSECE sur ces résultats nous donnera la répartition en sites de type carboxylique ou phénolique ainsi que leurs constantes d'acidité respectives. Cependant, avant de réaliser une telle titration, il est nécessaire de s'assurer que la concentration en COD soit supérieure à $10\text{mg}_C\cdot\text{L}^{-1}$ de manière à pouvoir correctement déterminer ses propriétés acido-basiques (Garnier C. *et al.*, 2004c).

Dans le cas d'échantillons marins, il s'avère nécessaire de passer préalablement l'échantillon sur une colonne échangeuse cationique de type Chelex100 afin de retirer la plus grosse partie possible de magnésium qui, comme nous l'avons mentionné (**IA1a**), peut causer des précipitations à des pH très basiques (>9) lors de la titration potentiométrique. L'emploi de cette résine nous permet alors d'atteindre un pH final de 10,5 à 11,5 sans aucun problème.

Cependant, il a été observé, au cours de cette étude, qu'il pouvait y avoir une perte de carbone due à l'utilisation de la résine Chelex. En effet, il a été observé jusqu'à 50% de perte du carbone dissous initialement présent pour une concentration initiale de $2533\mu\text{mol}_C\cdot\text{L}^{-1}$ ($30,4\text{mg}_C\cdot\text{L}^{-1}$), ceci après 3 cycles en batch (20g de résine pour 100 ml), nécessaires à l'obtention de concentrations en cations majeurs inférieure à $0,5\text{mg}_C\cdot\text{L}^{-1}$. Cette perte importante peut majoritairement être attribuée à un effet de dilution engendré par les 3 cycles réalisés, plutôt qu'à une rétention sélective de la résine. Ainsi, cette résine doit être utilisée avec précaution sur des échantillons naturels marins non concentrés en carbone à cause de la partie non négligeable de carbone pouvant être perdues.

En parallèle à la mesure de COD, une partie de l'échantillon est passé aux UV (lampe haute pression 500W pour les expériences réalisées à Toulon, et 100 W pour celles réalisées en Croatie) à un pH = 2 pendant 2 à 12 heures (selon la lampe utilisée) (**Figure II-14, 5**). Ceci afin de déterminer les concentrations en métal total (**Figure II-14, 6**) ; mais aussi la sensibilité S de la technique (**Figure II-14, 7**) avec, dans ce cas, le pH ramené à un pH naturel par ajout de soude afin de travailler dans les mêmes conditions que celles choisies pour les mesures de capacités complexantes.

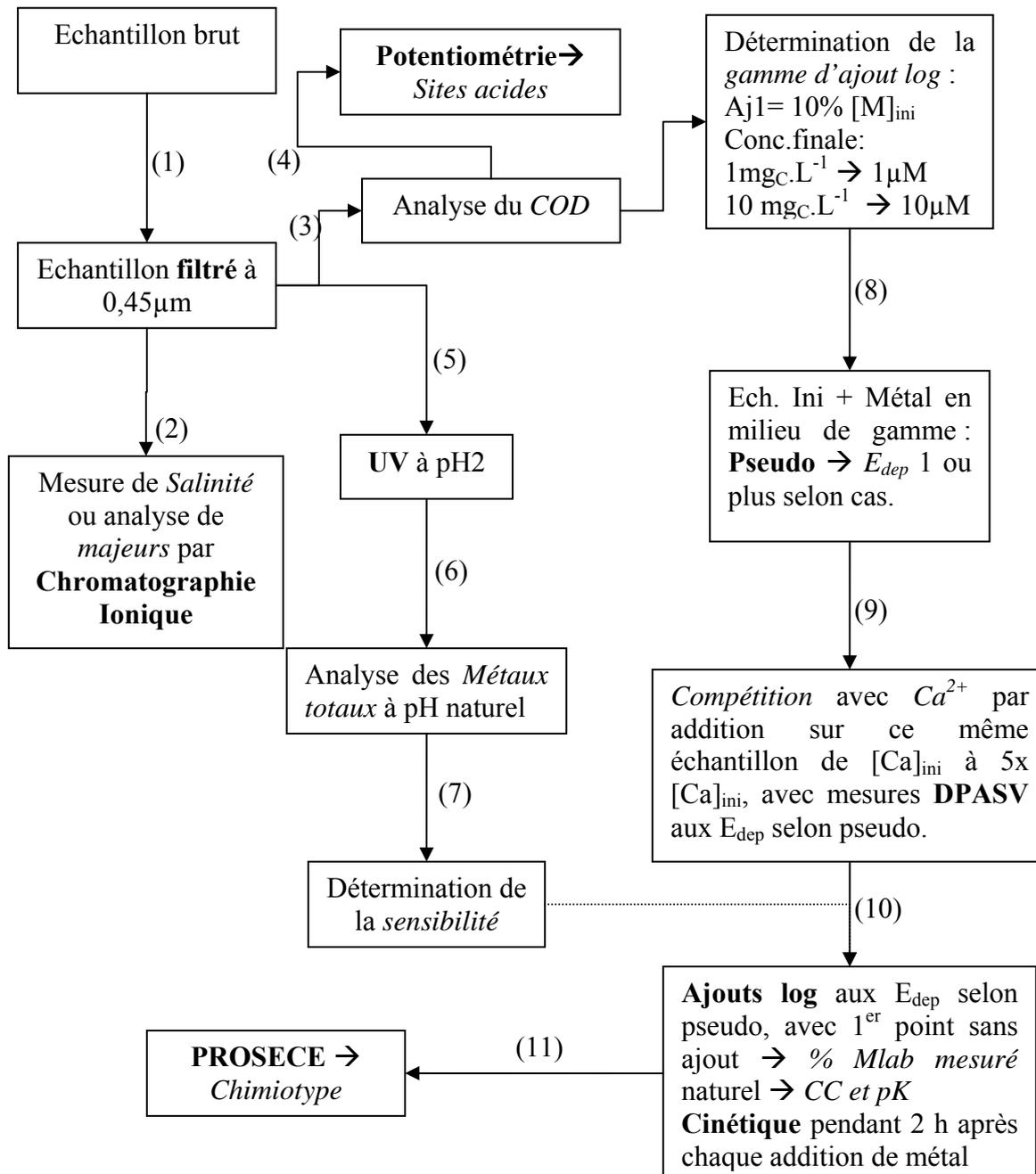


Figure II-14 : Protocole d'analyse mis en place pour l'analyse d'une MOND marine

Ensuite une mesure de pseudopolarographie (**Figure II-14, 8**) est réalisée avec, dans le cas d'un échantillon naturel très peu contaminé, une quantité de métal ajoutée prise par défaut dans le milieu de la gamme d'ajout log (environ 100nM de métal à ajouter pour $83\mu\text{mol}_C.L^{-1}$ dans l'échantillon) afin de se situer très proche du maximum de la capacité complexante de l'échantillon. Cette mesure nous permet de déterminer le potentiel à utiliser pour mesurer uniquement le métal labile de notre échantillon afin de correctement déterminer les capacités complexantes sans détruire une partie des complexes formés par l'emploi d'un potentiel trop négatif. Un second potentiel, voire un troisième, peuvent aussi être sélectionnés à partir du

pseudopolarogramme, ce qui mènera à la détermination de constantes de complexes électro-labiles dissociés ou partiellement dissociés à ces différents potentiels employés.

La pseudopolarographie est réalisée une vingtaine d'heures après l'ajout de métal, ce qui permet la complexation de ce dernier, mais aussi, un suivi cinétique du phénomène de complexation. Ces résultats sont donc utilisés pour traiter l'aspect cinétique de la réaction de complexation.

Sur ce même échantillon, après la mesure de pseudopolarographie, une expérience consistant à faire varier la concentration de calcium, de sa concentration naturelle à environ 5 fois celle-ci, est réalisée avec des mesures de DPASV sur le métal considéré, afin de pouvoir étudier l'effet de compétition du calcium avec le métal choisi (**Figure II-14, 9**).

L'étude d'échantillons préalablement passés sur Chelex100 (cas d'échantillons contaminés) nous permettra également de faire des ajouts de calcium inférieurs aux concentrations naturelles de l'échantillon, ce qui est indispensable afin d'observer les effets de compétition, tout en gardant à l'esprit qu'une partie de la MOND peut être perdue par l'utilisation de cette résine.

Enfin, une titration du métal par DPASV et ajout logarithmique (**Figure II-14, 10** ; projet GPES d'ajout logarithmique fourni en **Annexe 1**) de métal est réalisée afin d'obtenir les paramètres de complexation de la matière organique dissoute présente dans notre échantillon vis-à-vis du métal étudié à l'équilibre. Pour les solutions de faibles concentrations ($<10^{-5}M$), il est nécessaire de les préparer au plus tard dans la semaine des analyses et de ne pas les acidifier afin de ne pas entraîner de modification significative ($<0,5$) du pH lors de la titration. En effet, la préparation des solutions à partir d'une solution mère à $1g.L^{-1}$ de cuivre acidifiée à 2% entraîne une acidité suffisante dans les solutions filles (respectivement pH 1,7 à 4,7 pour des concentration de cuivre de $1.10^{-3}M$ à $1.10^{-6}M$) afin d'éviter les phénomènes d'adsorption ou de précipitation des solutions préparées dans les bouteilles ou les tubes des burettes.

Lors de cette étape, un temps d'attente nécessaire afin que le système soit à l'équilibre, doit être utilisé. Après expérience, celui-ci a été estimé à 2 heures. Ce temps d'attente est mis à profit afin d'utiliser une approche cinétique permettant simultanément d'obtenir des constantes cinétiques et les constantes d'équilibre caractéristiques des échantillons analysés.

L'ultime étape consiste, bien entendu, à modéliser les résultats obtenus afin d'en tirer une sorte de carte d'identité de la matière organique naturelle dissoute étudiée (**Figure II-14, 11**). Pour ce faire, nous employons le logiciel PROSECE afin de fitter/modéliser les courbes expérimentales obtenues et calculer les constantes d'équilibre et/ou cinétiques Métal-MOND.

La réalisation de ce protocole sur un échantillon nécessite plus d'un mois d'analyse, au bout duquel on obtient les paramètres de complexations de la MOND marine étudié, vis-à-vis du proton, et des cations étudiés.

Cependant, il n'est pas toujours possible de réaliser des concentrations des échantillons des MOND étudiés. Il est alors nécessaire d'utiliser un protocole simplifié, moins gourmand en temps et permettant d'étudier des échantillons très peu concentrés en MOND, sans en modifier leur caractéristiques. Ce protocole doit principalement permettre de déterminer les paramètres de complexation de la MOND avec le métal étudié.

Le protocole utilisé sera alors réduit aux étapes de filtrations, analyse du COD, mesure du métal total à pH acide, réalisation d'un pseudopolarogramme afin de déterminer E_{dep} , puis d'un ajout logarithmique avec suivi cinétique afin de déterminer les paramètres de complexation cinétiques et à l'équilibre du métal étudié. Ce protocole nécessite alors, environ, plus qu'une semaine d'analyses pour un échantillon.

CHAPITRE III :

APPLICATION EXPERIMENTALE :
ETUDE D'UN ECHANTILLON NATUREL
MARIN CONCENTRE

Chapitre III. Application expérimentale : Etude d'un échantillon naturel marin concentré

L'étude de la MOND et notamment la MOND marine reste à ce jour un challenge dû au fait que la MOND marine se trouve à de très faibles concentrations dans la majorité des eaux naturelles.

Le groupement de recherche MONALISA, dont l'objectif est de comprendre le rôle de la Matière Organique Naturelle (MON) dans le cycle des contaminants et de mettre en relation ses caractéristiques avec ses propriétés complexantes vis-à-vis des contaminants chimiques, nous a donné l'opportunité d'étudier un échantillon de MOND marine avant et après concentration. Ceci nous permet à la fois de valider le protocole de concentration utilisé ainsi que la technique de caractérisation développée et exposée précédemment sur un échantillon de MOND marine non concentrée ; mais aussi de déterminer les paramètres de complexation d'une MOND marine pouvant ensuite être utilisée comme MOND marine modèle dans des logiciels de calcul de spéciation ou de transports de contaminants.



Figure III-1 : Point de prélèvement de l'échantillon utilisé dans cette étude

L'intérêt de ce site de prélèvement dans la petite rade de Toulon, réside dans le fait qu'il se situe dans une baie semi-fermée soumise à de fortes activités anthropiques (port militaire, tourisme, aquaculture). Dans ce programme, 950 litres d'eau de mer ($92\mu\text{mol}_C.L^{-1}$ soit $1,1\text{ mg}_C.L^{-1}$) ont été prélevés à 1m de profondeur, à l'aide d'une pompe en téflon à membrane (Retsch GmbH), dans la Baie de Balaguier (Figure III-1 ; coordonnées GPS : $43^{\circ}05'51,70\text{ N}$, $5^{\circ}54'28,50\text{ E}$) dans la petite rade de Toulon. Cet échantillon a ensuite directement été filtré en ligne à $0,22\mu\text{M}$ sur un filtre Téflon (Whatman, Polycap 150TF) puis stocké à 4°C dans des bouteilles Nalgène de 20, 50 et une bouteille de 1L afin de pouvoir conserver une partie de l'échantillon brut avant sa concentration. 940 L ont ensuite été concentrés au laboratoire de Physico-Toxicochimie des Systèmes Naturels de Bordeaux (LPTC, dans l'équipe

Macromolécules Organiques Complexes et Spectroscopie Optique sous la responsabilité du Dr. Edith Parlanti dans le cadre de la thèse d'Arnaud Huguet). La filtration a été effectuée, tout d'abord, par nanofiltration, afin de filtrer rapidement un large volume d'eau de mer et de le réduire à 32L en abaissant, en fin de processus, la salinité du rétentat à 10,2 ; puis par une osmose inverse (32L réduits à 10,5L) pour éviter les pertes en carbone et une modification trop importante de la MOND lors de la concentration (concentration finale en carbone organique dissous de $2533\mu\text{mol}_C.L^{-1}$ et une salinité de 28).

Dans cette expérience, 1,5 litres de cet échantillon ont été conservés pour étudier la réactivité de la MOND concentrée, ainsi qu'un litre d'échantillon initial filtré à $0,22\mu\text{m}$. Ceux-ci ont été conservés à 4°C et à l'obscurité après avoir ajouté du NaN_3 ($100\mu\text{L}$ de 1M / $0,25\text{L}$) afin d'éviter tout développement biologique. Ces deux échantillons conservés, puis analysés dans les mêmes conditions, seront utilisés afin de comparer les propriétés de la MOND avant et après concentration.

Une partie de l'échantillon a ensuite été passé sur une résine de type Chelex 100, de manière à retirer les cations majeurs et par conséquent les pollutions métalliques causées par la technique de concentration, et afin de pouvoir étudier ses propriétés complexantes.

L'étude de l'échantillon se déroule en deux temps. Tout d'abord une caractérisation de l'échantillon concentré, avant passage sur résine Chelex, entreprise par une approche uniquement pseudopolarographique ; ce travail a donné lieu à une publication dans *Analytica Chimica Acta* (Nicolau R. *et al.*, 2008, **Annexe 5**) et sera développé dans la suite de la thèse. Ensuite, l'échantillon concentré dans le cadre du GDR MONALISA est analysé, afin d'en déterminer ses paramètres de complexation à l'équilibre vis-à-vis du cuivre et du calcium. Afin de valider le protocole utilisé, l'échantillon naturel, avant concentration, est aussi étudié suivant le même protocole, dans le but de pouvoir certifier que les différents processus de concentration n'ont pas significativement modifié la qualité de la MOND étudiée. Le travail réalisé a lui aussi donné lieu à la soumission d'une publication (Louis Y. *et al.*, soumise à *Marine Environmental Research*).

IIIA. Etude des interactions de la MOND marine concentrée avec le cuivre et le zinc par pseudopolarographie

Le but de l'étude pseudopolarographique réalisée ici est principalement d'étudier les complexes de cuivre dans un échantillon de MOND marine concentrée. Cependant, comme la procédure voltamétrique utilisée dans cette étude permet de mesurer également le pic de réoxydation du zinc, une interprétation du comportement de celui-ci, en plus de celui du cuivre qui était initialement l'objet de l'étude, a été entreprise.

Malgré l'observation de quantités non négligeables de cuivre et de zinc dans l'échantillon, la formation de composés intermétalliques « CuZn » n'est pas attendue dans cette étude. En effet, les concentrations observées dans l'échantillon étudié (de l'ordre du micro molaire), sont trop faibles comparées à celles pour lesquelles on reporte l'existence de ces composés (de l'ordre du milli molaire, Sahlin E. et Jagner D., 1998 ; Wise J.A. *et al.*, 1983).

IIIA1. Analyses préalables

Les concentrations totales en cuivre mesurées dans l'échantillon initial sont de $1,48 \pm 0,12 \times 10^{-8}$ M alors que dans l'échantillon concentré, cette concentration est 100 fois supérieure ($143 \pm 17 \times 10^{-8}$ M). Ce facteur est proche du facteur de concentration utilisé (940 L à 10,5 L), ceci montre que le métal est majoritairement lié à la MOND qui a été concentrée. D'autre part, si l'on se base sur les concentrations en carbone de l'échantillon avant et après concentration, on passe respectivement de 92 à $2533 \mu\text{mol}_C \cdot \text{L}^{-1}$; le facteur de concentration est beaucoup plus faible, ce qui montre une perte importante de MOND lors des étapes de concentration avec probablement une rétention de la partie complexante de celle-ci, si l'on s'appuie sur le facteur de concentration observé pour le cuivre, ou encore une redistribution du métal au cours de la concentration.

Un premier set de voltamogrammes est réalisé sur l'échantillon concentré sans addition de métaux supplémentaires du fait de la forte concentration en cuivre et zinc dans cet échantillon (respectivement $143 \pm 17 \times 10^{-8}$ M pour le cuivre et $90 \pm 3 \times 10^{-8}$ M pour le zinc). Ces voltamogrammes permettent de représenter les pseudopolarogrammes du cuivre et du zinc directement obtenus après concentration à des potentiels de balayage respectifs d'environ -0,18 V et -1 V (**Figure III-2**).

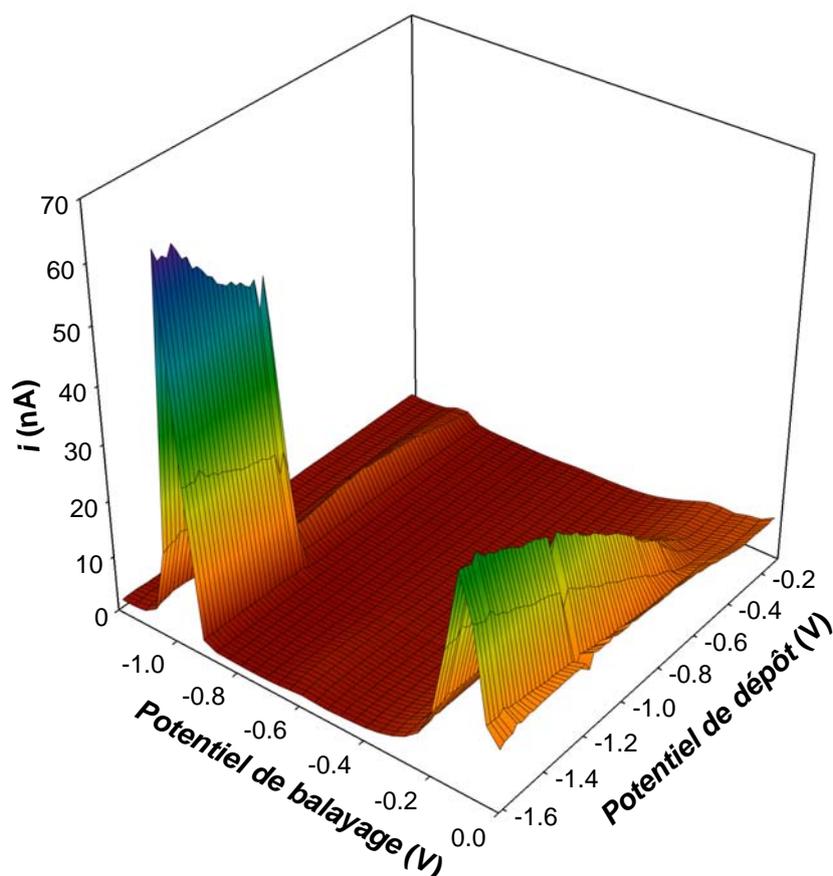


Figure III-2 : Pseudopolarogrammes du cuivre et du zinc obtenus pour l'échantillon de MOND marine concentrée sans addition de métal. pH = 8,3, E_{dep} de -1,6 à -0,02V par pas de 20 mV, $t_{\text{dep}} = 360$ s

Les pics de cuivre et de zinc sont bien définis et bien séparés, il est donc aisé de construire les pseudopolarogrammes 2D correspondants. Il est intéressant de noter ici, que bien que la concentration en cuivre totale soit 3,5 fois supérieure à celle du zinc, la hauteur du pic de cuivre à un potentiel de dépôt de -1,6 V est environ égale à la moitié de celle du zinc. Si l'on prend en compte le fait que dans un milieu marin, la réaction du cuivre se fait suivant un transfert d'un seul électron dû à la présence de chlorures (Nelson A. et Mantoura R.F.C., 1984), et que la sensibilité est la moitié de celle nécessaire à l'échange de 2 électrons, il reste toujours le facteur de 3,5 à expliquer. Cette intensité assez faible observée pour le signal du cuivre peut être attribuée à la présence de complexes organiques non électro-actifs à ce potentiel et/ou qui ont un coefficient de diffusion plus faible que celui du cuivre libre/labile. Cet exemple illustre bien que les expériences réalisées sur des échantillons naturels doivent être analysées avec méfiance et en accord avec le comportement théorique attendu afin de ne pas arriver à des conclusions erronées comme: déterminer une concentration en métal total alors que seule une partie du métal est mesurée à -1,6 V.

III A2. Pseudopolarogrammes du cuivre

Des pseudopolarogrammes ont ensuite été réalisés sur le même échantillon tout d'abord sans addition de cuivre (courbes 1, **Figure III-3**), avec des additions de 4 μM (courbes 2) et 8 μM (courbes 3) à pH naturel (symboles vides, **Figure III-3**) puis à pH = 4 (symboles pleins, **Figure III-3**) et enfin à pH = 2, après acidification avec de l'acide nitrique 69% suprapur

(J.T. Baker). Les résultats obtenus à pH = 2 étant très similaires de ceux obtenus à pH = 4, ils ne sont pas représentés sur les graphiques.

La **Figure III-3,a** présente les pseudopolarogrammes bruts obtenus dans les différentes conditions décrites ci-dessus ; les pointillés représentent les concentrations de métal total calculées qui seraient mesurées en l'absence de toute complexation organique. Ces concentrations sont obtenues à partir de la sensibilité obtenue sur ce même échantillon passé aux UV, et donc exempt de MOND.

La partie **Figure III-3,b** représente ces mêmes pseudopolarogrammes normalisés à la concentration en cuivre total (représentées en pointillés sur la **Figure III-3,a**).

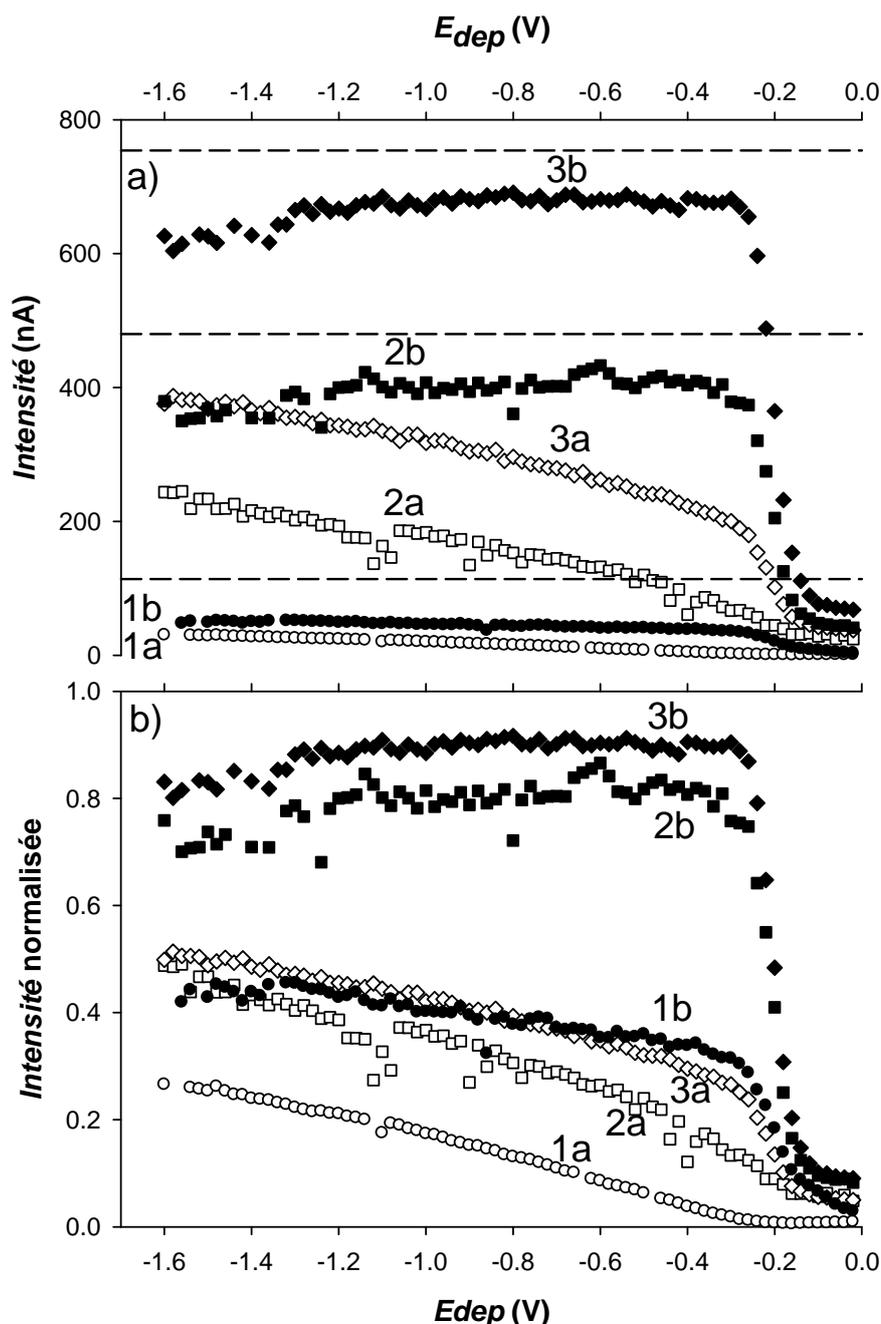


Figure III-3 : Pseudopolarogrammes du cuivre obtenus pour des pH de 8.3 (symboles vides) et 4 (symboles pleins) à des concentrations de cuivre naturel (courbes 1) puis pour des ajouts de 4 et 8 μ M (resp. courbes 2 et 3). a) pseudopolarogrammes bruts avec en tirets les valeurs de métal attendues en l'absence de complexation (sans MON), b) normalisation à la valeur de cuivre total

La forme des pseudopolarogrammes, obtenus sans addition et avec la première addition de cuivre (**Figure III-3**, courbes 1a et 2a), montre clairement que la vague correspondante à la réduction de l'espèce libre/labile du cuivre n'est pas encore apparue. Il n'y a donc pas, ou du moins, très peu, de cuivre sous forme labile pour 4 μM de cuivre ajouté. Seule une augmentation continue d'intensité commençant aux alentours de -0,25 V peut être observée ; celle-ci pourrait être représentative, comme nous allons le voir, d'une partie de cuivre liée plus ou moins fortement à des complexes organiques.

Ensuite, avec la seconde addition de cuivre (courbes 3a) une vague bien définie au potentiel de -0,2 V fait son apparition. Ceci indique une soudaine augmentation de la concentration en cuivre libre/labile par rapport aux complexes de cuivre organiques.

Plusieurs interprétations peuvent être données pour expliquer l'augmentation progressive de l'intensité du courant pour des potentiels de dépôts plus négatifs que -0,3 V (visible sur les expériences à pH = 8,3).

De nombreux auteurs expliquent cette augmentation du courant à des potentiels plus négatifs que celui de l'espèce labile/libre du métal considéré par la réduction de divers complexes organiques (Branica G. et Lovrić M., 1997 ; Croot P. *et al.*, 1999 ; Lewis B.L. *et al.*, 1995 ; Omanović D. *et al.*, 1998 ; Tsang J.J. *et al.*, 2006) en considérant qu'il n'existe que peu de différence dans les coefficients de diffusion des différentes espèces. D'autres, s'appuient sur une différence de coefficient de diffusion des différents complexes organiques en assumant que tous les complexes sont labiles pour expliquer cette augmentation de potentiel (Chakraborty P. *et al.*, 2007 ; Cheng T. et Allen H.E., 2006 ; Town R.M. et Filella M., 2000b). Mais, bien souvent, ils utilisent une fenêtre de dépôt bien trop étroite ne permettant pas de pouvoir observer des vagues qui correspondraient à la réduction de complexes inertes. Le coefficient de diffusion restant la principale inconnue, non déterminable à partir de ces données, il n'est pas possible de tirer de valeurs quantitatives quant aux espèces de cuivre présentes à partir de ces résultats ; cependant, certaines relations peuvent tout de même être mises en évidence.

Les pseudopolarogrammes obtenus au pH naturel (**Figure III-3**, symboles vides) n'atteignent pas de plateau dans la fenêtre analytique utilisée, et probablement ne l'atteindraient pas à des potentiels plus négatifs. En effet, l'augmentation graduelle d'intensité vers des potentiels de dépôts plus négatifs que -0,3 V montre la perte de labilité des complexes organiques de cuivre et peut être assimilée à la réduction progressive de différents complexes organiques ayant des constantes de stabilité croissantes (Croot P. *et al.*, 1999).

L'absence de vague correspondant à une forme labile/libre du cuivre sur le pseudopolarogramme obtenu sans addition de cuivre, montre que le cuivre existe principalement sous forme de complexe organique relativement fort dans cet échantillon. Par addition de cuivre, la distribution des espèces de celui-ci change, formant des complexes plus labiles allant jusqu'à la libération d'une forme libre pour la deuxième addition de cuivre. De plus, la position de cette vague (courbes 3a) correspond bien à celles des autres courbes obtenues à un pH plus acide (courbes 1b, 2b, 3b).

L'acidification de l'échantillon conduit à une redistribution des complexes de cuivre organiques à des formes inorganiques ; ceci est une conséquence de la compétition existante entre le proton et le cuivre pour les sites de liaison de la MOND plutôt de type carboxylique (pKa moyen de 4,5).

Les sites plutôt de type phénolique (pKa moyen de 10), avec une forte affinité pour les protons sont peu influencés sur ce type d'échantillon concentré en MOND, comme montré par Lu Y. et Allen H. (2002) pour des eaux douces. Les 3 pseudopolarogrammes mesurés au pH =

4 montrent qu'une large fraction du cuivre se retrouve dissociée des complexes organiques. Les courants limites des pseudopolarogrammes pour les 2 additions de cuivre approchent des valeurs calculées pour du cuivre non complexé. La différence entre le courant limite obtenu et celui attendu étant la même pour les 3 pseudopolarogrammes, implique que tous les complexes ne sont probablement pas détruits à ce potentiel pour un pH = 4.

Les pseudopolarogrammes normalisés (**Figure III-3,b**) à la valeur attendue, montrent que pour des concentrations de cuivre plus fortes, la proportion de ces complexes devient plus faible. Cette relation indique que pour des conditions faiblement acides (pH = 4), le proton est un fort compétiteur du cuivre pour ces sites actifs de la MOND. Ces effets de compétition seront abordés dans la seconde partie du travail.

Sur la **Figure III-4,a**, les pseudopolarogrammes ont été normés à l'intensité du point le plus négatif; ainsi cette transformation illustre graphiquement la capacité de l'échantillon à complexer le cuivre, que ce soit avec des ajouts de cuivre ou un changement de pH. La relation entre le potentiel de pic (**Figure III-4,b**) et la largeur du pic à mi-hauteur (**Figure III-4,c**) en fonction du potentiel de dépôt peut fournir des informations supplémentaires sur les réactions électrochimiques se produisant.

Une nette différence peut être observée pour l'expérience menée sans addition de cuivre (**Figure III-4**, courbes 1a), que ce soit pour la position du pic ou sa largeur à mi hauteur. Ceci montre l'apparition d'une majorité de cuivre labile, observable par un shift du potentiel du pic vers des potentiels plus positifs.

La largeur à mi-hauteur apporte aussi une information, bien que sa détermination soit perturbée, ici, par la soustraction de la ligne de base. Une augmentation significative de la largeur à mi-hauteur, non visible dans le cas présent, pourrait, par exemple, indiquer l'existence de deux pics surimposés pouvant venir de phénomènes d'adsorption, nécessitant, donc, de procéder à une déconvolution plus précise du pic mesuré. Dans le cas du cuivre en milieu marin, il faudra noter que la valeur moyenne autour de 90 mV observée ici correspond bien à l'échange d'un électron espéré dans ce type de milieu (Nelson A. et Mantoura R.F.C., 1984).

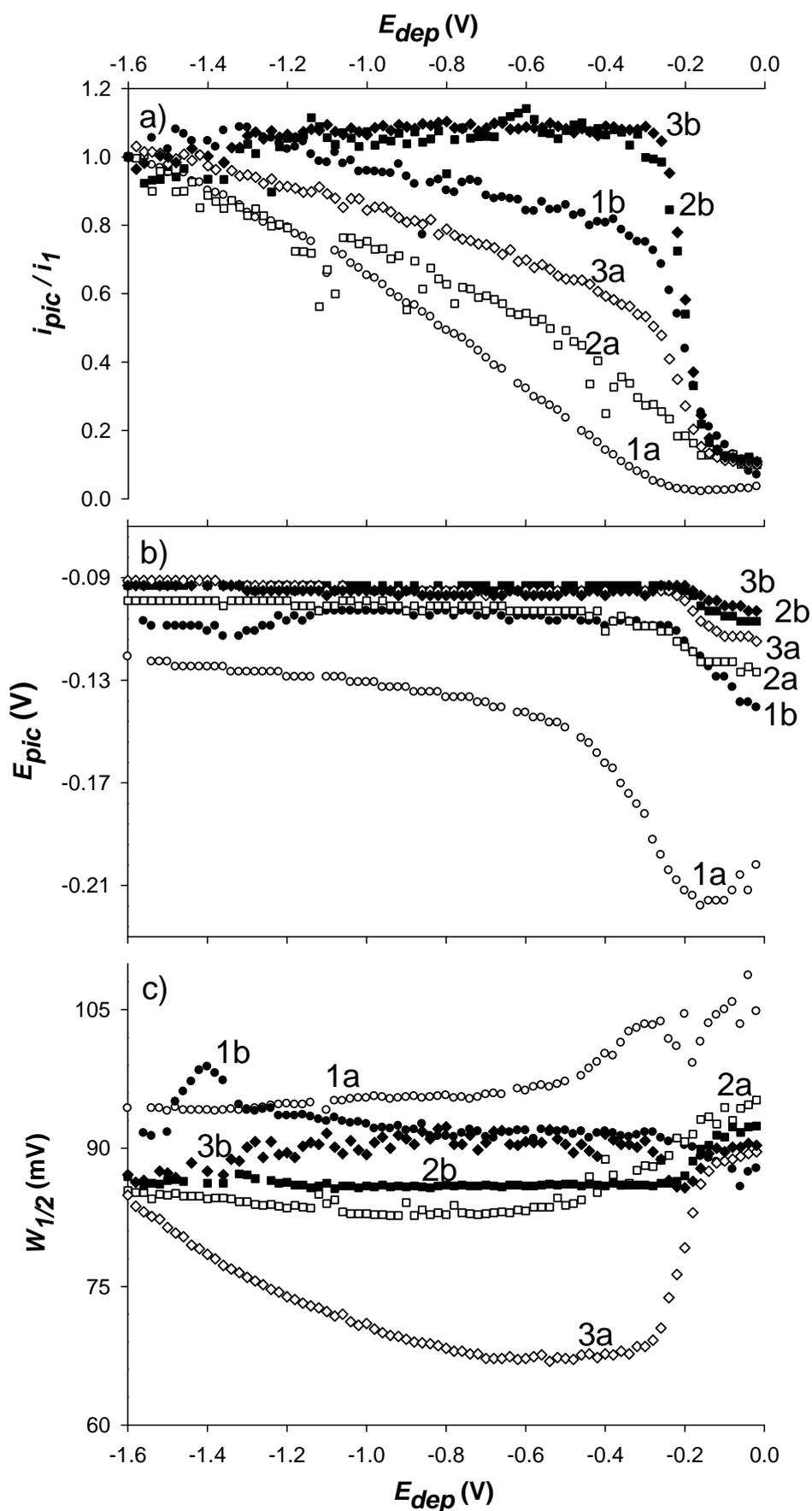


Figure III-4: a) Pseudopolarogrammes du cuivre de la Figure III-3 normés au premier point, pH de 8.3 (symboles vides) et 4 (symboles pleins) à des concentrations de cuivre naturel (courbes 1) puis pour des ajouts de 4 et 8 μM (resp. courbes 2 et 3), b) potentiels du pic de cuivre, c) largeur du pic de cuivre à mi-hauteur

IIIA3. Pseudopolarogrammes du zinc

Les données du zinc, présentées sur la **Figure III-5**, ont été obtenues simultanément à celles du cuivre, et donc dans des conditions tout à fait identiques à celles décrites pour le cuivre précédemment. Aucune addition de zinc n'a été réalisée dans les expériences, les seules différences observées étant dues aux variations de pH et/ou concentrations de cuivre ajoutées.

Dans la **Figure III-5,a**, les intensités brutes des pseudopolarogrammes sont représentées avec en encart un détail des pseudopolarogrammes pour les potentiels les plus positifs ; sur cette figure, une forte dépendance de l'intensité des pics au pH du milieu peut être observée. Cette même observation peut être faite concernant la position du pic **Figure III-5,b** ou encore la largeur du pic à mi-hauteur **Figure III-5,c**. Ainsi, quelque soit la quantité de cuivre ajoutée, les signaux sont principalement regroupés suivant leur pH.

Malgré la difficulté de mesurer le zinc à pH = 2, vu sa proximité avec le mur de réduction du proton, les pseudopolarogrammes obtenus à ce pH montrent une forme particulière (**Figure III-5,a**) avec une amplitude inférieure aux autres pseudopolarogrammes indiquant une possible adsorption de MOND protonée à la surface de l'électrode de travail. Cette MOND protonée et potentiellement adsorbée n'est toutefois pas observable sur les pseudopolarogrammes du cuivre dû au fait que celle-ci, se retrouverait désorbée à un potentiel supérieur au potentiel de charge nul de l'électrode de travail (-0,6V), lors de l'étape de ré-oxdation. De plus, la vague pseudopolarographique du zinc est déplacée négativement d'environ 200mV (**Figure III-5,a**), avec un changement de pente notable, pouvant indiquer une réaction cathodique quasi-réversible ou irréversible (Omanović D. et Branica M., 2004 ; Omanović D., 2006). Au même moment, les potentiels de pics sont décalés de 60 à 70 mV vers des potentiels plus positifs, que ceux observés aux pH de 8,3 et 4, ce qui peut indiquer la disparition de complexes labiles qui se situeraient à des potentiels plus négatifs.

Si l'on regarde les pics de ré-oxdation observés pour des potentiels de dépôt plus positifs que ceux de réduction (encart **Figure III-5,a**), on peut voir que le maximum d'intensité est observé aux alentours de -0,7 V pour des pH naturels, alors qu'il est situé vers -0,2 V pour un pH = 4, et qu'il n'y a pas de pics observables à pH = 2 où toute la MOND est protonée et n'est donc plus capable de se complexer avec le zinc. Que la MOND soit adsorbée ou non à l'électrode, à pH acide l'accumulation du zinc sur l'électrode n'est pas facilitée, que ce soit lors du potentiel d'accumulation, ou du balayage réalisé lors de la ré-oxdation.

Etant donné la forme du pseudopolarogramme observée à pH = 4, pour les potentiels de dépôt plus positifs que ceux de réduction (encart **Figure III-5,a**), on peut penser à un effet de compétition entre le proton (H^+) et le zinc (Zn^{2+}) sur les sites de liaison de la MOND, avec un avantage pour le proton surtout pour des pH inférieurs à 4, contrairement au cas du cuivre. Ceci montre l'importante quantité de sites complexants de type carboxylique (Lu Y. et Allen H., 2002), et de plus, révèle aussi que les sites de liaison du zinc et du cuivre sur la MOND ne sont pas identiques. Etant donné que les interactions Cu-MOND sont généralement plus fortes que celles avec le zinc (Hirose K., 2006), et que la concentration de cuivre augmente, il est probable que le zinc ne soit pas lié par les sites de la MOND spécifiques au cuivre qui ont été précédemment décrits comme étant plutôt de type phénolique. Le zinc serait donc plutôt lié par des sites plus faibles avec des propriétés acides de type carboxylique couvrant des pKa allant de 1 à 7 (Perdue E.M., 1985 ; Lu Y. et Allen H., 2002).

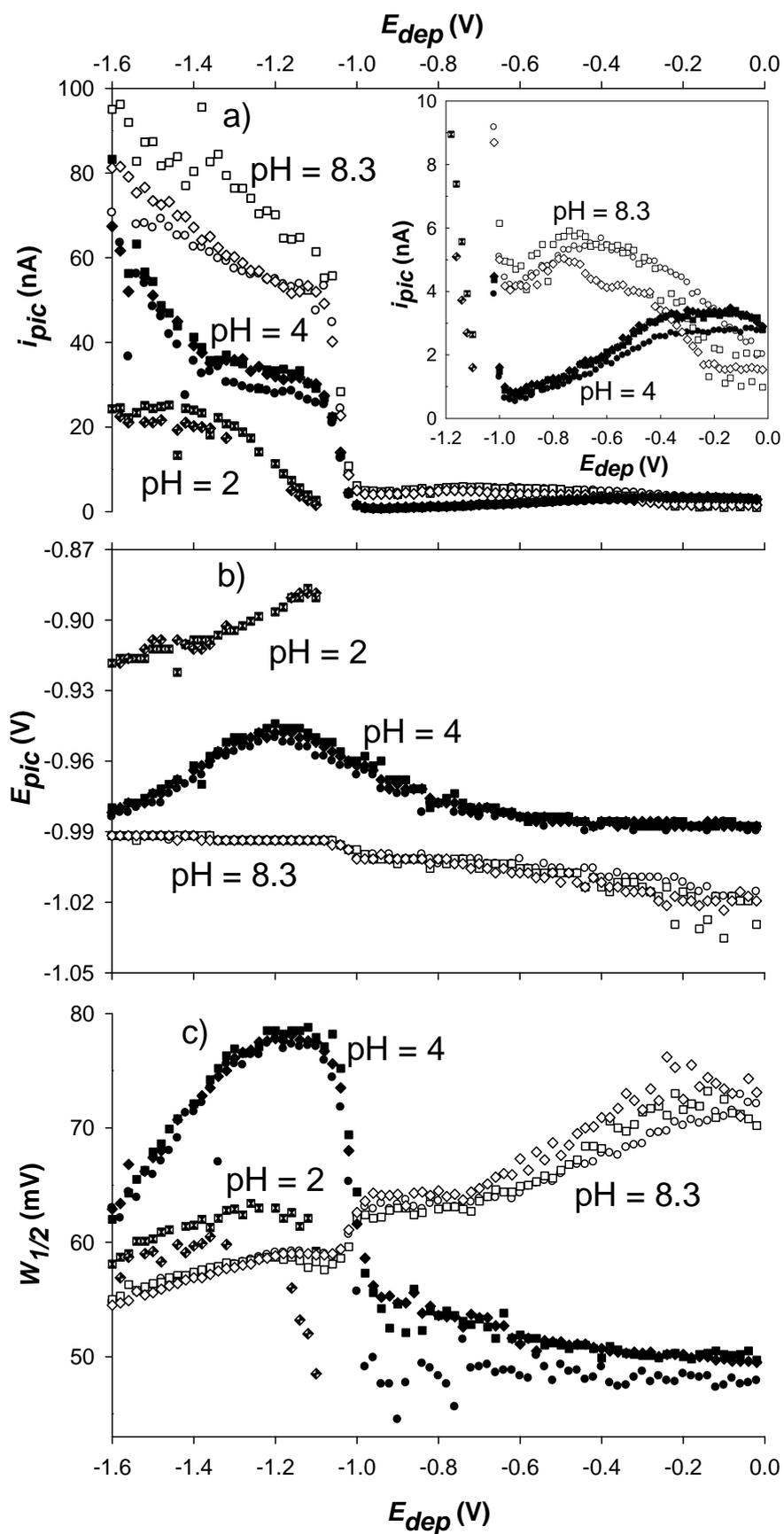


Figure III-5 : a) Pseudopolarogrammes bruts du zinc pour des pH de 8,3 (symboles vides), 4 (symboles pleins) et 2 (symboles bicolorés) à des concentrations de cuivre naturel (symboles ronds) puis pour des ajouts de 4 et 8 μ M de cuivre (resp. symboles carrés et losanges), b) variation du potentiel du pic de zinc, c) largeur du pic de zinc à mi-hauteur

La redistribution des espèces labiles du zinc avec le changement de pH peut particulièrement être observée avec les courbes montrant le potentiel du pic (**Figure III-5,b**) et la largeur à mi-hauteur (**Figure III-5,c**) en fonction du pH. Comme mentionné précédemment, le décalage du potentiel de pic vers des potentiels plus négatifs est lié à la présence de complexes de zinc labiles ; cependant, les causes possibles de ce décalage de pic en fonction du potentiel de dépôt peuvent être multiples. On peut, par exemple, spéculer sur l'existence d'une adsorption de MOND neutre à la surface de l'électrode de travail, favorisée au potentiel de charge nul de l'électrode de mercure, ou encore, l'adsorption d'espèces chargées pouvant influencer le signal aux potentiels les plus positifs comme à ceux plus négatifs (Plavšić M. et Čosović B., 1994).

La complexité des pseudopolarogrammes obtenus, particulièrement dans le cas du zinc, ne permet pas à l'heure actuelle de pouvoir tirer des informations quantitatives, utilisables en terme de spéciation. Des expériences supplémentaires seraient donc nécessaires afin d'obtenir des informations plus détaillées concernant le zinc et ses interactions éventuelles avec le cuivre.

IIIB. Caractérisation et modélisation des interactions de la MOND marine avec le cuivre, le calcium et le proton

Le même échantillon concentré est utilisé ici après passage sur une résine échangeuse cationique de type Chelex100. Ceci principalement de manière à réduire les fortes concentrations en métaux initiales, mais aussi les concentrations en cations majeurs qui empêcheraient une titration acido-basique à des pH élevés de par la formation d'un précipité. Cependant, ayant fortement diminué la concentration en cations majeurs, par l'emploi de la résine Chelex, et ayant donc diminué leur effet de compétition vis-à-vis du cuivre, et vue la forte concentration de carbone présente dans l'échantillon, seule l'approche à l'équilibre a été utilisée dans cette étude, au détriment de l'approche cinétique.

L'échantillon naturel, avant l'étape de concentration, est aussi analysé ici, afin de voir si le traitement de concentration a significativement altéré, ou non, les propriétés de la MOND naturelle étudiée.

IIIB1. Etude potentiométrique de l'échantillon concentré

Afin de déterminer la quantité de sites acides de la MOND, une titration potentiométrique est effectuée. Ceci a été possible grâce à la concentration suffisamment élevée en carbone obtenue après concentration ($1,2 \text{ mmol}_C.L^{-1}$). 40 ml d'échantillon ont été mis manuellement de pH 8,2 à pH 2 avec de l'acide nitrique puis, purgés pendant 20 minutes avec de l'azote, avant l'analyse, afin de retirer les carbonates. Ensuite une titration pas à pas a été réalisée avec de la soude 0,1M afin d'atteindre un pH de 11.

La courbe de titrage, obtenue expérimentalement (**Figure III-6**), a été comparée à une courbe de titrage théorique (trait plein), obtenue pour de l'eau milliQ à la même force ionique de 0,7M.

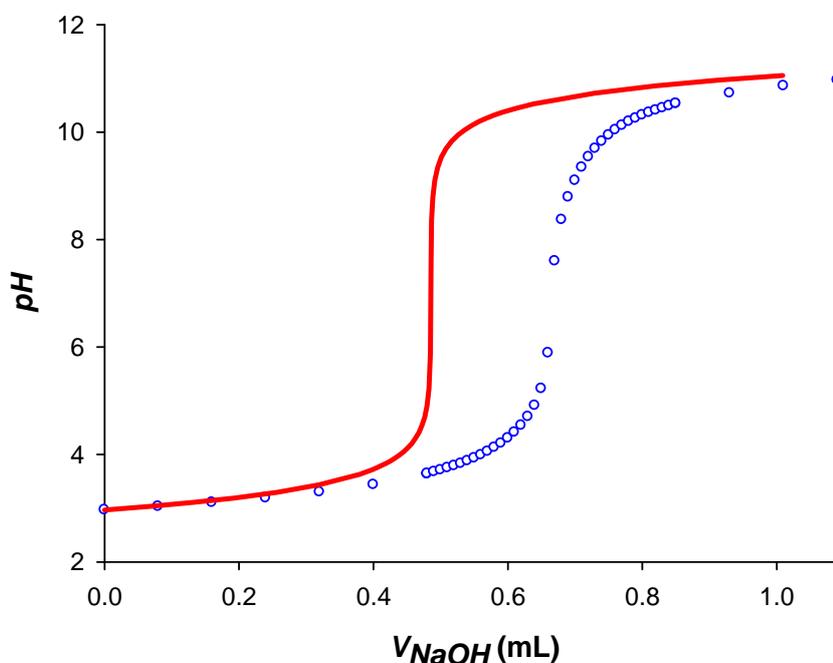


Figure III-6 : Courbe de titrage potentiométrique de l'échantillon de MOND marine concentrée (cercles vides, $COD=1,2 \text{ mmol}_C.L^{-1}$) comparée à celle théorique de l'eau milliQ (trait plein)

La différence entre ces 2 courbes représentées **Figure III-7** montre la répartition des sites acides suivant le pH ; on distingue ainsi aux alentours de pH 5 et 10 deux vagues permettant de distinguer deux classes de sites. Afin de pouvoir obtenir les constantes d'acidité de ces sites, une modélisation par le logiciel PROSECE a été effectuée. Le nombre de sites nécessaire pour cette modélisation a, lui aussi, été modélisé de manière à avoir une erreur minimale sur le fitting, pour un minimum de sites complexants. Dans ce cas, 4 sites se sont montrés suffisants afin d'obtenir un bon fitting (**Figure III-8**).

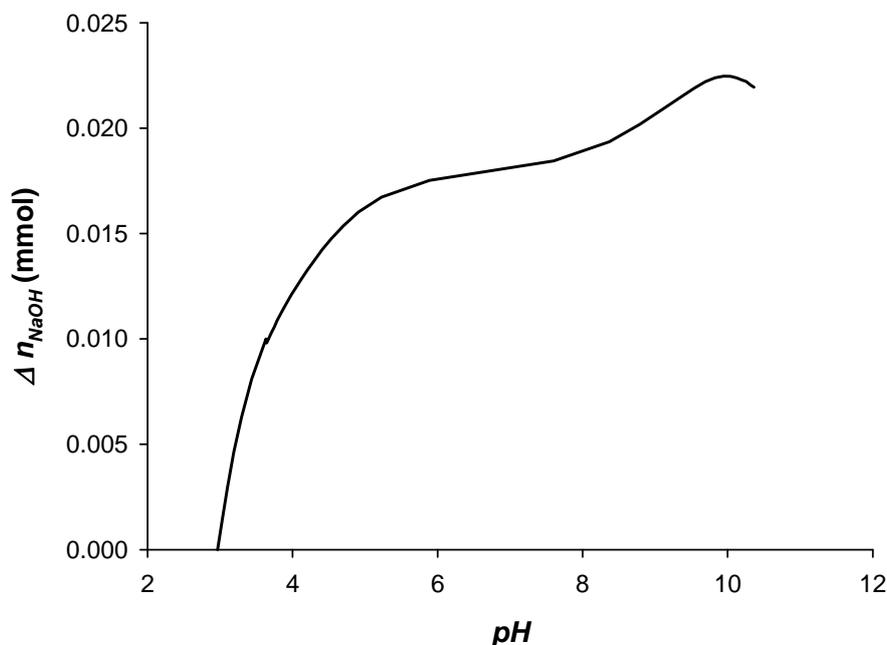


Figure III-7 : Titration potentiométrique de l'échantillon de MOND marine concentrée ($\text{COD}=1,2\text{mmol}_C\cdot\text{L}^{-1}$) représenté par la variation du nOH (expérimental-théorique) en fonction du pH

La **Figure III-8** présente la courbe de titration potentiométrique avec en trait plein le fitting obtenu pour 4 types de sites acides, chacun défini par sa concentration et sa constante d'acidité (**Tableau III-1**). On peut ainsi constater que, globalement, il existe moins de 1% d'erreur entre chaque point de la courbe expérimentale et le même point situé sur la courbe modélisée, mis à part un point à 3,5% au niveau de la zone du virage pour ce fitting pouvant être expliqué par un temps d'équilibre insuffisant dans cette zone soumise à un brusque changement de pH.

Tableau III-1 : Concentrations et constantes de complexation des 4 sites acides optimisés pour le fitting des données expérimentales

	L_{H1}		L_{H2}		L_{H3}		L_{H4}		Type Carboxylique	Type Phénolique	Sites acide Totaux
L_{HT} ($\text{meq}\cdot\text{mol}_C^{-1}$)	$210 \pm 10,8$	$54 \pm 2,4$	$80,4 \pm 1,2$	$100,8 \pm 1,2$	265,2	181,2	446,4				
pKa	$3,6 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,1$	$8,6 \pm 0,1$	$12,0 \pm 0,4$							

L'échantillon présente une densité totale de sites acides de $446,4 \pm 15,6 \text{ meq}\cdot\text{mol}_C^{-1}$ ce qui correspond à environ 2,7 fois plus de sites que la MOND, également concentrée par osmose inverse, étudiée par Lu Y. et Allen H. (2002) pour la rivière Suwannee. Ceci tend à montrer que la MOND marine étudiée ici est plus réactive vis-à-vis du proton.

Si l'on calcule la concentration de sites acides présente en solution lors de la titration en meq, on obtient 0,024 meq, ce qui est un peu inférieur à la limite de 0,04 meq définie par Garnier

C. *et al.*, (2004c) ; ceci montre donc, que malgré le protocole de concentration utilisé, les paramètres déterminés dans cette étude ne l'ont pas été dans des conditions tout à fait optimales.

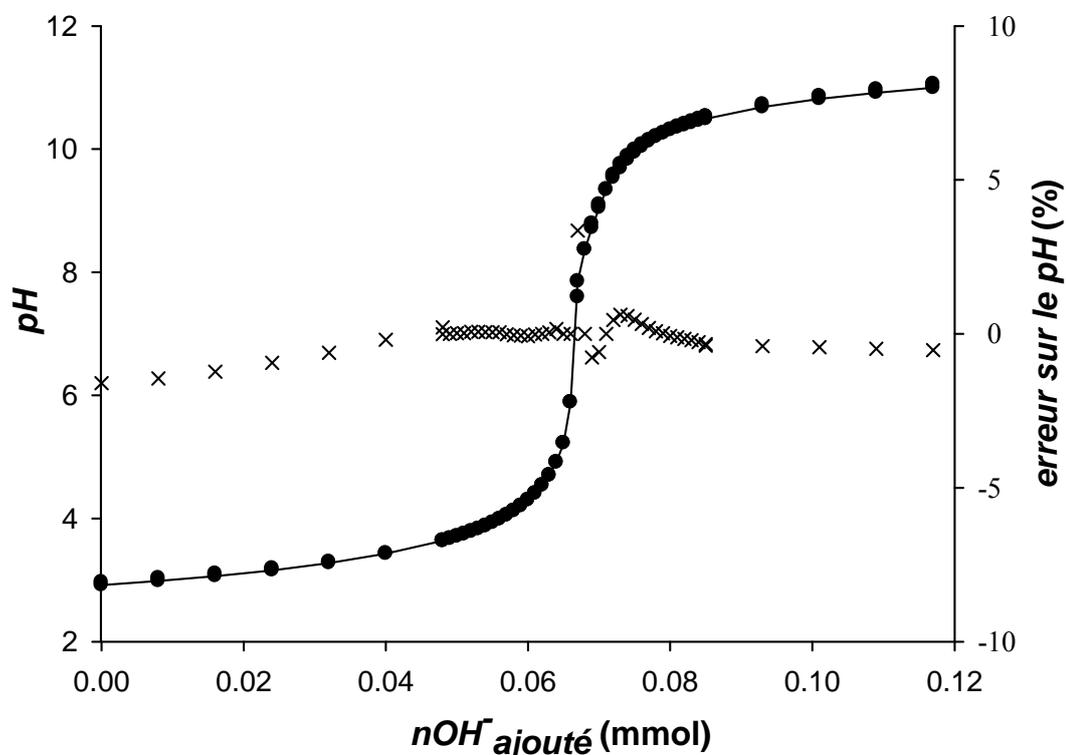


Figure III-8 : Courbe de titration potentiométrique (cercles pleins) de l'échantillon de MOND marine concentrée ($\text{COD}=1,2\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), et son Fitting par PROSECE (trait plein) pour 4 types de sites acides, croix = erreur sur le fitting en chaque point de la courbe expérimentale

Deux classes de sites acides peuvent être différenciées en tenant compte des pKa obtenus : la première, avec des pKa de 3,6 et 4,8 et représentant environ 60% de la totalité des sites acides, peut être assimilée à des sites de type carboxylique ; et la deuxième, avec des pKa respectivement de 8,6 et 12, qui représente 40% de la totalité des sites acides, peut alors être assimilée à des sites de type phénolique.

On peut, de plus, souligner pour l'échantillon de MOND marine étudié ici, que le site le plus abondant est le site appelé L_{H1} , de type carboxylique, avec un pKa de 3,6, qui représente environ 50% de tous les sites acides.

Malheureusement, comme il n'existe pas de données dans la littérature permettant de comparer nos données avec d'autres obtenues pour des MOND marine concentrées, celles-ci sont alors comparées à celles de la MOND de la rivière Suwanee étudiée par Lu Y. et Allen H. (2002). La MOND étudiée dans leur étude est composée de 30% de sites phénoliques ; dans notre cas, la MOND marine étudiée présente alors un caractère un peu plus phénolique avec 40% de ce type de sites.

Il a été montré que le caractère phénolique d'une MON pouvait être dû à une MON d'origine anthropique (Letizia D. et Gnudi F., 1999). Cette plus forte proportion de sites phénoliques pourrait donc par exemple s'expliquer par le fait que notre zone d'étude soit sous l'influence de plus forte activités anthropiques comparée à des eaux de rivières.

IIIB2. Mesures pseudopolarographiques

Une expérience exploratoire a été menée afin de coupler la technique d'ajout logarithmique aux mesures de pseudopolarographie. Pour se faire, nous avons utilisé 30ml de l'échantillon concentré auquel nous avons successivement ajouté du métal, puis mesuré un pseudopolarogramme après stabilisation du signal d'au moins une heure.

La gamme couverte s'étend au final de 10nM à 50 μ M divisée en une trentaine d'ajouts ; malheureusement, il n'est pas possible de réaliser un pseudopolarogramme par addition de métal afin de conserver un temps d'analyse raisonnablement court (3 jours !). Au-delà de cette limite, même si l'évaporation n'est pas très importante, il devient difficile de certifier que l'échantillon ne subisse pas, ou même, que peu, de modifications physico-chimiques. Il a donc été réalisé un pseudopolarogramme une fois tous les 2 ajouts. Cette expérience nous donne alors une information sur la spéciation du cuivre avec des concentrations en cuivre croissantes (**Figure III-9**).

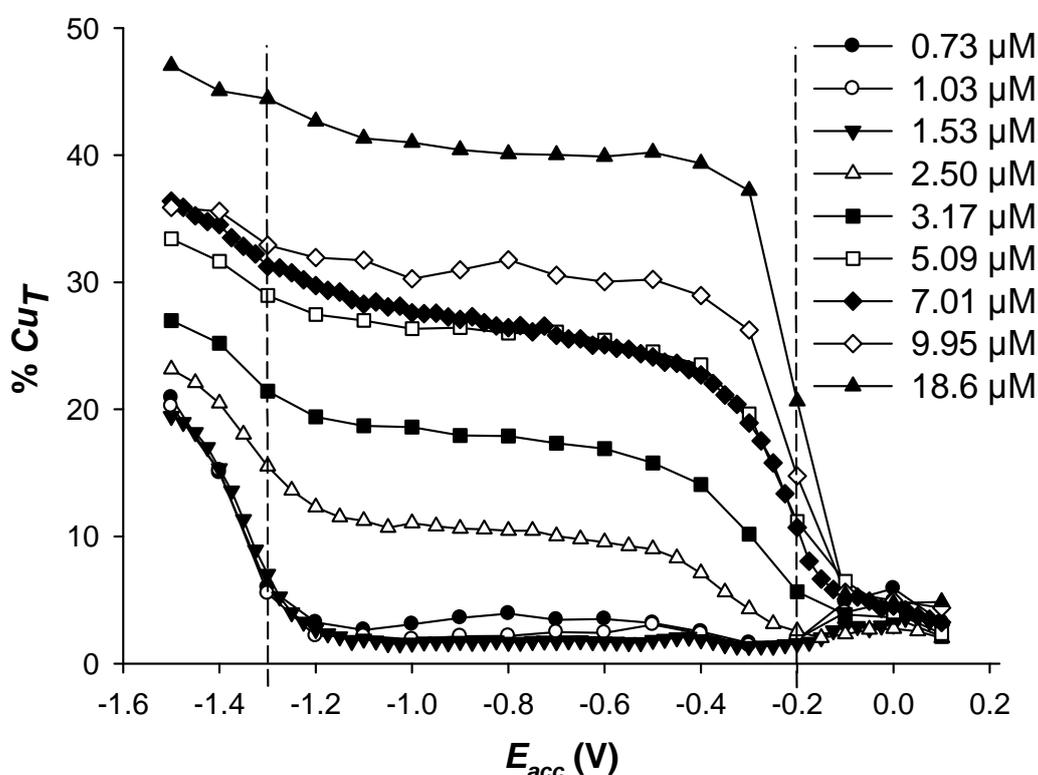


Figure III-9 : Pseudopolarogrammes obtenus par DPASV pour des concentrations en cuivre ajoutées à l'échantillon de MOND marine concentrée (pH= 8,2 ; COD=1,2mmol_C.L⁻¹) inférieures à 20 μ M, représentés en fonction de l'intensité du pic normalisée en % (équivalent à la fraction de cuivre électro-labile mesurée pour un coefficient de diffusion des espèces labiles supposé constant) en fonction du potentiel de dépôt utilisé ($T_{\text{dep}} = 297\text{sec}$ à $E_{\text{acc}} + 3\text{sec}$ à $-1,6\text{V}$)

Les pseudopolarogrammes présentés **Figure III-9** représentent les premiers ajouts de la titration logarithmique. Ils sont normalisés à l'intensité du pic attendu pour la concentration en cuivre total sans MOND. Cependant, dans le cas supposé de coefficient de diffusion constant des espèces électro-labiles, ces mêmes valeurs sont aussi représentatives de la fraction labile du métal par rapport à la concentration en métal totale. On peut donc, tout d'abord, constater que tous les complexes de cuivre ne sont pas électro-labiles dans la fenêtre analytique étudiée, ce qui indique qu'une partie importante du cuivre est liée à des complexes très forts.

Sur ces pseudopolarogrammes obtenus sur les premières additions de cuivre, 2 vagues distinctes peuvent ensuite être différenciées sur la fenêtre de potentiels de dépôt balayée ; l'une, à un potentiel de dépôt très négatif de -1,3V et l'autre, plus positive, à un potentiel de dépôt de -0,2V.

Pour les potentiels situés entre -0,2 et -1,2V, la vague observée correspond majoritairement à la réduction des complexes inorganiques du cuivre, mais aussi en plus faible partie, à certains complexes organiques relativement faibles qui peuvent être dissociés à proximité de l'électrode. Vu les faibles courants mesurés sur cette gamme de potentiels pour les pseudopolarogrammes avec des concentrations en cuivre total allant jusqu'à 1,53 μM , on peut considérer que jusqu'ici, la majorité du métal se trouve alors sous une forme complexée.

Le plateau situé à des potentiels plus négatifs que -0,2V représente les potentiels de dépôts pouvant être utilisés pour les déterminations de capacités complexante du cuivre. Dans la littérature, nous pouvons rencontrer des potentiels utilisés dans le cas de mesures de capacités complexante du cuivre allant de -0,65V (Kozelka P.B. et Bruland K.W., 1998) pour lequel des ligands faiblement complexant peuvent être plus facilement dissociés ou encore des potentiels de -0,2V (Vasconcellos M.T.S.D. et Leal M.F.C., 2001) où seul le cuivre libre est mesuré, mais avec une perte de sensibilité sur la mesure. En effet, les pseudopolarogrammes indiquent, dans le cas de cet échantillon, que l'intensité mesurée à ce potentiel de -0,2V est bien plus basse que ceux, par exemple, mesurés à -0,4V.

Il convient donc de choisir le potentiel le plus positif ayant la meilleure sensibilité afin d'éviter de mesurer une partie du métal qui pourrait être assez faiblement complexée et de perdre trop en sensibilité. Sur cet exemple, le potentiel de -0,5V est donc tout à fait approprié pour la mesure de capacité complexante.

Si l'on considère que le coefficient de diffusion moyen des complexes de cuivre labiles est peu modifié dans la gamme de concentration utilisée, la vague pseudopolarographique obtenue à des potentiels plus négatifs, au-delà de -1,2V, correspond à la réduction directe et irréversible de complexes de cuivre assez forts ou inertes, dissociés en partie par l'application d'un potentiel très négatif.

Il a été montré par le groupe de Luther III (Croot P.L. *et al.*, 1999 ; Luther III G.W. *et al.*, 2001) que le potentiel de demi vague pseudopolarographique est lié à la constante de stabilité thermodynamique des complexes dissociés ; ceci a été obtenu dans de l'eau marine avec des ligands modèles, d'où le nom donné de « Chelate scale ». Ainsi, cette échelle peut être utilisée afin d'estimer les constantes de stabilité de ces complexes.

En s'appuyant sur cette approche, la vague la plus négative observée ici aux alentours de -1,2V correspond à des complexes de cuivre ayant une constante thermodynamique $\log K$ supérieure à 40. De telles vagues ont déjà été observées sur des échantillons non concentrés (Louis Y. *et al.*, 2008). Cependant, ces valeurs de constantes ne sont en aucun cas comparables aux constantes conditionnelles obtenues à partir de la modélisation des titrations métalliques plus classiques (Croot P.L. *et al.*, 1999) pour lesquelles les constantes mesurées sont des constantes apparentes ou conditionnelles et donc beaucoup plus faibles.

On peut voir que pour des potentiels de dépôt très négatifs comme -1,5V, et pour de faibles quantités de métal ajoutés ($\leq 1,53\mu\text{M}$), quasiment uniquement des complexes organiques du cuivre peuvent être mesurés représentant seulement environ 20% de la concentration totale (si l'on considère sur la fenêtre de déposition utilisée, le même coefficient de diffusion pour toutes les espèces du cuivre). Le reste, le métal non mesuré est donc lié à des complexes plus forts ou bien inertes, qui ne sont pas réduits à ces potentiels. Ceci montre que pour les faibles concentrations en cuivre, celui-ci est en grande majorité lié avec des complexes de la matière organique dissoute et que très peu, voire pas du tout, de cuivre ne se retrouve sous une forme labile, *i.e.* à des potentiels autour de -0,5V. Une partie du cuivre commence à apparaître sous

forme labile pour une concentration de $2,5\mu\text{M}$ ajoutée, ceci indique qu'un certain type de site de MOND a été saturé entre les additions de $1,53$ et $2,50\mu\text{M}$.

La **Figure III-10** représente la même expérience mais présentée suivant la proportion de cuivre mesurée en fonction du métal total ajouté. Les différentes courbes (cercles pleins, cercles vides et croix) montrent respectivement les résultats obtenus pour un potentiel de dépôt de $-0,5\text{V}$, $-1,5\text{V}$ puis la différence entre ces 2 derniers (représentant la partie du métal devenant électro-labile pour de forts potentiels imposés).

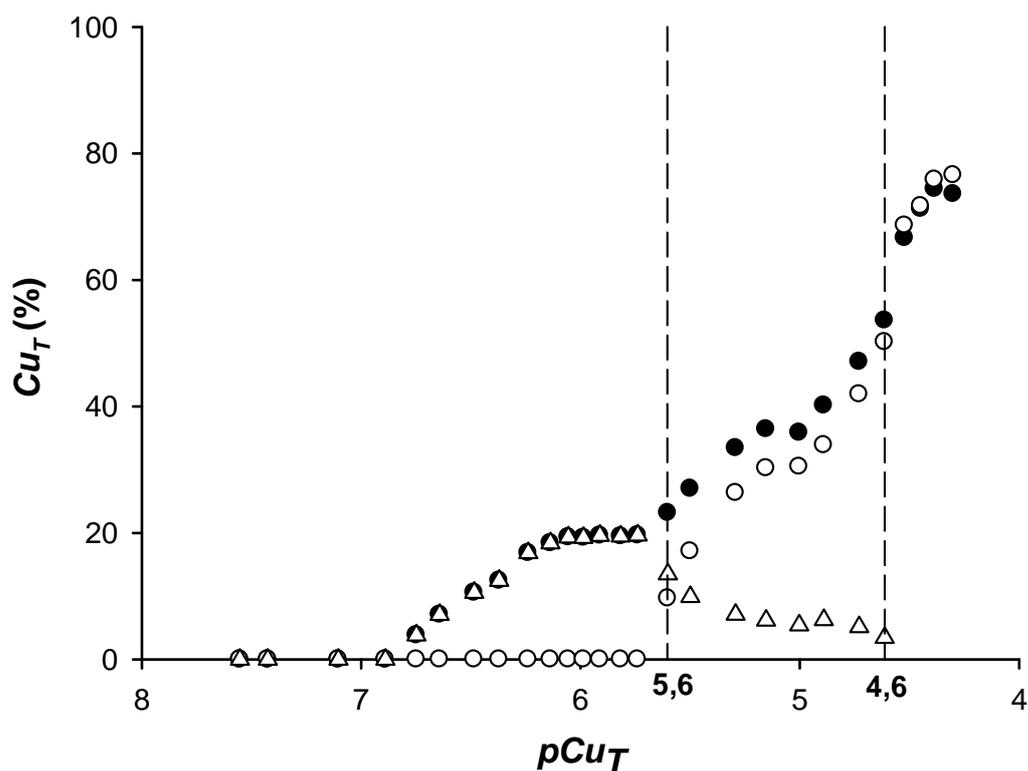


Figure III-10 : Proportions de cuivre électro-labile de l'échantillon de MOND marine concentrée ($\text{pH} = 8,2$; $\text{COD} = 1,2 \text{mmol}_C \cdot \text{L}^{-1}$) en fonction du logarithme de la concentration de cuivre ajoutée ($T_{\text{dep}} = 297 \text{sec}$ à $E_{\text{dep}} + 3 \text{sec}$ à $-1,6\text{V}$) pour 2 potentiels de dépôt (cercles vides : $E_{\text{dep}} = -0,5\text{V}$; cercles pleins : $E_{\text{dep}} = -1,5\text{V}$; triangles : différence de concentration entre ces 2 potentiels de dépôt)

Sur cette figure on voit très nettement la saturation d'un premier type de site par une brusque augmentation de la fraction en cuivre labile mesurée (cercles vides, **Figure III-10**) pour un pCu_T aux alentours de $5,6$ correspondant à une concentration de $2,50 \mu\text{M}$ et une diminution de la partie plus fortement complexée (triangles, **Figure III-10**). Ceci indique que le cuivre fraîchement ajouté n'est plus ou presque plus complexé par un type de site et se retrouve alors en partie sous forme labile (cercles vides). On s'attend donc à découvrir, au moins, un premier site de complexation avec une concentration voisine de $1,5$ à $2,5\mu\text{M}$ dans notre échantillon avec une partie dissociable (environ 20% de $2\mu\text{M}$ soit $0,4\mu\text{M}$) à des potentiels très négatifs.

De même, on peut observer une brusque augmentation du cuivre labile pour un pCu_T atteignant $4,6$ soit une concentration de $25 \mu\text{M}$ de cuivre ajouté pour environ 50% de cuivre labile mesuré ; ceci indique alors la présence d'un second site de complexation de concentration voisine de $12,5 \mu\text{M} - 2 \mu\text{M}$ du premier site, soit un site d'approximativement $10 \mu\text{M}$.

IIIB3. Détermination des paramètres de complexation du cuivre, calcium et proton

Afin de déterminer les paramètres de complexation de cet échantillon de MOND marine concentrée, passé sur Chelex100, vis-à-vis du cuivre, du calcium et du proton, différentes expériences ont été réalisées.

La première consiste en un ajout logarithmique de cuivre afin de déterminer ses propriétés de complexation à l'équilibre envers la MOND marine étudiée.

Ensuite, des expériences faisant intervenir 6 additions de calcium allant de $1\mu\text{M}$ à 20mM (*i.e.* 2 fois la concentration d'une eau marine naturelle) pour une concentration en cuivre totale fixée à $12,5\mu\text{M}$ (choisie de manière à se situer dans le milieu de la gamme de concentration utilisée précédemment), ont été réalisées afin d'étudier l'effet de compétition du calcium vis-à-vis du cuivre et d'en déterminer les constantes associées.

Enfin, une troisième expérience faisant intervenir des variations de pH allant de 8,7 à 3,5, par des ajouts de HNO_3/NaOH , et avec une concentration en cuivre fixée, cette fois-ci, à $4\mu\text{M}$ (déterminée à partir des pseudopolarogrammes obtenus pour différentes concentrations de cuivre), a été réalisée en DPASV afin d'observer l'effet du pH sur la quantité de cuivre électro-labile en solution et de déterminer ensuite les constantes de complexation ainsi que les concentrations en site de liaisons métalliques.

IIIB3a) Expérience d'ajout logarithmique de cuivre

Les ajouts métalliques réalisés pour cette expérience s'étendent de 10 nM à $50\mu\text{M}$; cependant, vu la forte teneur en carbone de l'échantillon ($1,2\text{mmol}_C.\text{L}^{-1}$), aucune concentration en métal libre n'a pu être mesurée pour des concentrations ajoutées inférieures à $0,88\mu\text{M}$.

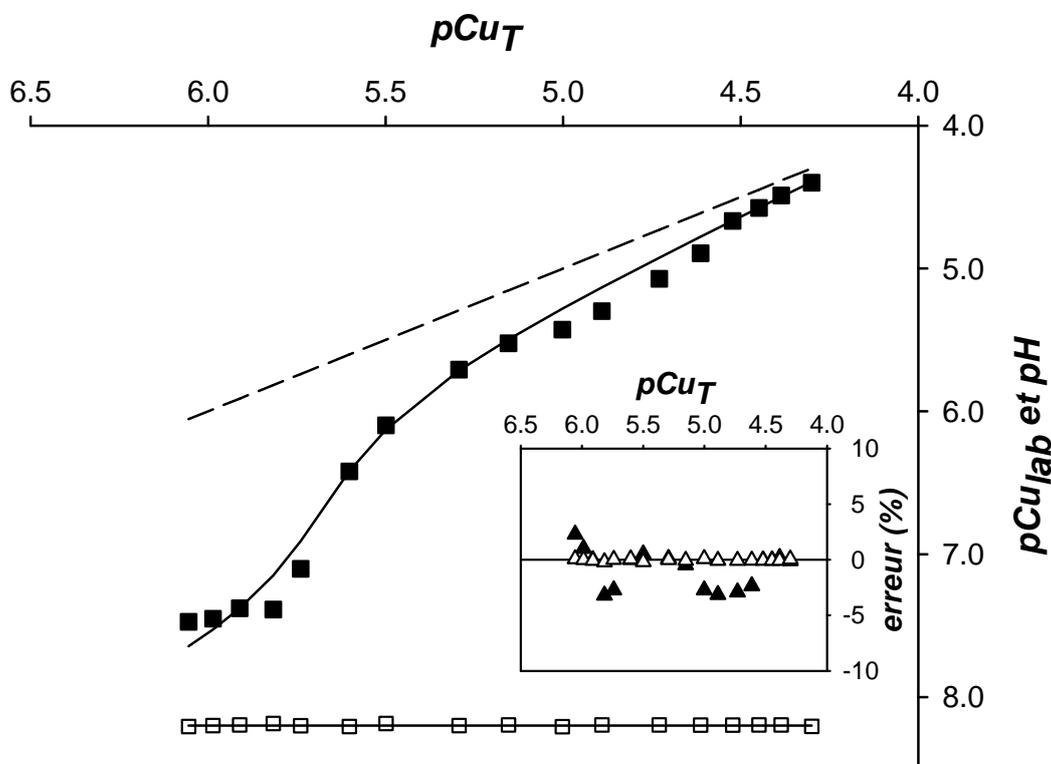


Figure III-11 : Expérience d'ajout logarithmique et fitting obtenu pour l'échantillon marin concentré ; $E_{\text{dep}} = -0,5\text{V}$; $\text{pH} = 8,2$; $\text{COD} = 1,2\text{mmol}_C.\text{L}^{-1}$

La courbe expérimentale de l'ajout logarithmique obtenue pour l'échantillon concentré est présentée **Figure III-11**. La courbe en pointillés représente la droite que l'on devrait obtenir en l'absence de complexation.

Les points expérimentaux (carrés noirs) se situent bien en dessous de cette droite, ce qui montre une forte affinité de la MOND pour le cuivre sur la fenêtre analytique balayée. Le fitting des données expérimentales (trait plein) a été effectué, simultanément, avec les données obtenues, comme nous allons le voir, avec le proton et le calcium, présentées dans la **Figure III-12**. On peut, d'ores et déjà, observer une bonne modélisation de l'expérience de titration métallique obtenue par ce fitting, qui présente des valeurs d'erreurs très faibles (triangles pleins en encart **Figure III-11**).

IIIB3b) Expériences de compétition avec le calcium et le proton

L'expérience réalisée à pH naturel (8,2) avec différentes additions de calcium (1.10^{-6} à 2.10^{-2} M) pour une concentration totale en cuivre de $12,5\mu\text{M}$ montre clairement que le cuivre se trouve progressivement dissocié des sites de la MOND (**Figure III-12.a**), mais que même à des concentrations très élevées de calcium (2 fois la concentration marine naturelle), il reste toujours environ 20% de cuivre lié à la MOND. Ceci montre la spécificité de certains sites pour le cuivre avec donc très peu d'effet de compétition pour le calcium. Cette tendance observée est en accord avec celle observée par Lu Y. et Allen H.E. (2002) pour la compétition du calcium avec le cuivre sur une MOND d'eau douce.

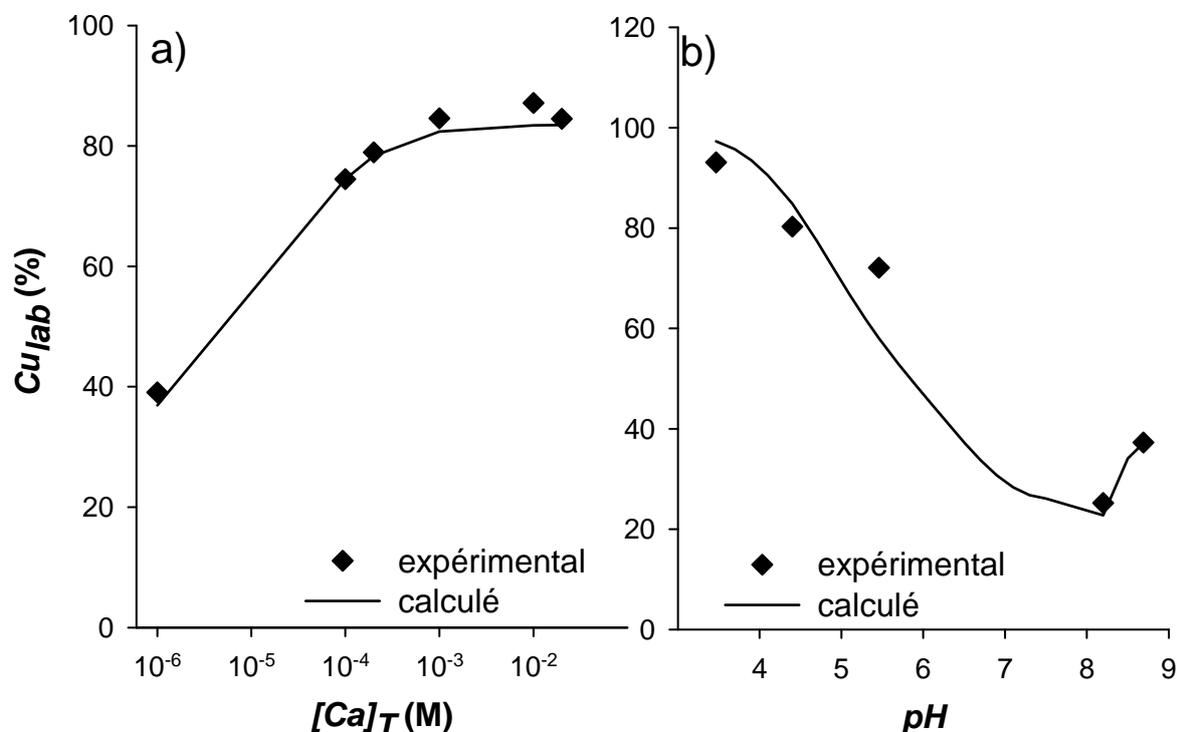


Figure III-12 : Fractions de cuivre labile par rapport au cuivre total ajouté et leurs fitting correspondants pour l'échantillon de MOND concentrée en fonction : a) de la concentration de calcium ajoutée pour une concentration de cuivre totale de $12,5\mu\text{M}$, pH = 8,2 ; b) du pH pour une concentration totale de cuivre de $4\mu\text{M}$. La valeur de 100% en ordonnée représente le cuivre total en solution

De même que pour le calcium, l'acidification de l'échantillon concentré, après passage sur résine Chelex, conduit à une augmentation de la concentration en cuivre labile (**Figure III-12.b**), ce qui indique une diminution de la force d'interaction existante entre le cuivre et la MOND par un effet de compétition avec le proton.

A un pH = 4,5, environ 80% du cuivre total se retrouve sous forme labile alors qu'à pH = 8,2, 80% du cuivre est sous forme complexée. Si les sites de liaison de la MOND pour le cuivre étaient ceux de type carboxylique du proton, la dissociation du cuivre devrait apparaître seulement pour des pH très acides où la compétition proton/cuivre doit être efficace, or la différence la plus grande s'observe pour des pH compris entre 8,2 et 5,5.

Ceci montre que les sites de la MOND impliqués dans la liaison avec le cuivre sont ceux qui ont une forte affinité pour le proton, *i.e.* un pKa élevé, donc plutôt ceux de type phénolique, ce qui est également en accord avec les résultats observés par Lu Y. et Allen H.E. (2002) pour le même type d'expériences réalisées sur une MOND d'eau douce.

La légère augmentation de la fraction labile du cuivre observée entre pH = 8,2 et 8,7 s'explique par une plus forte compétition des ligands inorganiques majeurs (OH^- , CO_3^{2-} , ...) pour des pH basiques.

IIB3c) Fitting simultané des expériences obtenues sur l'échantillon de MOND concentrée

Toutes les données expérimentales obtenues dans la partie précédente (**Figure III-11 et Figure III-12,a et b**), sur la MOND marine concentrée passée sur résine Chelex, ont été fittées simultanément à l'aide du logiciel PROSECE pour une salinité de 37 et en remplaçant les concentrations de calcium et magnésium par du sodium, étant donné que l'échantillon a été passé sur une résine Chelex100 utilisée sous sa forme sodium.

A cause de l'hétérogénéité de la MOND, des ligands monodentates ou polydentates peuvent être attendus (Tipping E. *et al.*, 1998). Cependant, dû aux incertitudes expérimentales et de fitting, il a été montré, dans une étude théorique, que les paramètres de liaison correspondant étaient alors mal déterminés (Garnier C. *et al.*, 2005). C'est pourquoi, dans cette étude, nous utiliserons uniquement des ligands de type monodentate.

Ainsi, un nombre de ligand monodentate minimum permettant une bonne définition du système a tout d'abord dû être défini à partir de ces expériences. Deux quasi-particules ont ainsi été définies permettant de fitter correctement et simultanément ces 3 différentes expériences. Les courbes de fitting correspondantes obtenues sont représentées sur chacune des 3 figures précédentes en traits pleins et les valeurs de densités de site ainsi que les constantes de stabilité optimisées vis-à-vis du cuivre, du calcium et du proton sont présentées dans le **Tableau III-2**.

Tableau III-2 : Densité de sites complexants et leur constante de stabilité (envers le cuivre, le calcium et le proton) définis pour 2 quasi-particules L_{M1} et L_{M2} après un fitting simultané par PROSECE des 3 expériences (titration métallique, variation de la concentration de calcium et du pH)

	L_{M1}	L_{M2}
L_{MiT} (meq.mol $_C^{-1}$)	1,72 ± 0,13	10,25 ± 2,7
$\log K_{CuL}$	9,9 ± 0,1	6,9 ± 0,1
$\log K_{CaL}$	2,5 ± 0,4	5,5 ± 0,6
pKa	8,6 ± 0,1	8,2 ± 0,3

Comparée à la concentration totale en site acide L_{HT} de 446,4 meq.mol $_C^{-1}$ (**Tableau III-1**), la concentration en sites de liaison du cuivre L_{MT} de 11,97 meq.mol $_C^{-1}$ représente moins de 3%,

ce qui est conforme à ce qui a déjà pu être observé pour la matière organique naturelle (Buffle J., 1988). La réactivité de la MOND étudiée peut donc être caractérisée par un site complexant fort L_{M1} spécifique au cuivre (**Tableau III-2**, $\log K_{CuL} = 9,9 \pm 0,1$) et qui a une faible affinité pour le calcium ($\log K_{CaL} = 2,5 \pm 0,4$) ; ceci indique que même pour des très fortes concentrations de calcium, la compétition entre le cuivre et le calcium est très faible pour ce site.

De tels ligands avec des constantes de stabilité vis-à-vis du cuivre égales ou supérieures à 10^{10} ont déjà pu être mis en évidence pour des eaux marines, mais ces études ne prenaient pas encore en compte la compétition avec le calcium ou le proton (Bruland K.W. *et al.*, 2000 ; Donat J. et Van Den Berg C.M.G., 1992 ; Kogut M.B. et Voelker B.M., 2001 ; Kozelka P.B. et Bruland K.W., 1998 ; Muller F.L.L, 1999 ; Wells M.L. *et al.*, 1998).

Malheureusement, comme les valeurs de COD sont rarement mentionnées dans ces études, les comparaisons des résultats en terme de densité de site ne sont pas aisées. Cependant, en utilisant une valeur de COD moyenne de $0,08 \text{ mmol}_C.L^{-1}$, rencontrée pour des eaux marines côtières non polluées en carbone (Ding Y-X. *et al.*, 2007; Vetter T.A. *et al.*, 2007), la concentration optimisée du site L_{M1} de $1,72 \text{ meq.mol}_C^{-1}$ est alors comparable aux résultats des études préalablement citées, comme celle de Kogut M.B. et Voelker B.M. (2001) pour laquelle on retrouverait des concentrations de l'ordre de 1 à 2 meq.mol_C^{-1} .

Le second site mis en évidence, L_{M2} , est moins spécifique au cuivre ($\log K_{CuL} = 6,9 \pm 0,1$) mais a un effet de compétition avec le calcium beaucoup plus important ($\log K_{CaL} = 5,5 \pm 0,6$). Si on considère une valeur de pKa moyenne de 8,4 pour ces deux sites, on peut dire qu'ils ont une affinité pour le proton de type phénolique.

Pour la MOND marine, Hirose K. (2007) mentionne des valeurs de $\log K_{CaL}$ allant de 3,1 à 3,9, cependant ces valeurs ne sont pas déterminées expérimentalement, mais en utilisant la « Linear Free-Energy Relationship » (LFER). Ce concept suppose que les ligands organiques naturels marins ne sont pas spécifiques, ni sélectifs, envers la complexation des ions métalliques, donc que la réactivité de la MOND peut être décrite par des ligands organiques artificiels comme l'EDTA (Hirose K., 1994).

Les résultats obtenus ici ne confirment pas cette hypothèse, mais sont proches de ceux obtenus par Lu Y. et Allen H. (2002) qui suggèrent que le calcium et le magnésium se lient préférentiellement aux sites de type carboxylique contrairement au cuivre qui peut être fortement associé à des sites de type phénolique. Ceci explique le faible effet de compétition existant entre le cuivre et les cations majeurs divalents pour les ligands forts de type phénolique de la MOND.

La même expérience d'ajout logarithmique a été menée avec un potentiel de dépôt très négatif (-1,5 V). On s'attend de cette manière à ce que les sites complexants mis en évidence à un potentiel de dépôt de -0,5V soit partiellement dissociés à un potentiel très négatif ; c'est pourquoi le fitting se fait en utilisant les mêmes ligands mais en optimisant uniquement leur concentration (L_{MIT}). La MOND apparaît alors comme étant beaucoup moins complexante envers le cuivre, surtout pour des faibles concentrations en métal (**Figure III-13**).

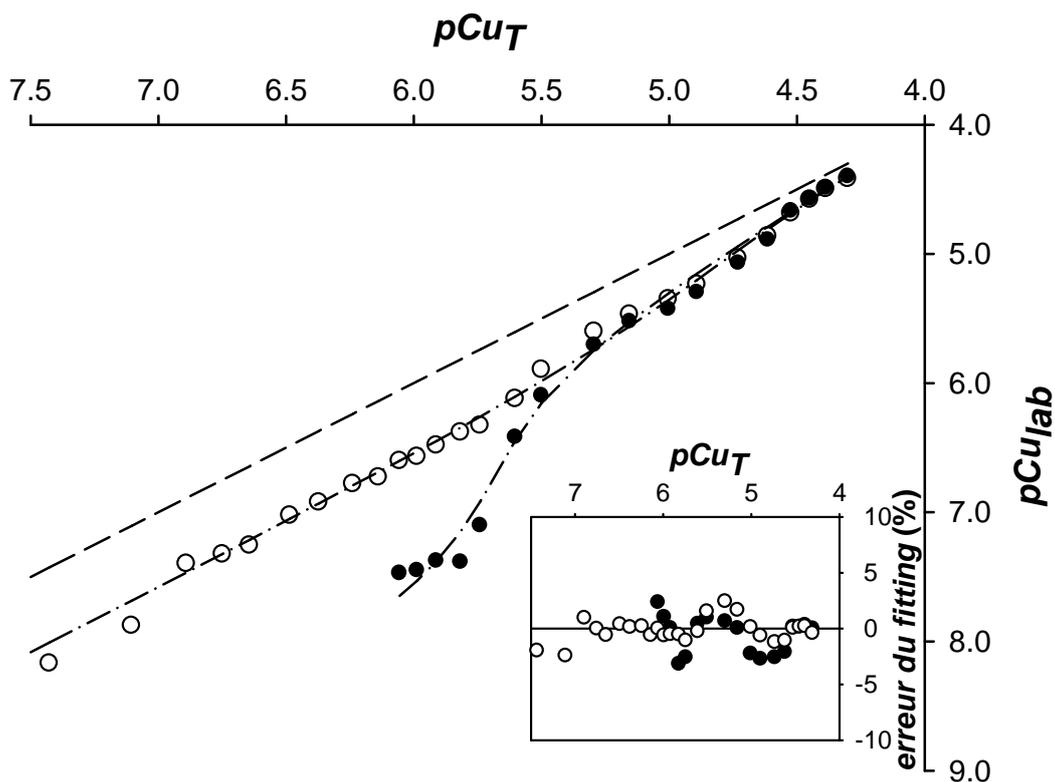


Figure III-13 : Comparaison de 2 ajouts logarithmiques menés à deux potentiels de dépôts différents (-0,5V en points noirs et -1,5V en points blancs et leur fitting associé en traits pointillés ; en encart : erreur sur le fitting pour les 2 expériences)

La modélisation montre que seul le site complexant le plus fort (L_{M1}) semble être affecté par ce potentiel très négatif, sa densité passant de 1,72 à 0,03 meq.mol $_C^{-1}$, tandis que la concentration de L_{M2} reste inchangée. Ceci peut paraître surprenant car le site le plus abondant (L_{M2}), avec le $\log K_{CuL}$ le plus faible aurait dû être affecté en premier du fait de sa plus faible force de liaison avec la MOND.

Ceci montre, encore une fois, la nécessité d'utiliser la pseudopolarographie dans l'étude des capacités complexantes afin de se placer à un potentiel de dépôt du métal labile judicieux.

III.C. Application du modèle de MOND marine défini à un échantillon naturel marin non-concentré

L'objectif de cette partie est d'utiliser les paramètres définis précédemment à partir d'une MOND marine modèle pour prédire le comportement d'une MOND marine dans son environnement naturel. La prédiction peut se faire en introduisant simplement les paramètres déterminés pour une MOND marine modèle dans un programme de spéciation comme MINEQL (Westall J.C. *et al.*, 1976) ou encore MOCO (Gonzales J.L. *et al.*, 2001) afin de définir le rôle de la MOND marine sur la spéciation des métaux traces.

Une nouvelle expérience d'ajout logarithmique de cuivre a donc été réalisée avec un échantillon marin de même origine, uniquement filtré à 0,45 μ m et passé sur résine Chelex100 (**Figure III-14**) de manière à valider, ou non, le protocole de concentration ainsi que le protocole analytique utilisé afin de déterminer une MOND marine modèle.

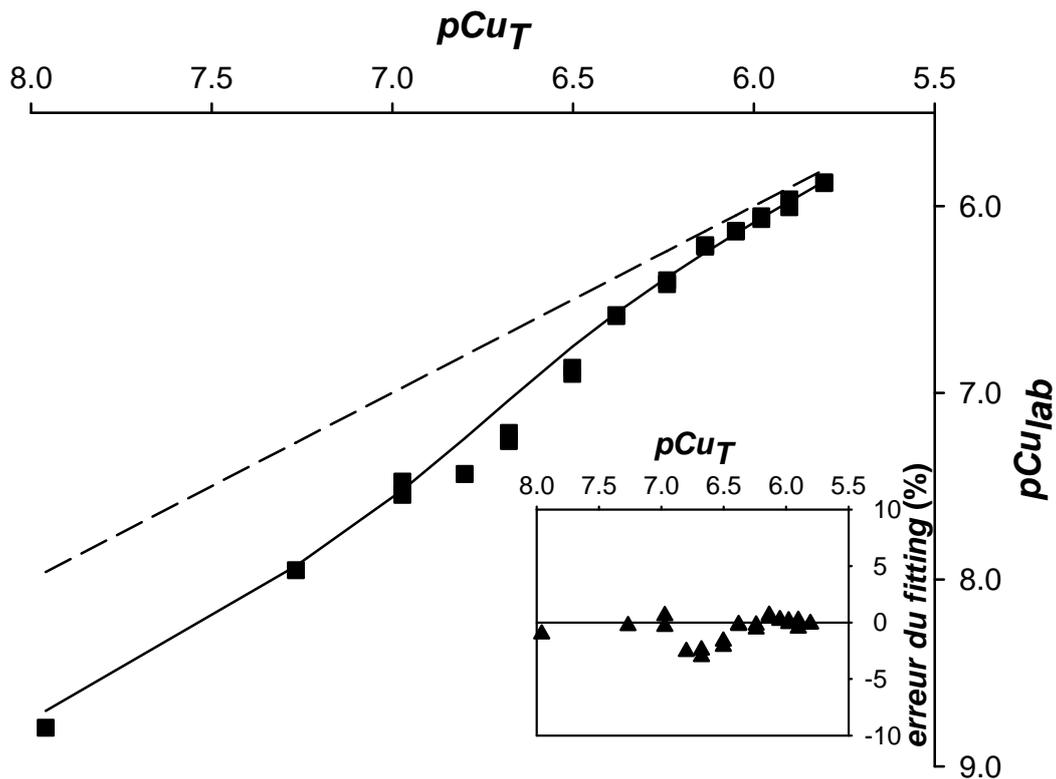


Figure III-14 : Expérience d'ajout logarithmique menée sur un échantillon naturel non-concentré ($\text{COD} = 0,09 \text{ mmol}_C \cdot \text{L}^{-1}$) filtré à $0,45 \mu\text{m}$ et passé uniquement sur résine Chelex100 et sa courbe modélisée par MINEQL suivant les paramètres obtenus sur l'échantillon concentré. $\text{pH} = 8,2$; Salinité 37

Comme pour l'échantillon concentré, la MOND montre aussi une forte affinité pour le cuivre dans ces conditions naturelles. Le programme MINEQL a été utilisé pour simuler ces données expérimentales en définissant un système qui tient compte de la spéciation inorganique (déterminée pour une salinité de 37 en remplaçant le calcium et magnésium par du sodium à cause de l'utilisation de la résine Chelex100), de la concentration en cuivre et du pH.

La réactivité de la MOND a été définie par les 2 ligands modèles déterminés dans la partie précédente en tenant compte de la nouvelle concentration en carbone de l'échantillon de $0,09 \text{ mmol}_C \cdot \text{L}^{-1}$.

La **Figure III-14** (trait plein) montre que le modèle de MOND déterminé permet de bien fitter les données expérimentales sans aucun ajustement des paramètres de complexation. Cette expérience valide donc, à la fois, le protocole de caractérisation utilisé, ne montrant pas de modification notable de l'échantillon avant et après l'étape de concentration ; mais aussi les données obtenues, qui permettent de correctement modéliser la MOND avant l'étape de concentration.

Une étude précédente, menée sur un échantillon d'eau douce et sans détermination des propriétés de complexation de la MOND avait déjà montré que la concentration de MOND par l'utilisation de l'osmose inverse ne modifiait pas, ou peu, sa capacité à se complexer aux métaux traces (De Schamphelaere K.A.C. *et al.*, 2005).

IIIC1. Détermination de la spéciation du cuivre dans l'échantillon marin étudié

Une fois les paramètres de complexation déterminés et testés sur un échantillon naturel, il est alors possible de prédire, en intégrant les données obtenues dans MINEQL, la spéciation du cuivre dans l'environnement marin.

Les formes organiques et inorganiques du cuivre ont été calculées suivant le pH pour des conditions réelles, *i.e.*, avec cette fois les concentrations en cations majeurs (Ca^{2+} et Mg^{2+}), les anions, à partir de la salinité, une concentration en COD de $0,09 \text{ mmol}_C \cdot \text{L}^{-1}$, et une concentration en cuivre totale de $14,8 \text{ nM}$ mesurée dans l'échantillon filtré non concentré avant passage sur résine Chelex100 (Figure III-15).

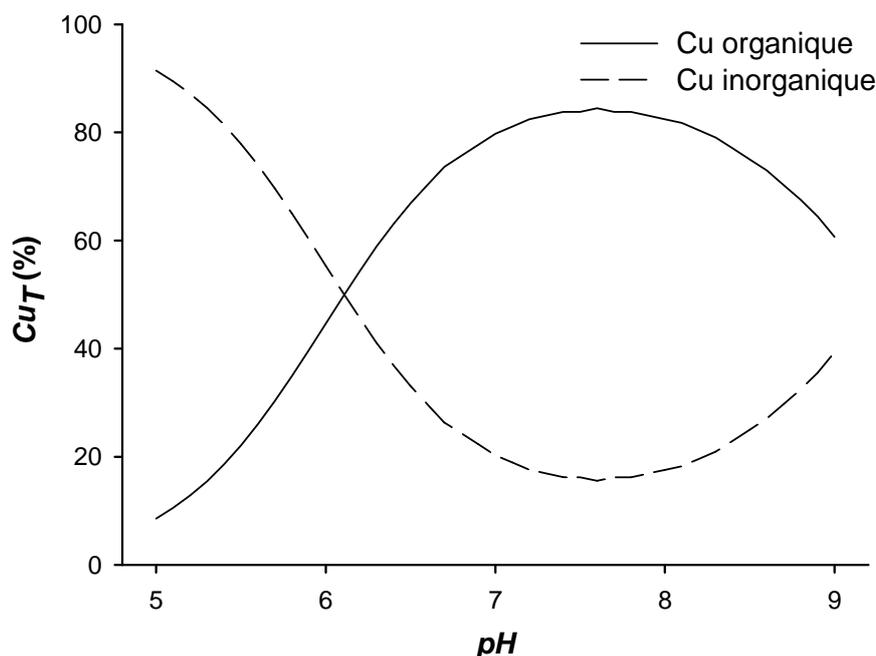


Figure III-15 : Spéciation du cuivre en fonction du pH simulée par MINEQL dans des conditions naturelles pour une eau marine en utilisant les paramètres optimisés à partir de l'expérience sur l'échantillon concentré

La distribution a été calculée pour une gamme de pH allant de 5 à 9, mais pour des conditions d'eau naturelle d'origine marine, le pH se situe plutôt aux alentours de 8.

On peut voir que de pH 7,5 à 8,3, plus de 80% du cuivre total se trouve complexé sous une forme organique. Cette fraction complexée est un peu plus faible que les données de la littérature (Bruland K.W. et Lohan M.C., 2004 et référence citées) avec habituellement de 95 à 99% de cuivre complexé.

Cet écart pourrait en partie être expliqué par l'utilisation d'un procédé analytique, dans notre étude, éliminant les interférences causées par les SAS, qui nous l'avons montré, peuvent artificiellement augmenter la capacité complexante des échantillons analysés. Une autre explication pourrait être la spécificité du système côtier étudié, qui est caractérisé par des concentrations métalliques relativement importantes par rapport à la concentration en carbone, comparé à un milieu marin non côtier.

Si l'on se base sur la limite de toxicité envers les micro-organismes marins définie par Sunda W.G. *et al.* (1987) de $10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, la concentration en cuivre libre calculée (Cu^{2+}) allant de $1,6$ à $5 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ montre que la zone marine côtière étudiée est légèrement toxique, ce qui n'est pas surprenant pour une baie semi fermée soumise à de fortes activités anthropiques.

IIIC2. Conclusions

La technique de concentration de la MOND, par nanofiltration suivie d'une osmose inverse, s'est avérée efficace afin d'obtenir un échantillon concentré en MOND. Les différentes expériences menées ont ensuite permis de valider le protocole de concentration en démontrant que la qualité de la MOND concentrée n'est pas significativement altérée par rapport à la MOND naturelle non concentrée ayant subi le même traitement chelex. Le protocole d'analyse mis au point permet de décrire la réactivité de la MOND vis-à-vis du cuivre, du calcium ainsi que du proton ; cependant, la même technique pourrait être extrapolée avec un, ou plusieurs, autres métaux traces comme le cadmium, le plomb ou le zinc, tous 3 analysables en DPASV, ou encore avec d'autres cations.

Les 2 types de quasi-particules mis en évidence permettent d'obtenir une MOND modèle pouvant être intégrée dans des codes de calcul de spéciation. Ainsi, son intégration dans MINEQL permet de retrouver la spéciation du cuivre pour un milieu marin qui aurait des propriétés de complexation similaires.

Cette MOND marine modèle est probablement plus réaliste pour représenter les interactions métaux-MOND en milieu salé que l'utilisation d'une MO terrigène extraite comme celle utilisée par Hamilton-Taylor J. *et al.*, 2002.

Pour autant, on peut se poser la question de savoir si l'utilisation d'une MOND marine modèle est vraiment réaliste.

C'est pourquoi, l'étude suivante visera à étudier un écosystème particulier, tel que l'estuaire de la Krka, grâce au protocole de caractérisation simplifié mis au point afin d'étudier des échantillons marins peu concentrés en MOND.

CHAPITRE IV :

**ETUDE D'UN ESTUAIRE TRES PEU
POLLUÉ : ŠIBENIK (CROATIE)**

Chapitre IV. Etude d'un estuaire très peu pollué : Šibenik (Croatie)

La question à laquelle nous tenterons de répondre à la fin de cette étude, est : est-ce qu'une MOND marine modèle permet de comprendre/prédire la variation de spéciation du métal dans un environnement un peu particulier, comme celui d'un estuaire ?

Pour cela, le protocole simplifié sera utilisé afin d'étudier les propriétés de la MOND sur différents échantillons de la colonne d'eau de l'estuaire stratifié de Šibenik (Croatie). Cet estuaire, faiblement soumis à l'action anthropique, mesure 23,5 km de longueur, et est situé à la sortie du parc national de la Krka. Il est donc sous l'influence de la rivière Krka (49 km de longueur) qui est connue dans la littérature comme étant une rivière très peu contaminée en métal (Cukrov N. *et al.*, 2008)

Le débit moyen de cette rivière mesuré sur les 50 dernières années varie de 40 à 60 m³.s⁻¹ (Bonacci O. *et al.*, 2006).

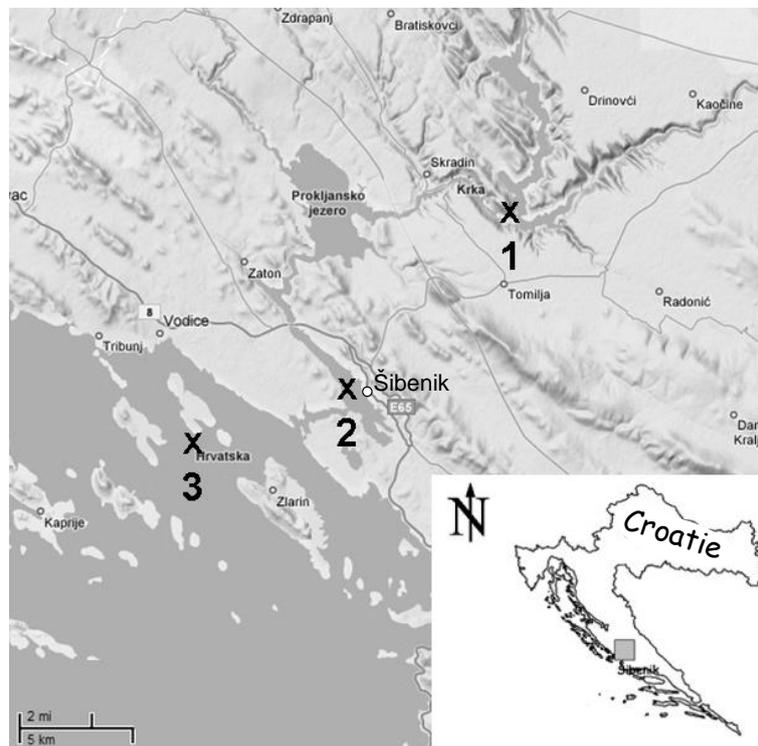


Figure IV-1: Points de prélèvements réalisés sur l'estuaire de la Krka (Croatie)

Un des buts de cette étude est aussi de comparer les différentes propriétés de complexation de la MOND dans une colonne d'eau estuarienne et de prévoir le comportement d'un polluant dans ce type de milieu. En effet, malgré les très faibles concentrations en éléments métalliques mesurées durant l'année, pendant l'été, et notamment sous l'influence de l'activité de la marina de Šibenik, des concentrations en cuivre de l'ordre de 12nM ont pu être rapportées (Omanović D. *et al.*, 2006), ce qui est potentiellement toxique pour les micro-organismes. Une approche cinétique a aussi été réalisée dans cette étude afin de mieux appréhender dans le temps, le devenir d'un contaminant métallique dans cet estuaire.

Pour chaque échantillon, 1L d'eau a été prélevé à différentes salinités à l'aide d'une bouteille Téflon FEP (coordonnées GPS : 43°44'07,92 N, 15°52'39,61 E) par un plongeur (Cukrov N., RBI) à proximité de la station marine scientifique de Martinska (**Figure IV-1**, point 2 ; Institut Ruđer Bošković, Croatie) le 20 avril 2007 pour une première campagne et le 05 mars 2008 pour une seconde campagne.

Lors de la seconde campagne, deux prélèvements de surface supplémentaires ont aussi été réalisés. Le premier a été prélevé à environ 4 km de l'embouchure de la rivière au large de Šibenik (**Figure IV-1**, point 3 ; coordonnées GPS : 43°42'44,88 N, 15°47'43,98 E), afin de ne pas être sous l'influence directe de l'estuaire, et le second sur la rivière Krka (**Figure IV-1**, point 1 ; coordonnées GPS : 43°48'12,42 N, 15°58'18,48 E), afin de connaître l'apport de la rivière dans les mesures réalisées dans la colonne d'eau.

Les échantillons ont ensuite été filtrés, directement après le prélèvement, sous pression de N₂ suprapur 5,0 sur filtres en nitrate de cellulose 0,45µm préalablement nettoyés par 250 ml d'eau mQ. Ensuite, 250 mL d'échantillon sont filtrés afin de nettoyer le système de filtration, puis 500 ml sont conservés pour les analyses de propriétés de complexation, ainsi que 250 ml sont acidifiés, puis stockés pour les analyses de métal total après irradiation UV ; tous deux dans des bouteilles en Téflon PFA.

La majorité des analyses ont été réalisées à la station marine de Martinska en collaboration avec l'équipe du RBI, ce qui a permis de traiter très rapidement les échantillons après le prélèvement. Les échantillons non traités sur place ont été analysés un peu plus tard sur Toulon après avoir été empoisonnés avec de l'azoture de sodium pour éviter une évolution de l'échantillon pendant le transport. Un échantillon, pris au hasard, a été analysé de manière identique dans les 2 laboratoires, à 1 mois d'intervalle, afin de vérifier d'une part, l'absence d'évolution importante de la MON, et d'autre part, tout problème analytique dû à l'utilisation d'un appareillage différent.

IVA. Mesures préalables et observations de terrain

IVA1. Profils de salinité

Lors de ces 2 campagnes, des profils de salinité ont été réalisés (**Figure IV-2**) afin de pouvoir repérer les zones intéressantes, *i.e.*, la couche d'eau douce, celle d'eau de mer, ainsi que la couche d'interface. L'absence de forte marée en Mer Adriatique permet de travailler dans un estuaire très stratifié verticalement avec des couches d'eaux bien identifiables.

Lors de la campagne 2007, les échantillons d'intérêts retenus sont au nombre de 4 pour les salinités de 5, 11, 25 et 38 (**Figure IV-2**, croix).

De même, lors de la campagne de prélèvements effectuée en 2008, le même type de profil a été réalisé (**Figure IV-2**, triangle), mais il a été difficile d'obtenir des échantillons de même salinité que ceux de la campagne précédente. En effet, la couche d'interface proprement dite est souvent très faible, on passe rapidement d'une salinité de 5-10 à plus de 30 (en 2007), en moins de 20 cm, ce qui explique la difficulté d'obtenir des échantillons comparables d'une année sur l'autre. De plus, en 2008, la salinité en surface était déjà de 13.

Nous avons donc essayé d'obtenir des échantillons avec des salinités proches de celles de la première campagne afin de pouvoir comparer les campagnes entre elles. Ainsi, des échantillons de salinités 13, 19, 31 et 38 ont été prélevés. L'échantillon d'eau de mer à 38,5 de salinité sera représenté arbitrairement à une profondeur de 8,5 m, tandis que l'échantillon de la Krka de salinité 0 représentera l'échantillon en amont du système.

Ainsi, sur ce profil, on peut aisément distinguer 3 différentes couches :

- Tout d'abord, en surface, sur une profondeur d'environ 1 mètre, une première couche qui correspond à de l'eau peu salée, donc majoritairement influencée par la Krka,
- Ensuite, pour des profondeurs situées entre 1 et 2 mètres, une seconde couche à l'interface eau douce/eau marine, avec une salinité variant de 10 à 31 est observée. Dans cette couche avec de forts changements de salinité pour une faible différence de profondeur, de nombreux phénomènes physico-chimiques complexes peuvent se produire.
- Enfin, la dernière couche, en dessous de 2 mètres, n'est autre que l'eau principalement d'origine marine, plus dense et donc plus profonde.

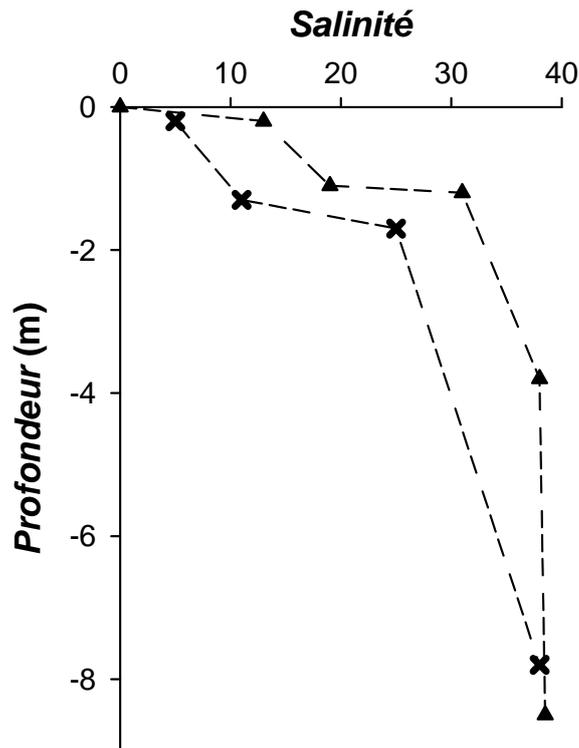


Figure IV-2 : Profil de salinité mesuré sur le terrain lors de la campagne d'Avril 2007 (croix) et Mars 2008 (triangles) sur l'Estuaire de la Krka (Croatie). Les points extrêmes situés sur la courbe de 2008 correspondent aux 2 prélèvements supplémentaires prélevés en amont et en aval du point de prélèvement de la colonne d'eau

En 2007, lors du prélèvement, un fort développement biologique en surface sur les bords de l'estuaire est constaté. A noter qu'en 2008, aucun développement biologique visible du type de celui décrit lors de la première campagne de 2007 n'a été observé sur place.

Si l'on compare les 2 profils de salinité obtenus en 2007 et 2008, on peut voir que pour celui de 2008 la couche située à l'interface se trouve moins profonde et que l'eau de surface (0,2 m) est plus salée (salinité ≈ 13 en 2008 à 0,2m contre une salinité de 5 en 2007). Ceci est dû au fait que le prélèvement de Mars 2008, réalisé un peu plus tôt dans la saison, était soumis à un débit de l'estuaire plus faible ($21,9 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ en mars 2008 comparé à $37,4 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ en avril 2007), et d'un vent venant de la mer ; de ce fait le profil de salinité, pour une même profondeur, se retrouve à des salinités plus importantes.

Pour des profondeurs plus importantes, 3,8m en 2008 et 8m en 2007, celles-ci peuvent être comparées au point prélevé en mer en 2008, représenté à 8,5m et représentant l'influence marine.

IVA2. Carbone

Lors des 2 campagnes de prélèvements, des analyses de carbone organique dissous ont été réalisées sur les mêmes échantillons que ceux du profil de profondeur, mais dans des tubes en verre préalablement passés au four à 450°C pendant au moins 4 heures.

Les concentrations en carbone organique dissous (COD ou NPOC) des échantillons prélevés sur les 2 campagnes de prélèvements sont présentées dans le **Tableau IV-1**. Les 2 profils correspondant à ces concentrations suivant la profondeur sont représentés sur la **Figure IV-3** par des croix pour les échantillons de 2007 et par des triangles pour ceux de 2008.

L'échantillon de la rivière Krka présente une concentration en carbone très faible de $0,52 \text{ mg kg}^{-1}$ ($43 \mu\text{mol}_C \cdot \text{L}^{-1}$). Cette très faible concentration est assez surprenante pour une eau de

rivière pour laquelle on a plus souvent des concentrations supérieures à celles de l'eau de mer ; mais c'est ici une caractéristique de la rivière étudiée qui est soumise à très peu d'apports anthropiques. En effet, Cauwet G. (1991) avait déjà montré, dans une étude plus ancienne, d'aussi faibles concentrations en carbone organique dissous.

Tableau IV-1 : Concentrations en carbone organique dissous mesurées sur les campagnes de prélèvements de l'estuaire de Šibenik en 2007 et 2008

Profondeurs	2007		2008	
	DOC (mg kg ⁻¹)	+/-	DOC (mg kg ⁻¹)	+/-
0			0,52	0,01
-0,2	0,67	0,04	0,76	0,02
-1,1			0,83	0,01
-1,2			0,97	0,01
-1,3	0,72	0,02		
-1,7	0,91	0,10		
-3,8			0,89	0,02
-7,8	0,90	0,02		
-8,5			0,96	0,02

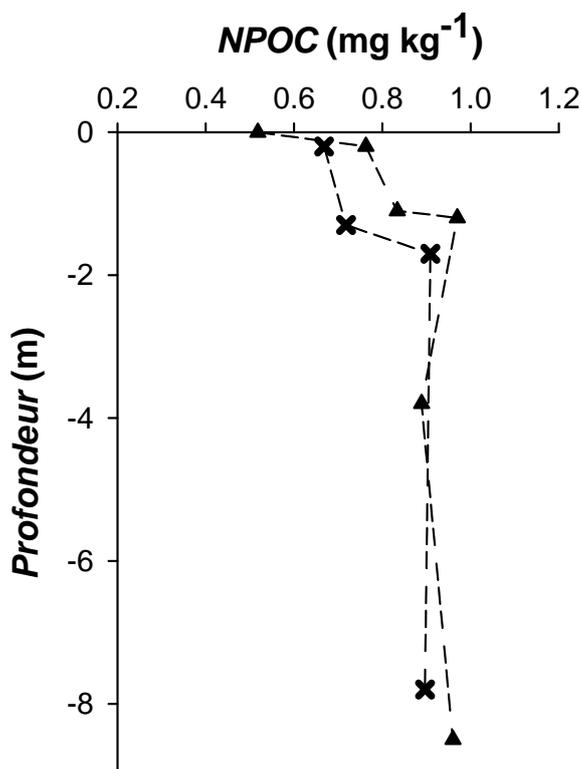


Figure IV-3 : Profil de carbone organique dissous des campagnes de prélèvements d'Avril 2007 (croix) et Mars 2008 (triangles) sur l'Estuaire de la Krka (Croatie). Les points extrêmes situés sur la courbe de 2008 correspondent aux 2 prélèvements supplémentaires prélevés en amont et en aval du point de prélèvement de la colonne d'eau

Encore une fois, comme sur les profils de salinité, on peut mettre en évidence les différentes couches stratifiées de l'estuaire. L'eau de rivière a une concentration en carbone plus faible que l'eau de mer (0,96 mg kg⁻¹ soit 80 $\mu\text{mol}_C\text{.L}^{-1}$) ; les points situés entre ces 2 extrêmes peuvent être reliés suivant la salinité par une courbe du 2nd degré ; c'est ce qui est présenté sur

la **Figure IV-4** (en pointillés larges), où la concentration en carbone est tracée en fonction de la salinité.

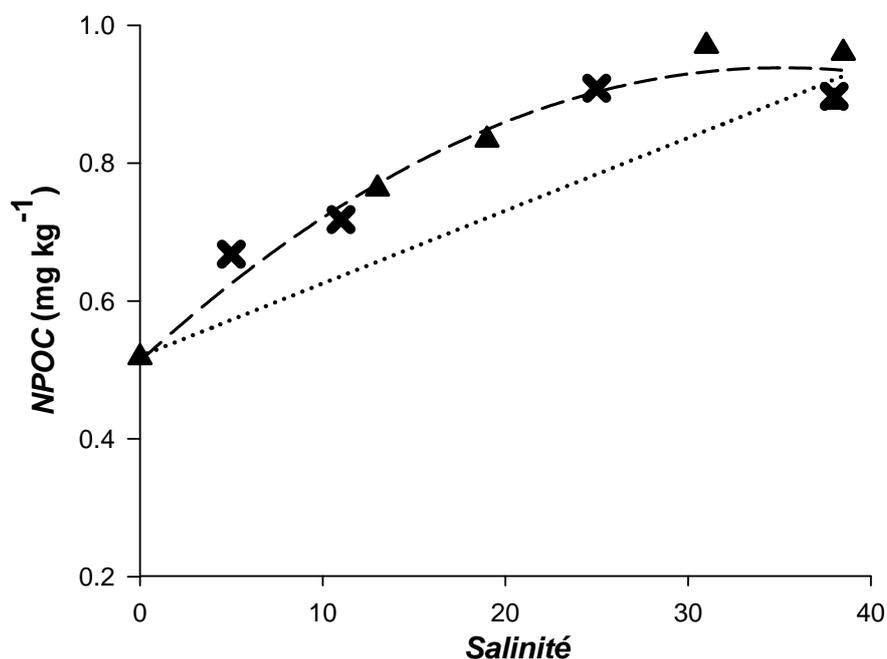


Figure IV-4 : Courbe de dilution du NPOC suivant la salinité pour tous les points des campagnes de prélèvements d'avril 2007 (croix) et Mars 2008 (triangles), $r^2= 0,9681$

Cette courbe montre qu'ici, la variation de concentration en carbone dissous ne suit pas la droite de dilution attendue pour un système de type conservatif. En effet, les points se situent au dessus de la droite de dilution théorique de l'eau de mer par l'eau de rivière (droite en pointillés, **Figure IV-4**) ; ceci montre qu'il existe une source de carbone supplémentaire dans l'estuaire, dans une zone de salinité allant de 15 à 25, c'est-à-dire là où l'écart à la droite théorique est le plus important.

Le même genre de profil a déjà été observé par Cauwet G. (1991) sur cet estuaire. Sachant que la majeure partie de la MOND dans l'environnement aquatique est produite par la dégradation et l'exsudation des organismes vivants (Buffle J., 1988), les points expérimentaux montrant des concentrations en carbone légèrement supérieures à ceux de la droite moyenne théorique pourraient alors facilement être expliqués par un phénomène de développement biologique accentué dans l'estuaire, et principalement, à l'interface eau douce / eau marine. En effet, dans cette couche d'interface et sur cette même partie de l'estuaire, Ahel M. *et al.*, (1996) ont montré qu'il existait une plus forte abondance d'algues vertes et de Prymnesiophytes pouvant être à l'origine d'une plus forte concentration en COD dans l'estuaire.

IVA3. Métal total

Les concentrations en cuivre total ont été mesurées pour tous les échantillons des deux campagnes de prélèvements par DPASV après acidification et passage à l'UV (100 W pendant 12 heures). Les profils de ces concentrations suivant la profondeur, montrent une même tendance en 2007 et en 2008 (**Figure IV-5**) avec une augmentation du métal total mesuré dans la couche intermédiaire.

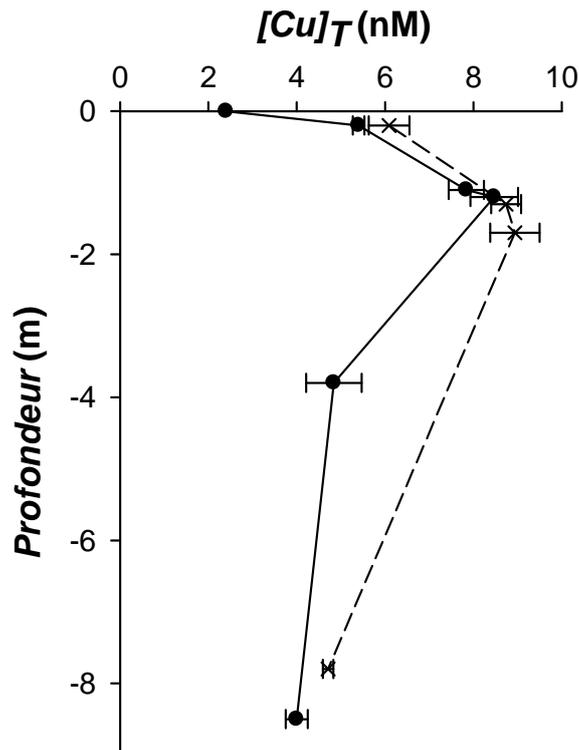


Figure IV-5 : Profil de concentrations en cuivre total pour les campagnes de prélèvements d'Avril 2007 (croix) et Mars 2008 (triangles) sur l'Estuaire de la Krka (Croatie)

On peut, tout d'abord, remarquer que la concentration en cuivre total dissous de l'eau de la rivière Krka (Point de salinité 0 prélevé dans le parc national de la Krka) est très faible, de l'ordre de 2,4 nM. Cette valeur est à comparer avec celle de 1,78 nM mesurée 20 ans plus tôt (Elbaz-Poulitchet F. *et al.*, 1991). On peut alors supposer que cette rivière est encore, à l'heure actuelle, très peu contaminée, notamment, grâce à l'absence de sources de contamination et d'un mécanisme d'auto purification, comme l'a encore rapporté l'étude de Cukrov N., *et al.* en 2008, que ce soit pour le cuivre ou encore d'autres métaux comme le cadmium, le plomb ou encore de zinc.

Sur ces profils de 2007 et 2008, les concentrations les plus fortes en cuivre total dissous sont observées sur la couche intermédiaire, ce qui révèle l'existence de phénomènes d'échanges complexes se produisant à l'interface eau douce/eau marine.

Cette plus forte concentration de métal dissous dans la couche de mélange, déjà observée sur le profil vertical de cet estuaire (Figure IV-6, Elbaz-Poulitchet F. *et al.*, 1991), peut être expliquée de la manière suivante: dans l'eau de rivière, la MON particulaire est chargée plutôt négativement, avec à sa surface des cations métalliques. Lorsque cette MON particulaire arrive au contact d'une eau salée, ce qui est le cas dans la couche intermédiaire, sa surface se charge positivement grâce aux cations majeurs présents en très forte concentration (comparativement aux métaux traces présents à la surface des particules), jusqu'à atteindre une charge neutre. A ce moment là, les particules de MON coagulent entre elles en libérant dans la phase dissoute les métaux fixés à leur surface, par compétition avec les cations majeurs présents dans l'eau de mer (majoritairement le calcium). La concentration en métal dissous se retrouve alors, bien supérieure à celle de la fraction dissoute de l'eau douce initiale. Ensuite, la MON particulaire va sédimenter en profondeur et la concentration en métal dissous va se rééquilibrer dans la colonne d'eau par des phénomènes de dilution. Ce phénomène est plus couramment observé dans les estuaires, avec un gradient de salinité horizontal (Waeles M. *et al.*, 2004 et 2005).

Afin d'être confirmée, cette hypothèse nécessiterait cependant l'analyse du métal particulaire présent dans la colonne d'eau mais qui n'a pas été réalisé lors de ces prélèvements. D'ailleurs, une étude, réalisée plus en aval dans cet estuaire (Svetličić V. *et al.*, 1991), avait déjà montré l'existence d'un pic de carbone organique particulaire dans la zone intermédiaire suivi d'une baisse de sa concentration pour des salinités plus importantes.

Comme dans le cas du carbone organique dissous, les concentrations en cuivre ne suivent donc pas une droite de dilution fonction de la salinité (**Figure IV-6**, pointillés). Les résultats suivent encore une fois des courbes plutôt paraboliques (**Figure IV-6**, courbe en trait plein) très caractéristiques des phénomènes expliqués ci-dessus (Boutier B. *et al.*, 1993 ; Kraepiel A.M. *et al.*, 1997 ; Waeles M. *et al.*, 2005).

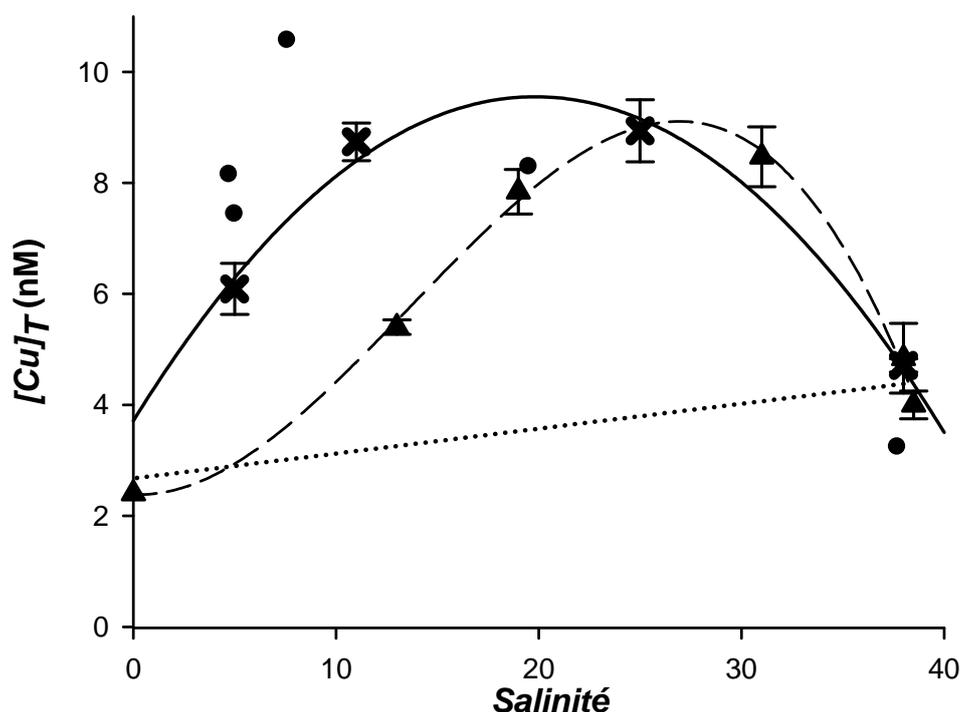


Figure IV-6 : Courbes paraboliques caractéristiques de la concentration en cuivre dissous totale (CuTot) suivant la salinité pour les points des campagnes de prélèvements d'Avril 2007 (croix et courbe en trait plein) et Mars 2008 (triangles et courbe en tirets). En pointillé : droite de dilution attendue pour un mélange conservatif. Cercles pleins : Données mesurées sur le site « E4a » en Mai 1988 (Elbaz-Poulichet F. *et al.*, 1991)

La première partie de la courbe, observable avec l'augmentation de la salinité, résulte de la désorption du cuivre particulaire et se traduit par une augmentation notable de la concentration du cuivre dissous. Le maximum observé ici, correspond à la zone généralement observée de 10 – 20 de salinité (Boutier B. *et al.*, 1993 ; Kraepiel A.M. *et al.*, 1997), correspondante à la zone d'interface eau douce / eau marine ; et enfin, la dernière partie correspond à la dilution des concentrations en cuivre dissous par les eaux marines.

IVA4. Pseudopolarogrammes

Afin de pouvoir étudier les propriétés de complexation de la MOND de l'estuaire, des pseudopolarogrammes ont été réalisés sur les échantillons de différentes salinités. Ces mesures permettent principalement de déterminer le potentiel de dépôt à utiliser pour mesurer le métal labile avec la meilleure sensibilité.

La **Figure IV-7** présente les pseudopolarogrammes de la campagne de prélèvements de 2007, normés au potentiel de dépôt de $-1,6\text{V}$, pour une quantité de cuivre total ajouté d'environ 100 nM (correspondant à une concentration dépassant la capacité complexante de l'échantillon), et après 20h de stabilisation afin d'éviter toute variation d'ordre cinétique. Cette normalisation au potentiel le plus négatif, permet de pouvoir facilement comparer les échantillons entre eux pour une même concentration de métal ajoutée.

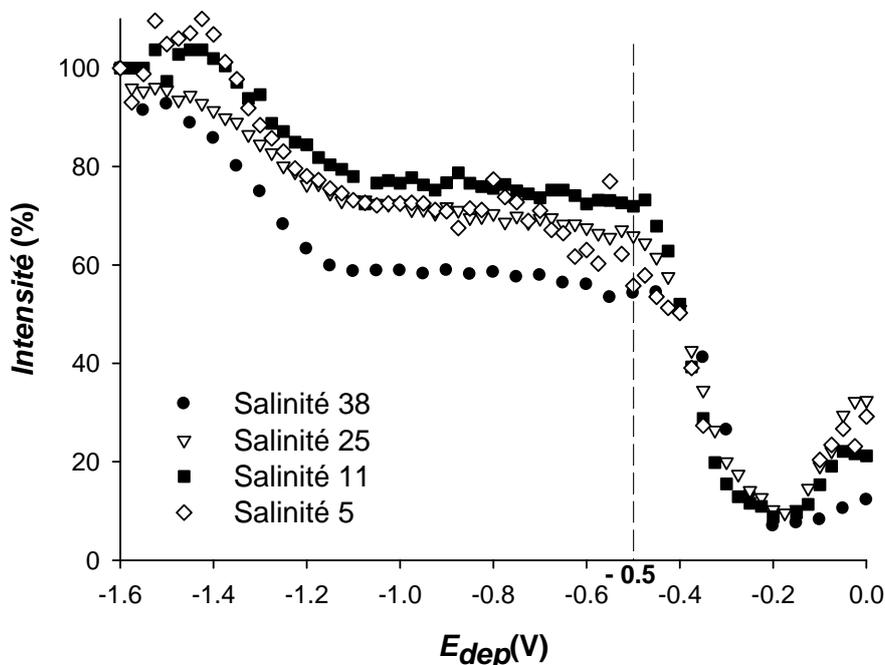


Figure IV-7 : Pseudopolarogrammes obtenus pour une concentration en cuivre total de 100 nM normés à l'intensité du pic obtenue pour le potentiel de dépôt de $-1,6\text{V}$. $T_{dep} = 297\text{ sec} + 3\text{ sec}$ à $-1,6\text{V}$. Echantillons de la campagne de prélèvements de 2007

En présence de 100 nM de cuivre ajouté, on constate un comportement des 4 échantillons tout à fait identique. Une vague bien définie, située vers $-0,3\text{V}$, montre que la capacité de complexation des échantillons est bien dépassée ; elle correspond, en effet, au métal labile. Une autre vague vers $-1,3\text{V}$ correspond à des complexes organiques pouvant être dissociés à ces potentiels très négatifs.

Entre les potentiels de $-0,5\text{ V}$ et $-1,1\text{ V}$, il y a un plateau de faible pente montrant que l'on peut dissocier progressivement une partie de métal, correspondante au métal le moins fortement complexé à la MOND sur cette gamme de potentiels étudiée.

Les pseudopolarogrammes obtenus pour les échantillons de 2008 présentent des formes similaires et ne sont pas présentés sur ce graphique. Ainsi, le potentiel d'accumulation de $-0,5\text{ V}$ est celui qui sera utilisé pour la détermination des paramètres de complexation de tous les échantillons prélevés en 2007 et 2008, car c'est celui qui permet d'obtenir la meilleure intensité de signal pour la mesure du cuivre labile, sans apparemment dissocier de métal qui serait plus faiblement complexé.

IVB. Analyse des propriétés de complexation de la MOND de l'estuaire

Comme dans l'étude précédente réalisée sur l'échantillon de MOND marine, cette nouvelle étude s'appuie principalement sur l'utilisation de la technique d'ajout logarithmique (**Figure IV-8 A**). Cependant, cette fois-ci, après chaque ajout métallique, le délai d'attente de 2 heures, nécessaire afin d'obtenir les paramètres de complexation à l'équilibre, a été mis à profit afin de réaliser une série de 20 mesures successives après chaque ajout (**Figure IV-8 B**). Ces mesures permettent de déterminer des paramètres cinétiques de complexation du cuivre sur la MOND en utilisant l'approche cinétique définie dans la partie **II C4**.

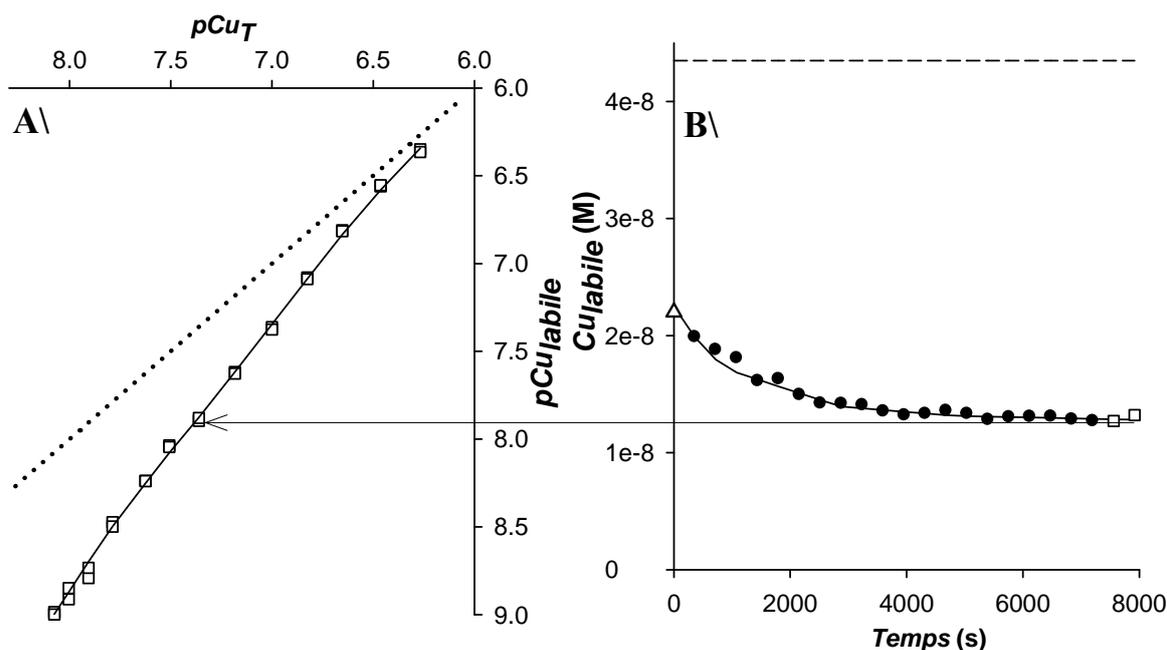


Figure IV-8 : Titration logarithmique du cuivre sur l'échantillon de salinité 13 de 2008. A\ Fitting (trait plein) à l'équilibre des points expérimentaux (carrés) avec en pointillés la droite de non complexation. B\ Fitting (trait plein) cinétique des points expérimentaux (cercles pleins) pour la 9^{ème} addition de métal. Droite en tirets : métal total ; carrés : valeurs utilisées pour la titration à l'équilibre ; triangle : estimation du Cu_{labile} à $t=0$ s d'équilibre

Ce type d'étude nous conduit donc à devoir analyser une série d'environ 360 voltammogrammes par analyse, pour lesquels il faut manuellement procéder à une intégration détaillée du pic ou du massif de pic de cuivre. L'analyse des propriétés de complexation de la MOND est donc présentée ici, suivant les 2 approches utilisées, à savoir, l'approche à l'équilibre et l'approche cinétique.

IVB1. Etude des propriétés de complexation de la MOND à l'équilibre

IVB1a) Influence du temps d'équilibre sur la détermination des paramètres de complexation

La **Figure IV-9** présente les résultats d'ajouts logarithmiques obtenus sur l'échantillon d'eau de mer prélevé en mer en 2008, pour un temps d'équilibre de 5 minutes, temps minimum possible ; et pour un temps d'équilibre de 2 heures, temps maximum entre 2 ajouts pour atteindre l'équilibre de complexation.

Graphiquement (**Figure IV-9**), la différence entre les 2 expériences est notable et montre bien que la complexation du métal n'est pas encore terminée au bout de 5 minutes. En effet, la courbe obtenue avec 5 minutes de stabilisation se situe entièrement au dessus de celle réalisée après 2 heures de stabilisation montrant ainsi qu'une quantité de métal labile plus importante est mesurée et donc non complexée avec seulement 5 minutes de temps d'équilibre.

Cette différence entre les deux expériences se retrouve après modélisation des données dans les paramètres de complexation (**Tableau IV-2**) ; les concentrations en sites complexants sont en effet plus faibles après uniquement 5 minutes d'équilibre comparées à 2 heures d'équilibre. De plus, la constante de complexation du site fort se retrouve 10 fois plus faible que celle obtenue après 2 heures, dans des conditions tout à fait identiques. Il est donc nécessaire d'attendre ces 2 heures d'équilibre afin d'être au plus proche possible des conditions d'équilibre de l'échantillon.

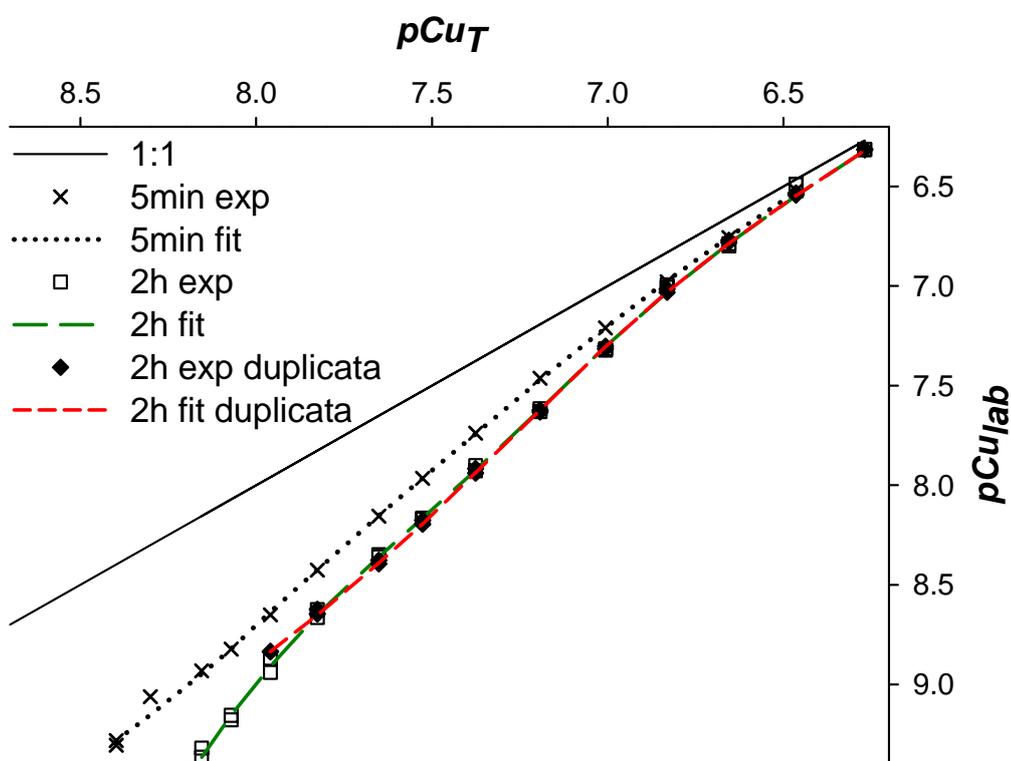


Figure IV-9 : Influence du temps de stabilisation sur la mesure de capacité complexante, échantillon Sea Šibenik 2008 pour 2h ou 5 minutes de temps d'équilibre après chaque ajout de métal

Les 2 courbes présentées après 2 heures de stabilisation ont été réalisées afin d'obtenir un duplicat d'expérience complet sur une expérience d'ajout logarithmique. Les 2 mesures ont, de plus, été réalisées environ à 1 mois d'intervalle et sur 2 appareillages différents (PSTAT10 et PGSTAT12, Autolab/ Metrohm) afin de valider la technique employée, quel que soit l'appareil utilisé, en prenant soin de recalculer la sensibilité pour chaque analyse.

Les résultats montrent tout d'abord, d'un point de vue graphique (**Figure IV-9**), que les expériences sont tout à fait similaires, avec la plus grosse différence observable sur les ajouts de faibles concentrations. Cette différence peut avoir plusieurs sources, comme par exemple, une légère contamination du système utilisé lors de la deuxième expérience, ou encore un bruit de fond plus important sur la ligne de base ne permettant pas de correctement déterminer les pics de plus faible concentration.

La bonne détermination de ces pics, correspondant à de très faibles concentrations de métaux, est nécessaire afin de bien définir le site fort ; celui-ci est, en effet, très influencé par ces points, vu sa faible concentration, comme nous pouvons le voir sur le **Tableau IV-2** pour le ligand L₁T.

Tableau IV-2 : Valeurs des paramètres de complexation obtenues pour 2 temps de stabilisation (2 heures et 5 minutes) après ajout de métal. Dupliquats réalisés sur 2 appareils différents à 1 mois d'intervalle

	Sibenik Sea 2h	Sibenik Sea 2h duplicata	Sibenik Sea 5min
L ₁ T (μeq g _C ⁻¹)	6.3 ± 0.2	12.5 ± 0.3	8.6 ± 0.1
logKCuL ₁	12.3 ± 0.1	11.0 ± 0.0	11.2 ± 0.0
L ₂ T (μeq g _C ⁻¹)	60.5 ± 1.4	53.4 ± 1.1	45.8 ± 0.8
logKCuL ₂	10.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0	9.7 ± 0.0

La variation de la valeur du ligand plus faible n'est pas très importante (env. 10%) et peut être, elle aussi, liée à la variation de la concentration du ligand fort. En effet, si l'on regarde la concentration en ligand totale, celle-ci est, à l'erreur près, identique pour les deux expériences. L'expérience de duplicat, menée sur deux appareils différents et à un mois d'intervalle, montre une bonne reproductibilité de la technique permettant, notamment, de correctement redéfinir la quantité totale de ligands (moins de 2% d'erreur). Cependant, une assez grosse variation peut être observée pour le ligand le plus fort, de part sa très faible concentration dans le milieu, mais aussi, à la difficulté de travailler à d'aussi faibles concentrations métalliques pour lesquelles il existe une plus grosse erreur sur la détermination du pic de métal.

Une attention particulière doit donc être apportée au traitement des signaux obtenus à faible concentration de métal, afin de minimiser, autant que possible, l'erreur analytique pouvant être commise sur la détermination des paramètres de complexation du ligand le plus fort.

IVB1b) Variation théorique d'une constante de stabilité dans un estuaire

Afin de pouvoir connaître quelle est la variation théorique attendue d'une constante d'équilibre dans un gradient de salinité avec la variation de la force ionique, la modélisation du comportement d'un ligand connu comme l'EDTA est nécessaire. Ainsi, le logiciel MINEQL (Westall J.C. *et al.*, 1976) a été utilisé afin de modéliser la spéciation du cuivre en présence de 100 nM d'EDTA et 10 nM de cuivre (équivalent à un rapport ligand/métal pouvant être rencontré dans le milieu naturel) pour une salinité variant de 0 à 38. La composition ionique pour les différentes salinités a été recalculée à partir de la loi de Dittmar et la force ionique est modélisée d'après un calcul réalisé par MINEQL.

Pour comprendre où intervient la force ionique dans le calcul de la constante d'équilibre, il faut écrire l'équation thermodynamique en terme d'activité :

$$K_{th}^a = \frac{aCuL}{aCu^{2+} \times aL} \text{ avec « } a \text{ » représentant l'activité qui est le produit du coefficient d'activité}$$

« γ » par la concentration de l'espèce. C'est ce terme « γ » qui fait intervenir dans son calcul la force ionique « I ». Afin de calculer ce coefficient d'activité, la formule de Davies (**Équation IV-1**) a été utilisée et extrapolée pour l'ensemble de la gamme de force ionique balayée avec « z » représentant la charge de l'ion ou de la molécule, et « I » la force ionique:

$$\text{Log } \gamma = -0,509 \times z^2 \left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - 0,2 \times I \right)$$

Équation IV-1 : Equation de Davies utilisée pour les calculs de coefficients d'activité (D'après Buffle J., 1988), théoriquement valable pour des forces ioniques < 0,2 M et une température de 25°C

La constante conditionnelle, en terme de concentration, calculée dans notre étude, peut être définie de la manière suivante :

$$K_{cond}^{[]} = \frac{[CuL]}{[Cu_{lab}] \times [L]}, \text{ ainsi si l'on veut tenir compte de la force ionique et donc de la salinité, il}$$

faut diviser cette constante par le rapport des « γ » de ces mêmes espèces.

La **Figure IV-10** montre les résultats de la modélisation réalisée avec l'EDTA. Le trait plein représente le log de la constante thermodynamique K_{th}^a ; celle-ci tient compte de la force ionique et ne montre, donc, quasiment pas de variation avec la salinité. La non linéarité observée est probablement due aux erreurs d'arrondis au cours des calculs, mais globalement la constante est égale à 18,79 correspondant à la constante thermodynamique $K_{thCuEDTA}$.

Si l'on ne corrige pas de la force ionique, c'est-à-dire si cette constante apparente est calculée uniquement grâce au rapport des concentrations des espèces, comme c'est le cas dans le calcul de spéciation utilisé dans PROSECE, la constante apparente $K_{th}^{[]}$ représentée en pointillés diminue alors, avec une salinité croissante, montrant principalement l'effet des ions majeurs.

Dans le cas d'une mesure de métal labile, comme dans le cas du cuivre mesuré en polarographie, la constante calculée en remplaçant le cuivre libre par le cuivre labile est une constante conditionnelle qui devient alors beaucoup plus faible à cause de la présence d'ions. En effet, les ions divalents comme le calcium peuvent rentrer en compétition avec le cuivre, augmentant la quantité de cuivre labile. Cet effet est particulièrement bien visible entre les 2 premiers points de la courbe en triangle de la **Figure IV-10**, où on passe d'une eau sans ion et donc sans effet de compétition, à une eau de salinité 1, avec une forte diminution de la constante apparente de complexation.

On voit ainsi, sur la courbe représentée par les symboles en triangles (qui ne tient pas compte de la force ionique), que la constante conditionnelle, telle que celle calculée à partir d'expériences de polarographie, diminue avec une salinité croissante, et que, si on la corrige de la force ionique (courbe représentée par des points), sa valeur augmente avec la salinité.

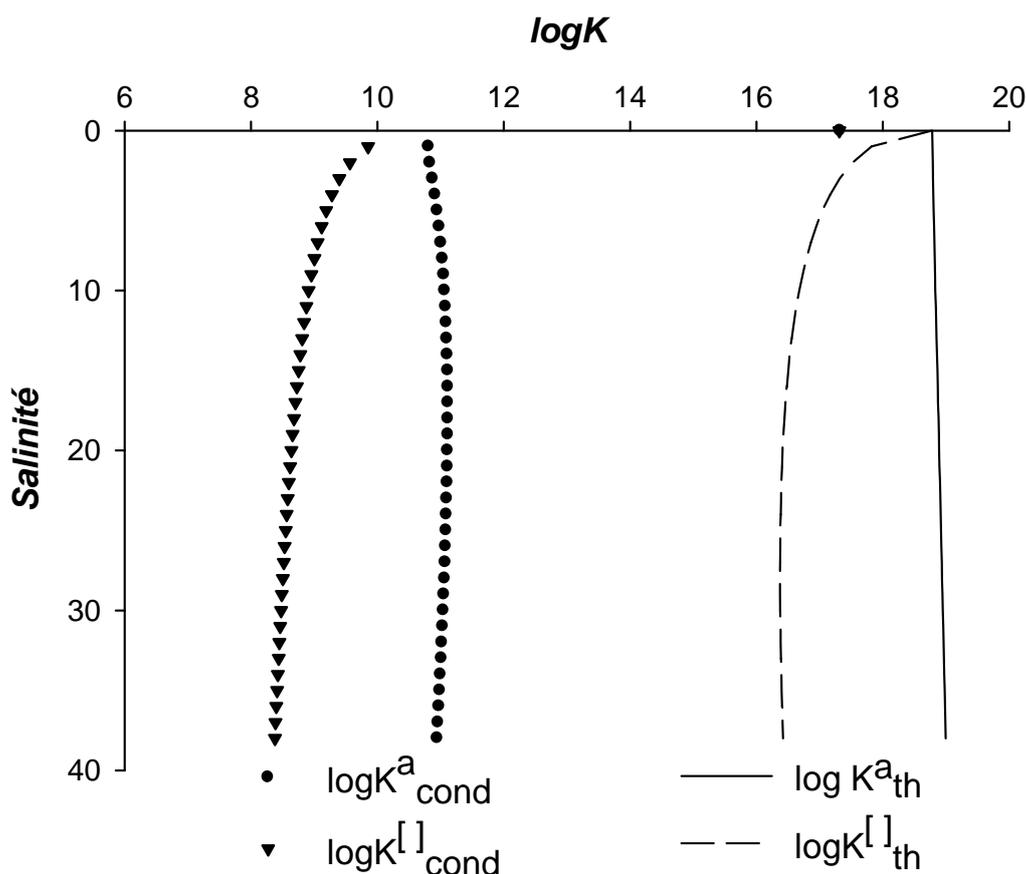


Figure IV-10 : Modélisation du comportement d'une constante d'équilibre dans un gradient de salinité

Ainsi, la correction de la force ionique / salinité, sur les constantes déterminées dans notre étude (équivalentes aux valeurs représentées par des triangles), devrait augmenter la valeur des constantes de stabilité, d'autant plus que la salinité augmente (courbe représentée par des points). Cependant, comme nous ne connaissons, ni la charge de la MOND (influençant la valeur du « γ » et par conséquent les autres constantes), ni les constantes d'équilibre vis-à-vis des cations majeurs, il n'est pas possible de corriger correctement les valeurs des constantes conditionnelles obtenues. C'est pourquoi nous utiliserons uniquement des constantes dites « conditionnelles » dans cette étude.

IVB1c) Variation de la constante de complexation thermodynamique suivant la charge moyenne du site de complexation.

Comme expliqué précédemment, la valeur de la constante de stabilité conditionnelle est étroitement liée au coefficient d'activité « γ » intervenant dans le calcul de l'activité des espèces pour la détermination de la constante de complexation. Ce coefficient est lui-même lié à la charge du site complexant. Ainsi, afin d'avoir une idée de la valeur de la constante de complexation thermodynamique en fonction de la charge du site impliqué dans la complexation, les calculs de cette constante ont été réalisés pour différentes charges de ce site (L) (Figure IV-11).

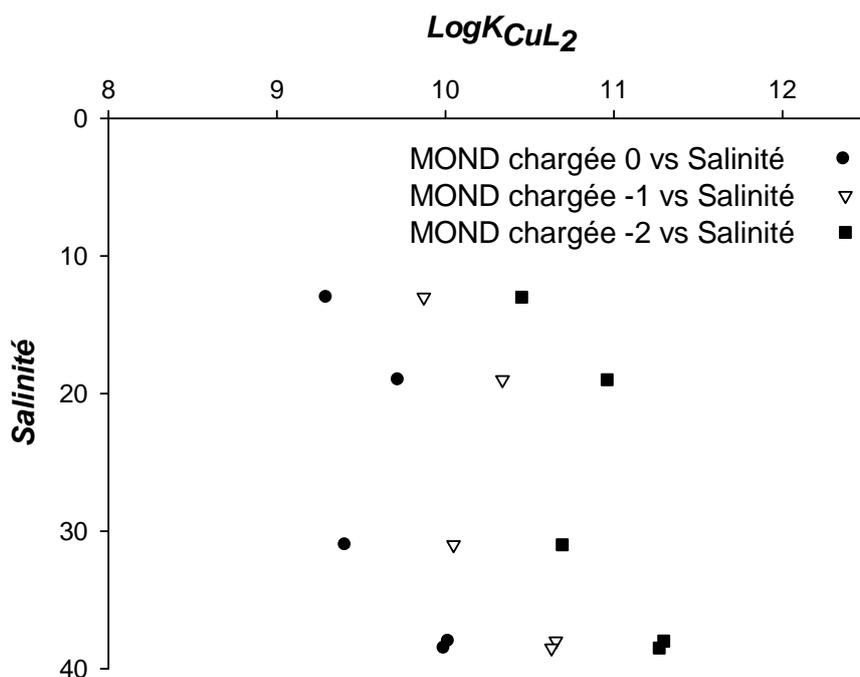


Figure IV-11 : Variation de la constante de complexation $\log K_{CuL_2}$ selon la charge du site impliqué dans la complexation, exemple donné sur les constantes obtenues en 2008

On peut ici, voir l'importance de cette charge sur la détermination de la constante de complexation du site le plus faible ; avec des valeurs pouvant varier d'environ 0,6 à 1,3 unité en logarithme, soit des constantes environ 5 à 10 fois plus fortes pour une charge passant respectivement de 0 à -1 puis -2.

Ces constantes ne tiennent toujours pas compte de la constante de complexation de la MOND avec le calcium, qui pourrait entraîner des valeurs de constantes encore beaucoup plus importantes. A titre d'exemple, si la constante thermodynamique du calcium vis-à-vis de l'EDTA ($\log K_{CaEDTA} = 12,5$), une constante conditionnelle mesurée ici pour un $\log K'_{CuL} = 8,5$ aurait alors une constante thermodynamique $K_{CuL} = K'_{CuL} \times K_{CaL}$ soit $\log K_{CuL} = 21$. Il n'est donc pas étonnant que les constantes conditionnelles mesurées ici, soient beaucoup plus faibles que des constantes thermodynamiques, déterminées à l'aide du potentiel de demi vague d'un pseudopolarogramme, mentionnées par certains auteurs comme Croot P.L. *et al.* (1999) avec des ligands modèles.

N'ayant pas accès à toutes les constantes et ne connaissant pas, ni la charge de la MON, ni l'applicabilité du calcul du coefficient d'activité dans le cas de macromolécules, il est donc, encore une fois, préférable d'utiliser dans ce type d'étude, uniquement des constantes conditionnelles relatives aux paramètres maîtrisés, tout en gardant à l'esprit que les constantes thermodynamiques sont probablement plus fortes.

IVB1d) Résultats obtenus à l'équilibre

Sur les échantillons de 2007, les expériences ont été réalisées avec une gamme de cuivre total ajouté allant de 0,5 nM à 2 μ M en 20 ajouts. Cependant, les mesures ont montré qu'il n'était pas nécessaire d'ajouter plus de 0,5 μ M de métal sur ces échantillons, afin de dépasser suffisamment la capacité complexante de la MOND et d'atteindre, de plus, une droite permettant d'estimer la sensibilité de chacun des échantillons.

De même, les premiers ajouts souvent très faibles ne permettent pas toujours une bonne détermination du signal par rapport au bruit de la ligne de base, pour une perte de temps relativement importante (2 heures par ajout).

Ainsi, sur la campagne 2008, une gamme de titration légèrement modifiée a été utilisée allant de 1 nM à 0,5 μ M en 16 ajouts, ce qui permet de raccourcir le temps d'analyse à environ 35 heures contre environ 45 heures auparavant, pour une même gamme analytique balayée et avec des temps d'équilibre similaires après chaque ajout (2 heures).

La modélisation des courbes expérimentales a été réalisée avec 1 et 2 ligands sur l'ensemble des expériences. Les valeurs de constantes d'équilibre, ainsi que les concentrations en ligands ainsi présentées, sont celles obtenues pour le fitting des données expérimentales avec le nombre de ligand présentant la valeur d'erreur la plus faible.

Il faut relever ici, que les variations pouvant ensuite être observées, entre les résultats obtenus pour les différents échantillons, n'ont strictement aucune relation avec le nombre de ligands utilisé pour fitter les données, et sont donc, uniquement représentatives des différences existantes entre les échantillons.

Il faut souligner, de plus, que les sites mis en évidence dans cette étude, avec des constantes $\log K$ aux alentours de 9 à 10, peuvent être caractérisés comme des sites plutôt forts ou intermédiaires et ceux de $\log K = 12$ à 13, de forts ou très forts. Cependant, le site « fort » sera souvent appelé le site « plus faible » en opposition aux sites très forts mis en évidence dans cette étude.

Il faut aussi rappeler, ici, que bien que l'existence physique de ces sites ne soit pas prouvée (Town R.M. et Filella M., 2000a), leur utilisation est bien souvent suffisante afin de correctement décrire le comportement de la MON dans un milieu naturel.

La **Figure IV-12** présente les concentrations en sites métalliques « L_{iT} » et les constantes de complexation « $\log K_{CuLi}$ » de ces sites, obtenus pour les 4 échantillons prélevés en 2007 et 2008 en fonction de la profondeur.

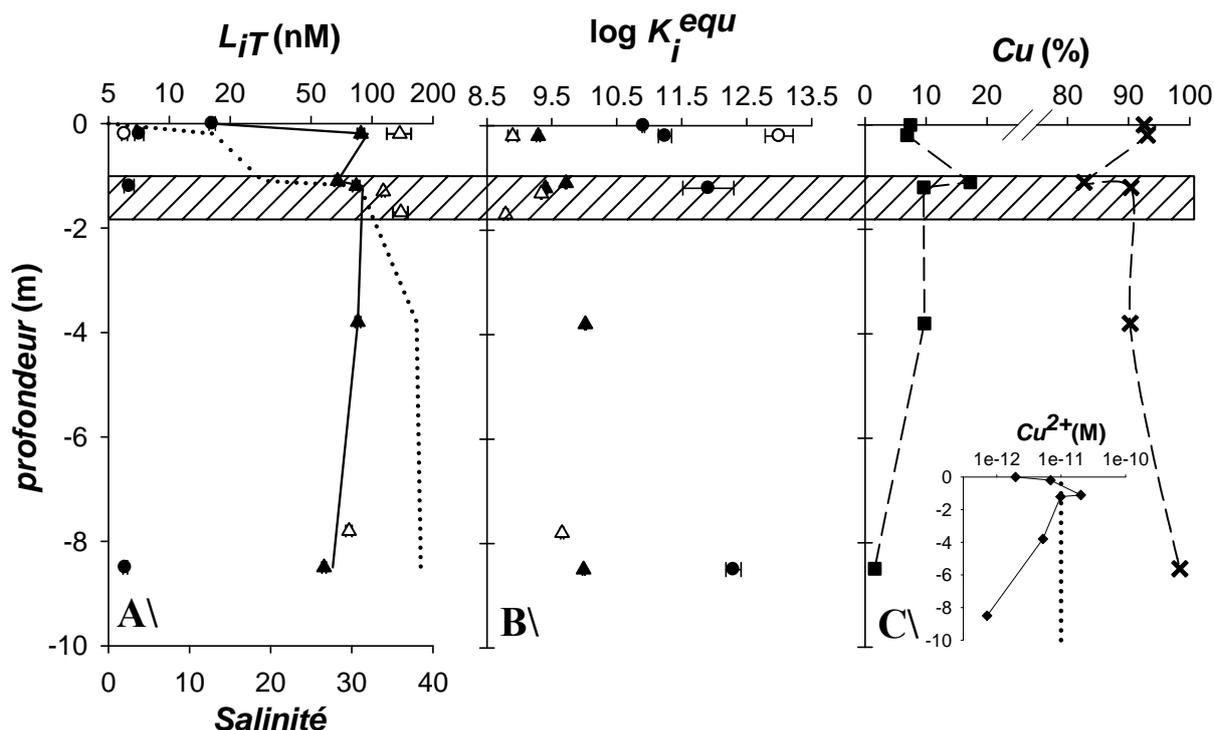


Figure IV-12 : Concentrations en échelle logarithmique (A\) et constantes de stabilité (B\) en fonction de la profondeur pour les ligands forts (cercles) et faibles (triangles) pour les campagnes de 2007 (symboles vides) et 2008 (symboles pleins) ; (A\) courbe pointillée: salinité mesurée en 2008 ; courbe pleine: $\Sigma L_{i-T}=f(\text{profondeur})$ pour 2008 ; C\ : Fraction de cuivre inorganique (carrés) et organique (croix) en fonction de la profondeur pour les échantillons de 2008 ; en encart : concentrations en cuivre libre et limite de toxicité en pointillés selon Sunda *et al.*, 1987. La zone barrée représente la couche interfaciale

Il est tout d'abord intéressant d'examiner sur la **Figure IV-12,A** et **B** représentant respectivement les concentrations en ligands ainsi que les constantes de complexation modélisées représentées en fonction de la profondeur, l'échantillon de la rivière représenté à une profondeur de 0 mètre, ainsi que l'échantillon d'eau de mer représenté à -8,5 mètres.

On peut donc voir que l'échantillon de rivière est représenté par seulement un ligand de faible concentration ($16,3 \pm 0,6$ nM) associé à une relativement forte constante de stabilité ($10,9 \pm 0,1$ en log) pouvant être associée à la classe de ligand fort (L_1). En fait, cette constante de stabilité apparemment forte peut diminuer pour une augmentation de la salinité due à l'augmentation de la compétition des cations majeurs, comme nous l'avons vu dans la partie **IVB1b**).

Lorsqu'ils atteindront l'estuaire, ces ligands provenant de la rivière, auront donc des constantes d'affinité envers le cuivre diminuées, et se retrouveront alors du même ordre que celles des ligands les plus faibles (L_2) déterminés dans l'estuaire. Dans la littérature, cet effet a déjà bien été décrit pour l'évolution de la spéciation du cuivre dans un environnement estuarien pour un acide humique (Hamilton-Taylor *et al.*, 2002).

L'échantillon d'eau de mer, quant à lui, est caractérisé par 2 ligands (L_1 et L_2) de faibles concentrations (respectivement $6,1 \pm 0,2$ et $58,0 \pm 1,4$ nM) présentant les plus fortes constantes de stabilité (respectivement $12,3 \pm 0,1$ et $10,0 \pm 0,1$ en log).

Les différences de caractéristiques observées entre ces 2 points extrêmes peuvent être liées aux différentes sources de MOND : majoritairement d'origine terrigène dans la rivière et d'origine autochtone marine dans l'eau de mer.

Cette hypothèse peut être appuyée par l'augmentation du COD observée dans le gradient de salinité liée à une production de MOND autochtone dans l'estuaire probablement d'origine biologique.

Dans la colonne d'eau, si le mélange des eaux se faisait suivant un système de type conservatif, les concentrations en ligands devraient alors aussi suivre un mélange de type conservatif, contrairement aux constantes de stabilités du cuivre qui ne sont pas dépendantes de la salinité. Dans l'estuaire de la Krka, et pour les deux campagnes réalisées, aucune variation de type conservatif n'a été observée dans les concentrations en ligands (**Figure IV-12,A**), trait plein). De même, si l'on se place d'un point de vue qualitatif en regardant les densités de site : En 2008 par exemple, on passe d'une densité de site de $31 \mu\text{eq.g}_C^{-1}$ dans la rivière, à $115 \mu\text{eq.g}_C^{-1}$ à la surface de l'estuaire et on retombe à $80 \mu\text{eq.g}_C^{-1}$ dans la couche interfaciale puis $60 \mu\text{eq.g}_C^{-1}$ dans l'eau de mer. On peut noter que ces résultats, que ce soit pour les sites forts avec des concentrations en sites variant de 6,06 à 16,27 nM et des constantes conditionnelles variant de 11 à 14, ou pour les sites plus faibles 58,04 à 137,13 nM, avec des constantes conditionnelles variant de 8 à 10, que ces résultats sont en accord avec ceux pouvant être relevés dans la littérature pour des eaux marines (Gordon A.S. *et al.*, 2000 ; Lorenzo J.I. *et al.*, 2007 ; Scoullos M. *et al.*, 2006).

Les constantes de stabilité obtenues dans cette étude augmentent de la surface de l'estuaire à l'eau de mer (**Figure IV-12,B**), impliquant de plus forts ligands d'origine marine. Comme expliqué précédemment, dû à une augmentation des effets de compétitions des cations majeurs, avec la salinité, la constante de stabilité conditionnelle du cuivre pour un ligand donné devrait diminuer de la rivière vers la mer. Ceci montre, que dans notre cas, l'augmentation observée des constantes de stabilité conditionnelles du cuivre est bien réelle et même sous-estimée.

Ceci, associé à la mise en évidence d'une source de COD additionnelle présente dans l'estuaire (**Figure IV-4**) et à un maximum de concentration en ligand observé en surface (**Figure IV-12, A**), peut être expliqué par une production de MOND d'origine autochtone dans l'estuaire, liée à une activité biologique. En effet, il a déjà été montré dans la littérature, que certaines espèces d'algues (McKnight D.M. et Morel F.M.M., 1979) ou de phytoplancton (Coale K.H. et Bruland K.W., 1988) étaient capables de produire de tels ligands vis-à-vis du cuivre. De plus, on peut voir qu'en 2007, les concentrations en ligands observées à la surface de l'estuaire sont plus importantes qu'en 2008, ce qui tend à confirmer l'influence de l'activité biologique, qui a pu être observée à l'œil nu sur le terrain en 2007 contrairement à 2008.

Les paramètres de complexation obtenus à l'équilibre pour les échantillons de 2008 ont été intégrés dans un programme de spéciation (MINEQL), en utilisant les valeurs de salinité mesurées et les concentrations en cuivre totales, afin de calculer la spéciation du cuivre de cette colonne d'eau dans ces conditions naturelles (**Figure IV-12,C**). Le profil de profondeur de la fraction de cuivre organique fait apparaître un minimum dans la couche d'interface probablement dû à la plus forte augmentation de la concentration en cuivre total dans cette zone, malgré la légère augmentation de la concentration en ligand observée.

De plus, la fraction de cuivre inorganique, considérée comme une fraction biodisponible, augmente, conduisant à une hausse du cuivre libre (en encart **Figure IV-12,C**) jusqu'aux environs d'une concentration de 20 pM, qui se trouve être 2 fois supérieure à la limite de toxicité définie par Sunda W.G. *et al.* (1987) (Ligne pointillée en encart **Figure IV-12,C**) pour du phytoplancton estuarien. La forte toxicité du cuivre envers la communauté phytoplanctonique s'explique par la modification du processus de transport électronique dans le système photosynthétique, qui entraîne l'arrêt d'activités enzymatiques fondamentales (Pinto E. *et al.*, 2003).

La même observation a été faite pour les modélisations réalisées avec les paramètres de 2007, avec des concentrations en cuivre libre pouvant atteindre 77 pM dans la couche d'interface.

Lorsque l'on compare les valeurs des paramètres de complexation obtenues en 2007 et 2008 (**Figure IV-12,A** et **B**), la même tendance peut être observée, mais avec une plus forte

concentration en ligand, mais de plus faible constante de complexation pour les échantillons de 2007, ce qui explique que les concentrations en cuivre libre calculées en 2007 dans la couche d'interface se retrouvent supérieures à celles de 2008.

Si l'on trace les concentrations en ligands total calculées en fonction des concentrations en cuivre total mesuré (non représenté), la tendance observée est alors une augmentation de la concentration en ligand avec la concentration de cuivre, comme déjà observé par Muller F.L.L *et al.* (2001).

Il semble donc que les propriétés de complexations de la MOND présente dans l'estuaire soient en grandes parties contrôlées par la MOND autochtone, probablement d'origine biologique, produite à la surface de l'estuaire.

Cependant, malgré une plus forte densité de site, ces ligands supplémentaires ne sont pas suffisants afin de tamponner complètement l'augmentation du cuivre dans la couche d'interface.

La MOND provenant de l'eau de mer, et donc majoritairement d'origine marine, apparaît comme étant la plus sélective vis-à-vis du cuivre. La MOND présente à la surface de l'estuaire a, elle, probablement majoritairement comme origine, une production biologique aquatique. Il n'est pas non plus à exclure, que la MOND dite marine dans cette étude, soit aussi en partie issue de l'estuaire, mais, qu'à cause d'un temps de résidence plus long, les macromolécules constituant la MOND évoluent en changeant leurs propriétés et plus particulièrement dans notre cas, leurs affinités envers les métaux traces.

IVB1e) Traitement d'un échantillon synthétique

Un échantillon fabriqué au laboratoire à partir d'un mélange 1V/1V d'échantillon de la Krka et de l'échantillon d'eau de mer de salinité 38 a été analysé dans les mêmes conditions que les échantillons obtenus dans les 2 campagnes de prélèvements afin de le comparer à l'échantillon naturel de salinité 19 prélevé en 2008. Le but est de confirmer, que les propriétés complexantes de ce dernier sont significativement différentes d'un échantillon de même salinité qui aurait été créé à partir des échantillons sources.

Cet échantillon préparé présente une salinité de 19,3, et une concentration en carbone calculée de $0,74 \pm 0,02 \text{ mg}_C \cdot \text{L}^{-1}$ ainsi qu'une concentration en cuivre totale de 3,2 nM.

Les titrations réalisées pour l'échantillon prélevé de salinité 19 (sal19), ainsi que l'échantillon synthétique de salinité 19 (Synth Sal 19), ainsi qu'une courbe de titration simulée grâce à MINEQL à partir des résultats des paramètres de complexation obtenus à l'équilibre, pour un mélange 50/50 des échantillons de la Krka et de l'eau de mer, sont présentées sur la **Figure IV-13**.

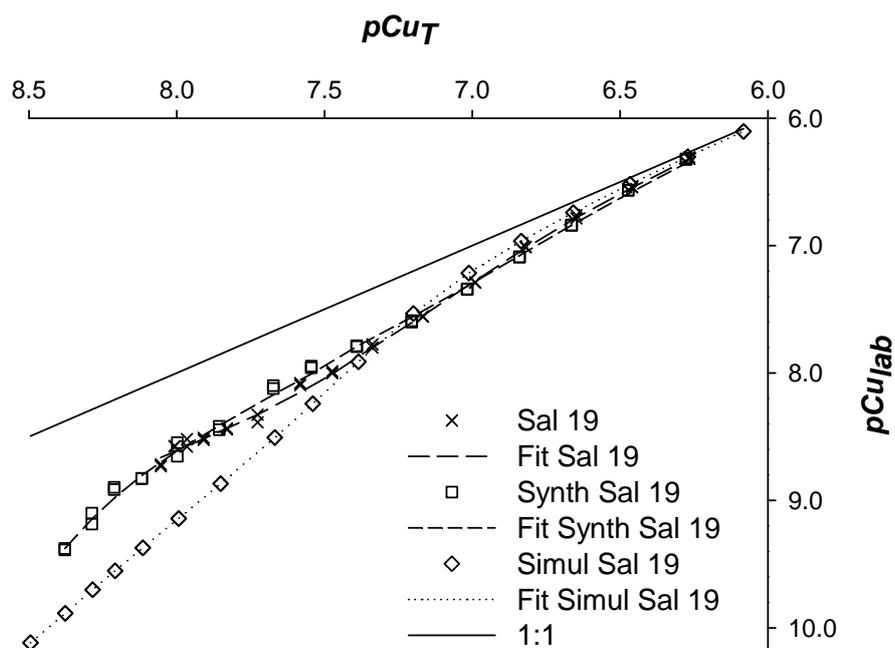


Figure IV-13 : Courbes d'ajout log de l'échantillon de salinité 19 naturel de 2008, de l'échantillon synthétisé à partir des échantillons de la Krka et de l'eau de mer, et d'un échantillon théorique simulé avec MINEQL.

On peut, tout d'abord, voir graphiquement que l'échantillon simulé avec MINEQL (courbe en losange) présente un comportement complètement différent de ceux des échantillons de salinité 19 naturel et synthétique (respectivement courbes en croix et carrés). Le fitting par PROSECE de la titration simulée en définissant 3 ligands, conduit à des valeurs très proches des paramètres théoriques (**Tableau IV-3**).

La différence, entre l'échantillon synthétique et celui simulé, peut s'expliquer de différentes manières. Une explication pourrait venir du fait que le mélange des eaux de la Krka et de l'eau de mer peut conduire à des changements de conformation de la matière organique dus à la différence de force ionique entre ces différents milieux, mais aussi, par le fait, que nous ne tenons pas compte, des effets de compétitions pouvant se produire entre les cations majeurs et les ligands.

De plus, il n'est pas à exclure qu'il n'existe pas une différence due au mélange d'échantillons déjà filtrés et donc exempts de MON particulière.

La dernière ligne du **Tableau IV-3** montre le fitting de l'échantillon synthétique, en fixant les valeurs de concentrations en ligands comme étant la moitié de celles des échantillons initiaux, comme ce qui est attendu lors d'une simple dilution. Les constantes de complexations quant à elles, sont optimisées en contraignant leurs variations respectives suivant une augmentation, pour celles correspondantes aux sites de l'échantillon marin, et une diminution pour celles de l'échantillon de la Krka, comme ce qui devrait se produire si la modification de l'échantillon était simplement due à un effet de compétition avec les cations majeurs (cf. partie IVB1b)).

Tableau IV-3 : Comparaison des propriétés de complexations des échantillons Krka, eau de mer et salinité 19 naturel, synthétique et théorique

	L_1T (nM)	$\log KCuL_1$	L_2T (nM)	$\log KCuL_2$	L_3T (nM)	$\log KCuL_3$
Krka			16.30 ± 0.50	10.90 ± 0.04		
Eau de mer	58.00 ± 1.30	9.99 ± 0.02			6.06 ± 0.15	12.30 ± 0.10
Sal 19 théorique	27.90 ± 0.00	9.97 ± 0.01	9.07 ± 0.00	10.83 ± 0.01	3.24 ± 0.00	12.25 ± 0.01
Sal 19 naturel	67.60 ± 2.20	9.70 ± 0.00				
Sal 19 Synthétique	96.10 ± 6.50	9.30 ± 0.00			3.60 ± 0.20	12.20 ± 0.20
Sal 19 Synth avec Lt fixé	29.00	10.00 ± 0.05	8.14	9.14 ± 0.58	3.03	12.36 ± 1.00

Ce dernier fitting, présenté sur la **Figure IV-14**, permet de voir assez facilement, l'existence d'une erreur sur le fitting non négligeable, même si le pourcentage d'erreur reste assez faible. On peut donc déduire de ce graphique, que seul la compétition de la MOND avec les cations majeurs (calcium, magnésium), ne permet pas d'expliquer les changements des propriétés de la MOND observés. Dans le milieu naturel, en posant l'hypothèse qu'il n'y ait pas d'apport de MOND due, par exemple, à une activité biologique dans la couche intermédiaire, celle-ci subit donc des changements de conformation liés à l'évolution de la force ionique du milieu, conduisant à des propriétés de complexations significativement différentes de celles pouvant être calculées pour une simple dilution.

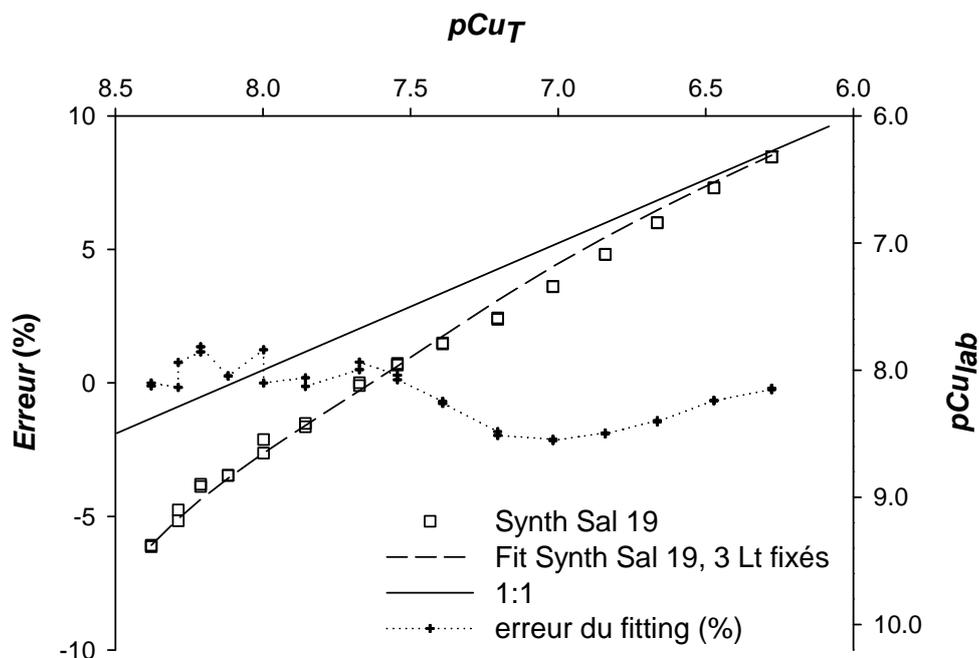


Figure IV-14: Courbe d'ajout log de l'échantillon de salinité 19 synthétique de 2008 modélisé avec 3 ligands dont les concentrations en ligands ont été fixées par celles des échantillons Krka et eau de mer, chacune divisées par 2 ; seuls les 3 logK sont modifiés lors du fitting

Ensuite, on peut constater dans le **Tableau IV-3** qu'il existe un seul, et unique, ligand sur l'échantillon de salinité 19 naturel, alors que l'échantillon synthétique fait apparaître 2 ligands. Cette différence majeure et significative pourrait s'expliquer en partie par le fait que l'échantillon naturel présentait une plus forte concentration de cuivre initiale (environ 8 nM) pouvant masquer, le site le plus fort. Cependant, le fitting des données de l'échantillon synthétique limité à la gamme d'ajout correspondante à celle de l'échantillon naturel (*i.e.* pour une concentration initiale commençant vers 8 nM) nécessite tout de même l'utilisation d'un set de 2 ligands. L'hypothèse d'une saturation d'un ligand fort peu concentré ($L_T < Cu_T$) est donc peu probable. Ceci tend donc à montrer, une fois de plus, que l'échantillon naturel est bien significativement différent de l'échantillon synthétique.

L'échantillon naturel de salinité 19 présent dans la couche de mélange eau douce /eau salée montre donc un comportement significativement différent de celui provenant du mélange « pur » entre l'eau de rivière et l'eau de mer. Ceci peut être expliqué, à la fois, par les nombreuses réactions physico-chimiques qui se produisent à l'interface eau douce /eau marine, mais aussi, par des changements de conformation de la MOND pouvant être engendrés par la variation de la force ionique du milieu, et enfin, par la présence d'une activité biologique et/ou de déchets biologiques accentués à ce niveau de la colonne d'eau dans cet estuaire (Ahel M. *et al.*, 1996 ; Cauwet G., 1991 ; Denant V. *et al.*, 1991).

IVB2. Constantes cinétiques d'association et de dissociation

Les données représentées dans cette partie sont celles obtenues par une modélisation séparée de chacune des courbes de cinétique obtenue après chaque addition de métal. De part la largeur de la fenêtre analytique utilisée sur la titration métallique, les barres d'erreurs obtenues, sur la détermination cinétique des paramètres de complexation, semblent être importantes, mais reflètent en fait, principalement, la fenêtre analytique utilisée. Cet aspect sera traité dans la dernière partie sur la comparaison des différentes techniques utilisées ; il faut donc ici regarder principalement les valeurs moyennes des constantes obtenues et non les valeurs des barres d'erreur associées.

Les valeurs des constantes d'association $\log k_1^1$ ainsi que celles de dissociation $\log k_1^{-1}$ des complexes ML_x , permettent d'obtenir des informations sur la rapidité et la stabilité des phénomènes de complexation du métal avec la MOND dans le milieu. Ces valeurs sont présentées sur la **Figure IV-15** pour les deux campagnes de prélèvements (2007 et 2008) en fonction de la profondeur.

Les constantes cinétiques d'association, quel que soit la campagne étudiée, montrent des constantes plus élevées pour le site fort (croix, **Figure IV-15**), avec une constante d'association moyenne de $\log k_1^1$ de 4,1, comparée à celle du site le plus faible $\log k_2^1$ de 3,5. Les constantes de dissociations quant à elles, varient dans le sens opposé avec des moyennes pour respectivement le site fort $\log k_1^{-1}$ et le site faible $\log k_2^{-1}$ de -8,2 et -6,1.

Ceci indique que l'augmentation de la force du ligand est due à la fois à une vitesse d'association plus rapide et une dissociation plus lente des complexes formés.

La tendance globale pouvant être observée avec la salinité est une augmentation de la constante d'association pour une constante de dissociation relativement constante (2007) ou légèrement diminuante (2008).

Ces observations expérimentales semblent donc aller à l'encontre de ce qui a été décrit par Hering J.G. et Morel F.M.M (1989) pour des sites forts. En effet, d'après leur étude réalisée sur la complexation du cuivre avec des ligands forts modèles (EDTA, NTA) et des substances humiques (SH) extraites, ils ont calculé que les constantes d'associations des ligands forts modèles devraient diminuer dû à un plus fort effet de compétition avec les cations divalent. Cependant, les résultats obtenus dans leur étude, pour des conditions naturelles, sont extrapolés à partir d'expériences réalisées à de plus fortes concentrations en ligands et en métaux, et la technique de quenching de fluorescence qu'ils utilisent pour étudier l'affinité entre le Cu et les SH est bien moins sélective et sensible que la DPASV.

Nos résultats sont cependant comparables à ceux de Ma H. *et al.* (1999), qui ont étudié les cinétiques d'association du cuivre avec des acides humiques extraits (Aldrich) en présence de calcium. Ils ont cependant supposés que la concentration en ligand L_i correspondait à la concentration en ligand totale L_{iT} et non à sa concentration libre, ce qui simplifie fortement la

procédure de fitting. Si l'on recalcule à partir de leur concentration en ligand (L_i) le plus fort et de leur constante d'association k_i^* ($k_i^* = k_i^1 \times L_i$) la constante d'association k_i^1 comme celle calculée dans notre étude, on peut estimer la constante à 3,2 en log. Malgré les conditions analytiques différentes (échantillon artificiel, plus forte concentration de MO, analyse potentiométrique), cette valeur est du même ordre de grandeur que celles obtenues dans notre étude.

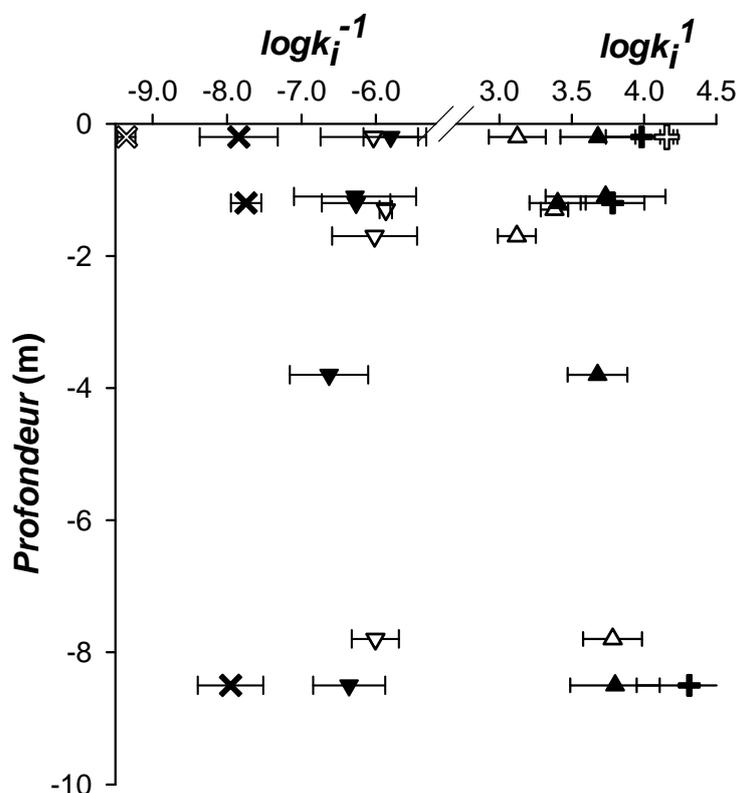


Figure IV-15 : Constantes cinétiques d'association $\log k_i^1$ et de dissociation $\log k_i^{-1}$ obtenues pour les échantillons de 2007 (triangles et croix vides) et 2008 (triangles et croix pleines). Sites forts représentés par des croix et sites faibles par des triangles

Si l'on compare, maintenant, les campagnes de 2007 (symboles vides) et 2008 (symboles pleins) ; les échantillons marins (de -4 à -8,5m) présentent des constantes cinétiques tout à fait semblables, ce qui n'est pas le cas pour les échantillons de salinités plus faibles. En 2008, les constantes d'association sont supérieures à celles de 2007 montrant, comme il a été observé dans les résultats obtenus à l'équilibre, qu'en 2007 il existe une plus forte activité biologique en surface de l'estuaire. De plus, l'échantillon de surface de 2007 présente spécifiquement une très forte constante d'association et une très faible constante de dissociation, comparé aux autres échantillons. Ceci appuie encore l'hypothèse d'une MOND spécifique d'origine biologique présente à la surface de l'estuaire, notamment en 2007.

La valeur moyenne de constante de dissociation observée pour le ligand le plus faible se situe à un $\log k_2^{-1} = -6,1$. Ces valeurs sont donc un peu plus faibles que celles observées pour le même type d'expérience réalisée sur une cinétique de 2 heures dans le cas du cuivre par Fasfous I.I. *et al.* (2004), aux alentours de $\log k_2^{-1} = -5$, mais avec une solution modèle d'acides fulviques de la rivière Laurentian. Cependant, leurs constantes ont été obtenues pour des expériences réalisées à un pH = 5 et pour une force ionique beaucoup plus faible (6 μM). Le pH plus faible pourrait en effet en partie expliquer la constante de dissociation plus forte qu'ils ont obtenu par

le fait qu'une augmentation de la quantité de proton décalerait l'équilibre de dissociation $ML \xrightarrow{k^{-1}} M + L$ par un effet de compétition.

Concernant les ligands forts ML_1 , si l'on étudie leurs constantes de dissociation, on peut voir qu'elles sont beaucoup plus faibles que celle des sites ML_2 (2 ordres de grandeurs), ce qui montre que les métaux liés à ce type de site sont beaucoup plus difficilement dissociables de la MOND dans le milieu. Ce type de constantes cinétiques, avec des constantes d'association assez rapides et de très faibles constantes de dissociation montre, l'importance des sites forts, qui malgré leurs très faibles concentrations dans le milieu, peuvent influencer largement sur la biodisponibilité d'un métal en le piégeant très fortement. La principale caractéristique des sites forts est donc leur très faible constante de dissociation.

Globalement, la faible augmentation des constantes d'association, couplée avec une diminution des constantes de dissociation, explique les plus fortes constantes d'équilibre conditionnelles déterminées plus en profondeur avec la salinité croissante.

Les observations cinétiques nous apportent donc une information supplémentaire sur la réactivité de la MOND dans l'estuaire. On peut voir que ces constantes cinétiques sont responsables d'équilibres relativement lents de l'ordre de 2 heures (**Figure IV-8**) qui peuvent donc entraîner des modifications notables de la spéciation métallique lors de variations physico-chimiques importantes, comme dans ici le cas d'un estuaire, compte tenu des mouvements hydrodynamiques permanents. Dans d'autres cas, ces mêmes temps d'équilibre pourraient être considérés comme rapide, comme par exemple dans des études océanographiques (Dycomed) où les masses d'eau en profondeur subissent beaucoup moins de changements rapides. Les informations apportées sont donc relatives à l'environnement étudié.

Une meilleure connaissance de la cinétique des échanges MOND - métaux traces est donc nécessaire afin de pouvoir inclure dans les programmes environnementaux de modélisation et de transport, cet aspect cinétique permettant de prédire avec plus de précisions le comportement des polluants métalliques dans des écosystèmes soumis, dans des temps relativement faibles, à de forts changements physico-chimiques.

IVB3. Comparaison des résultats de complexation obtenus par les approches à l'équilibre et cinétiques

IVB3a) Type de résultats obtenus pour un échantillon

Tout d'abord, avant de présenter les résultats obtenus sur la totalité des échantillons, il faut revenir sur les deux différentes techniques de modélisation utilisées sur les données cinétiques. Afin d'avoir une meilleure idée du type de résultat obtenu pour un échantillon, l'ensemble des paramètres déterminés à partir de l'échantillon de salinité 38 du prélèvement de 2008, est présenté sur la **Figure IV-16**.

Celle-ci montre en pointillés larges, les valeurs de la constante conditionnelle $\log K^{equ}$ et la concentration en ligand L_T déterminés à partir de l'approche à l'équilibre par le logiciel PROSECE. Les valeurs d'erreurs sur ces données ne sont pas représentées mais sont globalement inférieures à 5% pour l'ensemble des échantillons étudiés ; cette valeur, on le rappelle, est définie dans le programme, comme étant celle à partir de laquelle, la modification de la constante entraîne une modification de la valeur du biais de 10%. C'est ce même calcul qui est réalisé pour obtenir l'erreur des données cinétiques lorsque celles-ci sont modélisées simultanément (en pointillés serrés sur la **Figure IV-16**) ; elles sont du même ordre de grandeur et ne sont donc pas, non plus, représentées sur ce graphique.

Ce mode de calcul explique les valeurs beaucoup plus basses obtenues comparativement à celles déterminées pour des données cinétiques modélisées séparément, et où l'erreur finale correspond à l'écart type des valeurs obtenues pour chacune des courbes cinétiques. On peut d'ailleurs voir (triangles, losanges et croix sur la **Figure IV-16**) que chacune des valeurs obtenue séparément, présente une erreur relativement faible, ce qui n'est plus le cas lorsque l'on observe l'écart type de l'ensemble de ces valeurs (**Figure IV-17**).

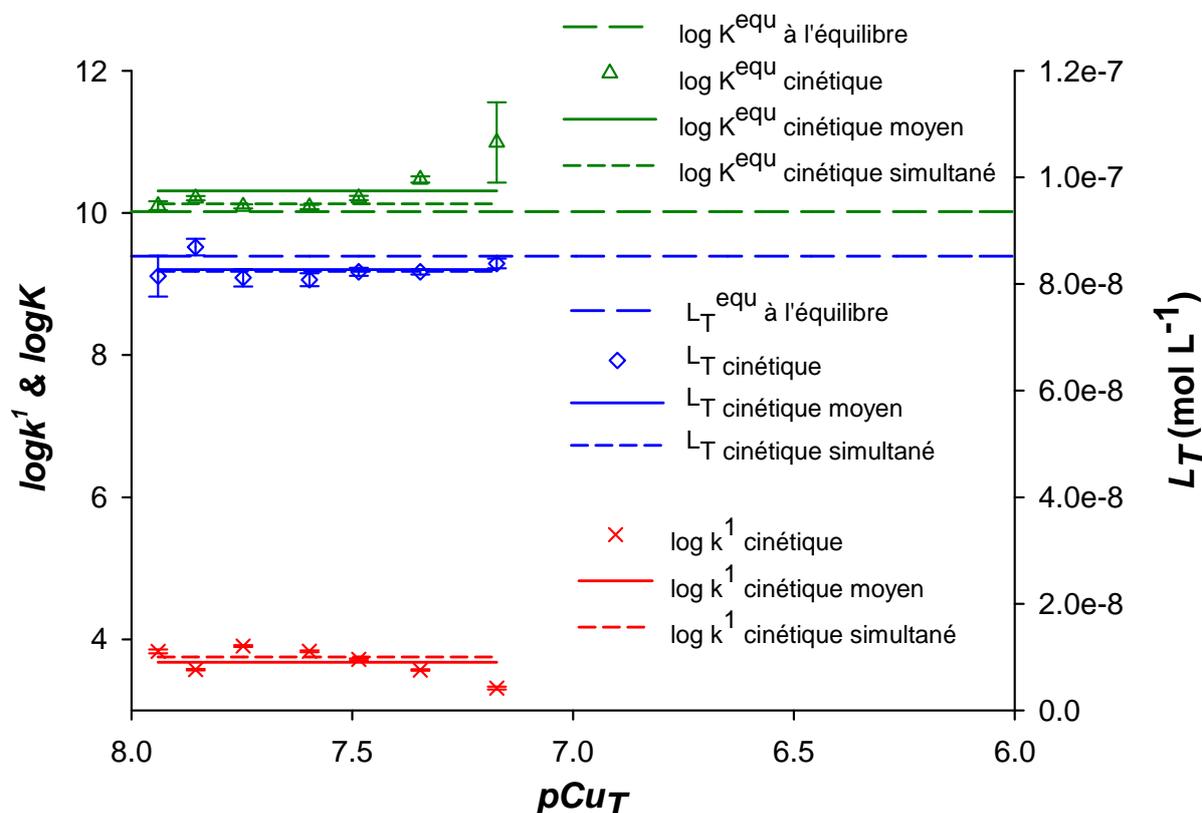


Figure IV-16 : Comparaison des résultats obtenus par l'approche à l'équilibre et cinétique (avec 2 techniques de modélisation cinétiques différentes) dans le cas de l'échantillon de salinité 38 (-3,8m) de 2008

Dans cet exemple, représentatif du type de résultats obtenus pour chacun des échantillons analysés, on peut voir que globalement chacune des valeurs cinétiques déterminées pour chaque ajout de métal (triangle, losange et croix pour respectivement les constantes de complexation conditionnelles $\log K^{equ}$, les concentrations en ligands L_T et les constantes d'associations $\log k^1$), sont relativement proches des valeurs déterminées à l'équilibre à partir de la titration logarithmique. Il n'est donc pas étonnant que la moyenne de ces valeurs, représentée par un trait plein sur la gamme de concentration de métal utilisée pour les expériences cinétiques, concorde parfaitement avec les valeurs obtenues en modélisant simultanément toutes les courbes cinétiques (pointillés serrés), mais aussi, avec les valeurs obtenues à l'équilibre (courbes en pointillés larges).

IVB3b) Comparaison des résultats de l'ensemble des échantillons

Les paramètres de complexations moyens obtenus pour chaque échantillon étudié, par l'approche cinétique (représentés sur l'axe des ordonnées) sont comparés à ceux obtenus par l'approche à l'équilibre (représentés sur l'axe des abscisses) sur la **Figure IV-17**.

Ainsi, en comparant la disposition des points à la droite 1:1, on peut avoir une bonne idée générale de la représentativité des résultats obtenus par chacune des 2 techniques.

Si l'on regarde, dans un premier temps, les données calculées pour les concentrations en ligands (**Figure IV-17,A**), il existe une très bonne corrélation entre les deux techniques, notamment sur la détermination de la concentration du ligand le plus faible (**Figure IV-17**, triangles), où la quasi-totalité des points se retrouve aligné sur la droite 1 :1. Ceci montre que, quel que soit la technique utilisée, les valeurs de concentration obtenues à partir des 2 différentes approches sont tout à fait semblables.

Cependant, les concentrations du ligand fort (**Figure IV-17**, cercles), semblent, elles, un peu inférieures lorsqu'elles sont calculées par l'approche cinétique, mais cette différence ne paraît pas surprenante vu la difficulté de détecter ce type de site, que ce soit par l'une ou l'autre des techniques et à de telles concentrations, *i.e.* très proches de celle du métal initialement présent.

Ensuite, si l'on se base sur les constantes de complexation conditionnelles calculées (**Figure IV-17,B**), tous les points se situent aussi globalement sur une même droite ; ceci montre que les résultats sont bien cohérents d'une expérience à l'autre et bien représentatifs de l'échantillon étudié.

Cependant, il semble que l'approche cinétique entraîne systématiquement une surestimation de cette constante d'environ 0,2 unité sur tous les résultats par rapport à l'approche à l'équilibre ou bien, au contraire, une sous-estimation de l'approche à l'équilibre par rapport à l'approche cinétique. Ceci peut être lié à de nombreux facteurs dépendants des techniques utilisées ; comme par exemple, la difficulté de correctement modéliser les premiers points de la cinétique, ou encore, l'incertitude sur le fait que la solution soit totalement à l'équilibre sur les expériences réalisées avec l'approche à l'équilibre....

Chaque technique possède donc ses propres avantages et inconvénients pouvant entraîner, au final, ce type de différences.

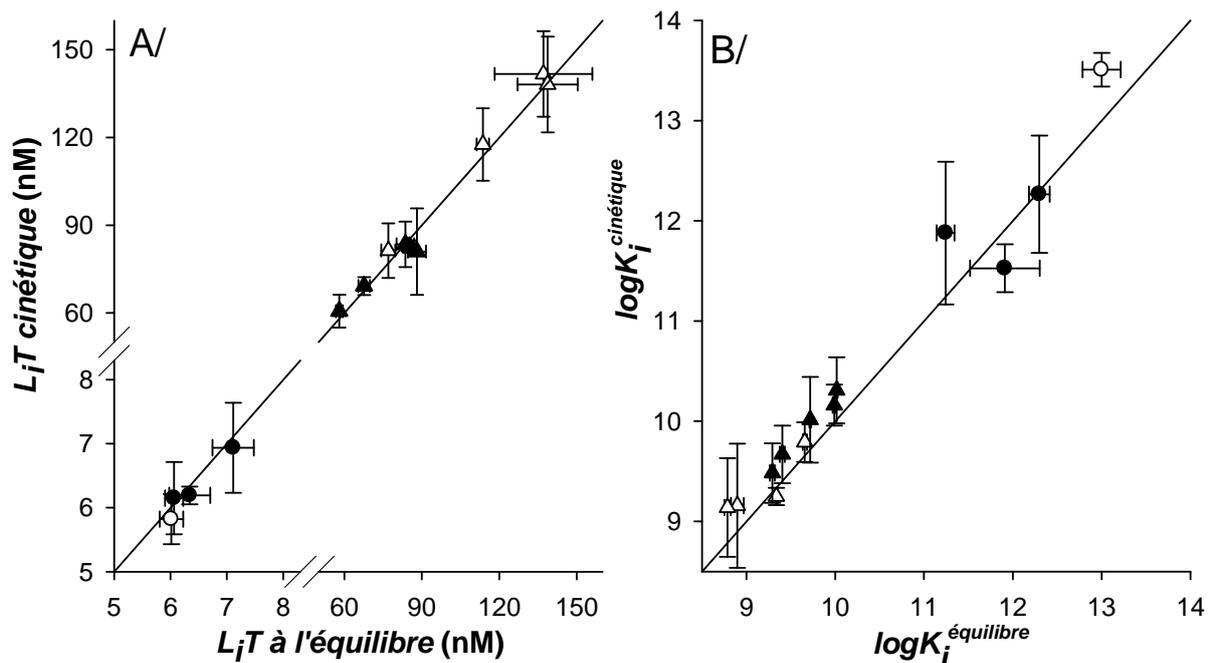


Figure IV-17 : Comparaison des paramètres de complexations obtenues par l'approche cinétique (en ordonné) et à l'équilibre (en abscisse) pour 2007 (symboles vides) et 2008 (symboles pleins) et pour les ligands forts (cercles) et faibles (triangles)

Globalement, les 2 techniques utilisées montrent donc une bonne similitude entre les résultats obtenus ; cependant, elles doivent être utilisées simultanément, l'une ne pouvant totalement remplacer l'autre. En fittant simultanément toutes les données expérimentales, l'approche à l'équilibre permet de moyenniser l'incertitude due aux erreurs analytiques, mais aussi de balayer un ratio métal sur ligand plus important, qui conduit à une meilleure estimation des concentrations en ligands. Mais cette approche suppose qu'un nouvel pseudo-équilibre est atteint après chaque nouvelle addition au bout de 2 heures, ce qui peut conduire à une sous estimation des constantes de stabilité. Au contraire, l'approche cinétique permet de traiter tous les points après chaque addition et est donc moins dépendante de l'équilibre. De plus, cette approche permet de déterminer pour chaque ligand, non seulement la constante de stabilité conditionnelle K_i^{equ} , mais aussi sa constante d'association k_i^1 , ainsi que sa constante de dissociation k_i^{-1} .

IVB3c) Avantages et inconvénients de chaque approche

Quelques petites différences entre les deux approches de déterminations des paramètres de complexation ont pu être mises en évidence dans les expériences précédentes. Ces différences peuvent avoir plusieurs origines ; les principaux avantages et inconvénients de chacune des deux techniques sont donc présentés ici, afin d'avoir une idée des sources d'erreurs potentielles.

Quel que soit l'approche utilisée, il est important de déterminer avec précision la sensibilité de la technique pour l'échantillon analysé. En cas de doute, comme dans cette étude pour l'échantillon d'eau douce de la Krka, il est nécessaire de revenir à des échantillons synthétiques, afin de valider le type de sensibilité obtenu, et de pouvoir interpréter correctement les résultats. Pour tous les échantillons analysés ici, la sensibilité utilisée est celle

obtenue sur les derniers ajouts de métaux, en prenant garde de ne pas utiliser la dernière valeur lorsque celle-ci correspond à la saturation de l'électrode de travail. Cette saturation se caractérise par une diminution de la pente pour les points situés en fin de titration.

Par l'approche cinétique, étant donné que l'on traite tous les points après chaque addition de métal, même si le plateau correspondant à l'équilibre n'est pas atteint, on peut tout de même modéliser la plus grosse partie de la variation de concentration en métal en fonction du temps, sans fixer de contraintes aux valeurs de k_i^1 , k_i^{-1} et L_T . Dans cette approche, la condition d'équilibre n'est donc pas nécessaire à la bonne détermination des constantes, contrairement à l'approche à l'équilibre, où cette condition est indispensable à une mesure correcte du cuivre labile, et par conséquent, à la bonne détermination des paramètres de complexation.

Cependant, l'approche à l'équilibre permet de balayer le ratio [Métal]/[Ligand] sur une large gamme de concentration, ce qui permet de saturer complètement les sites de complexation et de déterminer ainsi plus précisément la constante d'équilibre, mais surtout la concentration en site. Le principal inconvénient de l'approche cinétique lié à ce point, est que la bonne détermination des constantes k_i^1 et k_i^{-1} est étroitement liée au ratio [Métal]/[Ligand]. Ainsi, pour un faible ratio [Métal]/[Ligand], on aura une forte courbure de la courbe expérimentale nécessaire à la bonne détermination des paramètres de complexation, mais aussi, un bruit sur les mesures beaucoup plus important du au fait qu'on s'approche de la limite de détection de l'appareil, pour des concentrations en métal inférieures à la concentration en ligands de l'échantillon (**Figure IV-18,a**).

A l'opposé, pour de plus fortes concentrations en métaux, la courbure observée n'est plus suffisante pour déterminer correctement les paramètres de complexation du cuivre avec la MOND (**Figure IV-18,b**). Ceci est à la source de la gamme analytique réduite utilisable pour les mesures de cinétique, c'est-à-dire environ les ajouts 6 à 12 de l'expérience d'ajout logarithmique.

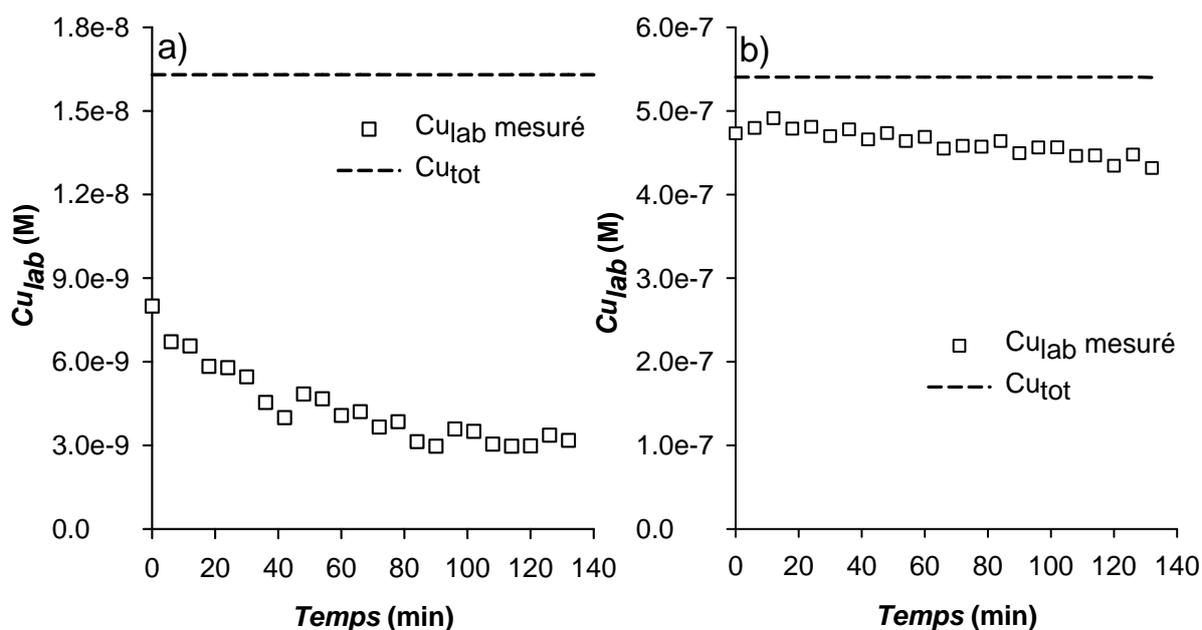


Figure IV-18 : Exemple de courbes cinétiques obtenues à faible (a) et à fort (b) ratio [M]/[L] ; échantillon de salinité 13, ajouts de métal 6 et 15.

Un inconvénient supplémentaire de l'approche cinétique, est la difficulté d'obtenir la concentration en cuivre labile au temps de 0 secondes.

En effet, à cause du temps d'analyse (6 minutes), il n'est pas possible d'obtenir de valeur à $t = 0$, et le calcul de celle-ci, à partir de la concentration en métal ajoutée, n'est pas non plus aisé. Il est alors nécessaire soit d'estimer la position de ce point à partir des suivants dans le cas d'un traitement séparé de chaque courbe, ou bien de laisser le programme optimiser cette valeur, dans le cas d'un traitement simultané des données cinétiques.

La détermination du k_i^1 , pouvant être représentée graphiquement par la tangente aux premiers points de la courbe de cinétique, est majoritairement influencée par le premier point de la courbe (**Figure IV-19**, trait plein et pointillés). Une erreur sur cette mesure entraîne, par conséquent, une erreur sur la détermination de la constante d'équilibre, qui on le rappelle, est égale au quotient de k_i^1 sur k_i^{-1} , avec ce dernier pouvant être représenté graphiquement par la position du plateau observé après stabilisation du signal (**Figure IV-19**, droite pointillée court-long).

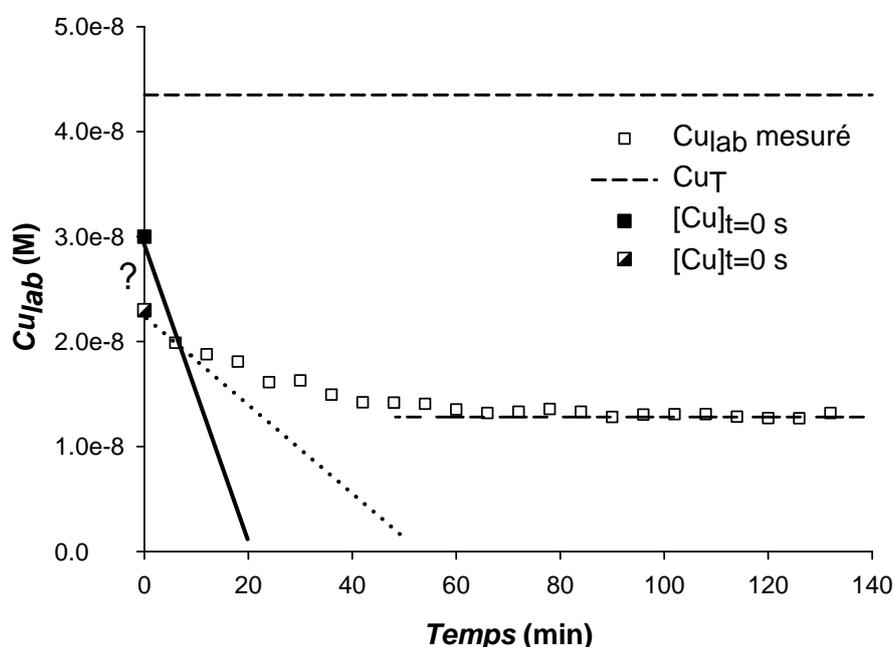


Figure IV-19 : Influence de la détermination du cuivre labile à $t = 0$ sur les mesures de cinétiques

Ainsi, chacune des deux approches peut présenter des avantages et inconvénients plus ou moins importants. Les deux techniques, comme nous avons pu le voir dans la partie précédente, apportent des résultats à peu près semblables, avec tout de même une meilleure précision sur la détermination de la concentration en ligand pour l'approche à l'équilibre et une information sur la rapidité des réactions par l'approche cinétique.

IVB4. Etude des échantillons par spectroscopie de fluorescence

Afin de mieux comprendre la provenance de la MOND et les phénomènes pouvant se produire dans l'estuaire, des analyses de fluorescence 3D ont été réalisées afin de suivre l'évolution de la MOND, et plus particulièrement, de la matière organique dissoute fluorescente dans la colonne d'eau.

Cette technique couramment employée dans la littérature (Coble P.G., 1996 ; Luciani X. *et al.*, 2008 ; Parlanti E. *et al.*, 2000), permet de caractériser la MON de façon moléculaire. En effet, l'excitation de la MOND à une longueur d'onde donnée, permet de mesurer la réponse de celle-ci sous forme d'un spectre d'émission caractéristique de la MO fluorescente (MOF) dissoute présente dans l'échantillon.

Ainsi, un balayage d'une gamme de longueurs d'onde d'excitation allant de 200 à 500 nm permet d'obtenir un spectre 3D présentant les réponses de la MOND sous forme de spectre d'émission pour des longueurs d'ondes allant de 250 à 600 nm. Ces spectres 3D présentent alors des pics pouvant être caractéristiques de la partie fluorescente de la MOND présente dans l'échantillon (**Figure IV-20**). Ces pics ont historiquement été définis par des lettres, et le sont toujours, dû au fait que la structure chimique des molécules leur donnant naissance ne soit pas encore connue.

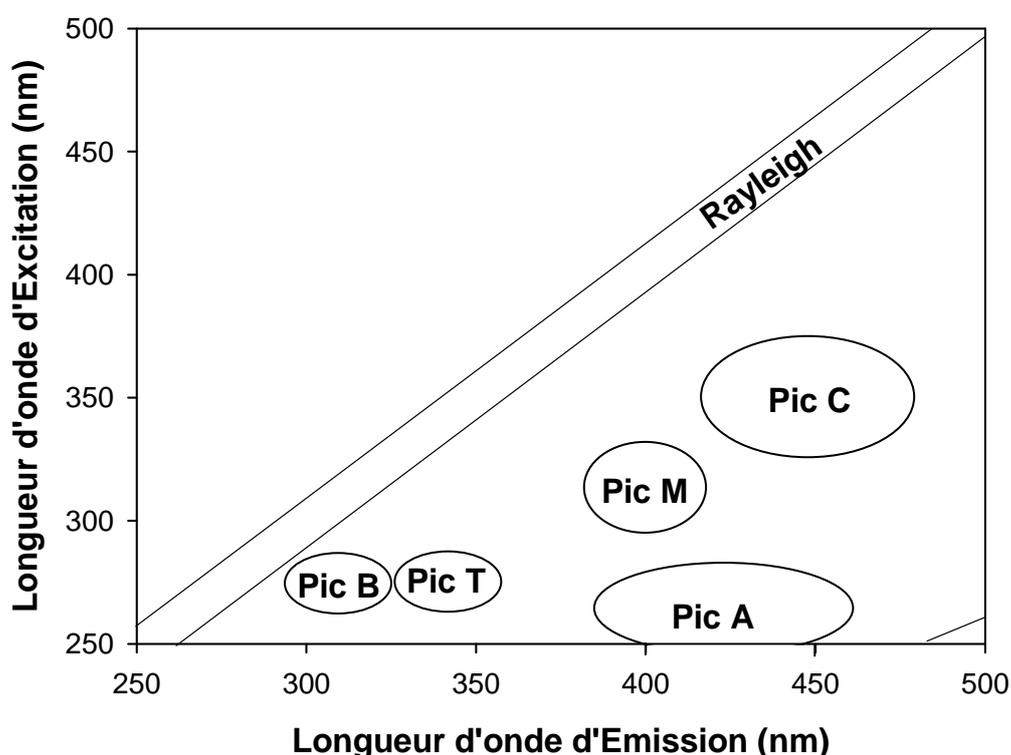


Figure IV-20 : Pics de fluorescence caractéristiques d'une MON marine définis par Coble P.G. (1996)

Afin de séparer les différents pics caractéristiques des échantillons analysés, un algorithme statistique de séparation de sources (PARAFAC ; Bro R., 1997) a été utilisé (Luciani X. *et al.*, 2008) afin de pouvoir définir les différentes composantes présentes dans les échantillons de 2007 et 2008. Les spectres de fluorescence 3D bruts et traités à l'aide de PARAFAC pour les échantillons de la colonne d'eau de 2008 sont présentés en annexe (**Annexe 6**).

Ainsi, après traitement simultané des spectres 3D obtenus pour les 2 campagnes de prélèvements, 3 composantes ont pu être isolées (**Figure IV-21**). Ces 3 composantes permettent de reconstituer au minimum 85 % du signal de fluorescence de tous les spectres 3D réalisés sur les 2 campagnes de prélèvements. Chacun d'eux est représentatif d'un ou plusieurs pics de fluorescence pouvant, souvent, être retrouvés dans la littérature.

Ainsi, la composante 1, formée de 2 pics d'intensités différentes, peut être décrite comme étant composée d'un premier pic avec une longueur d'onde d'excitation de 255-265 nm et d'émission de 450-470 nm, correspondant au pic « A » caractéristique de composés humiques

(Coble P.G., 1996 ; Luciani X. *et al.*, 2008 ; Parlanti E. *et al.*, 2000). Le deuxième pic quant à lui, est défini par une longueur d'onde d'excitation de 375-380 nm et d'émission de 460-465 nm, non décrit dans la littérature, mais tout de même proche du pic « C » observé pour des longueurs d'onde d'excitation de 350 nm.

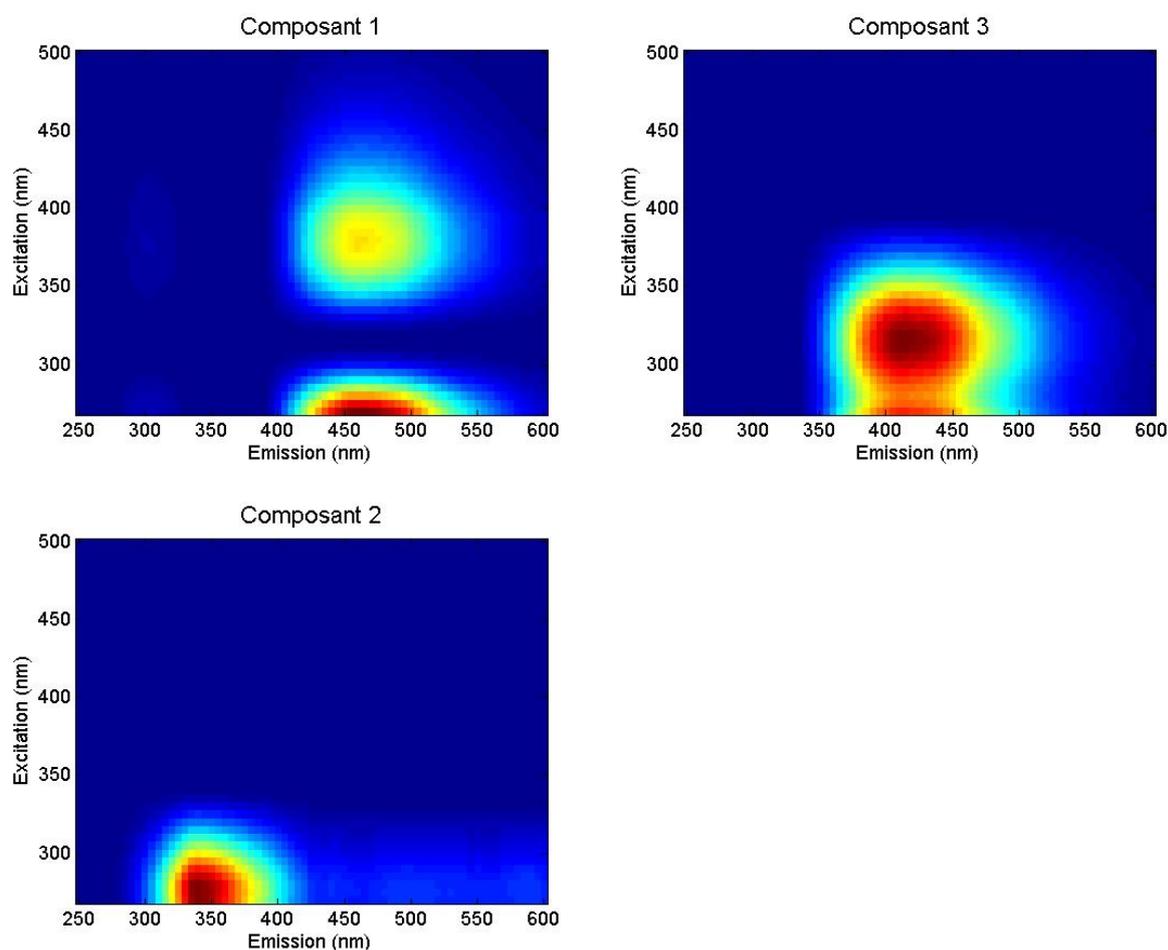


Figure IV-21 : 3 composantes isolées des spectres de fluorescence 3D obtenues après traitement simultané par PARAFAC des échantillons des 2 campagnes de prélèvements

La composante 2, quant à elle, est caractéristique d'un pic protéinique de type tryptophane (pic T, **Figure IV-20**) défini par une longueur d'onde d'excitation de 275-280 nm et d'émission de 335-345 nm (Coble P.G., 1996 ; Luciani X. *et al.*, 2008 ; Parlanti E. *et al.*, 2000) pouvant être le signe d'une activité bactérienne.

Enfin, la composante 3, définie par un pic avec une longueur d'onde d'excitation de 311-318 nm et d'émission de 408-420 nm est déjà connue sous le nom de pic « M » (Coble P.G., 1996 ; Luciani X. *et al.*, 2008 ; Parlanti E. *et al.*, 2000). Celui-ci, tout comme le pic « A », est caractéristique de composés humiques, mais décrit par Coble P.G. (1996) comme ayant plutôt une origine marine. L'origine de ce pic est cependant contredite par Luciani X. *et al.* (2008) qui observe ce même pic pour des eaux plutôt d'origine terrestre, ce qui est aussi le cas dans notre étude où l'on observe une très forte intensité de ce pic pour l'échantillon de la rivière Krka (**Figure IV-22**).

La répartition de ces 3 composantes sur les différents échantillons analysés, après correction de l'intensité de fluorescence observée par la concentration en carbone de l'échantillon (**Figure IV-22**), montre une plus forte intensité de fluorescence pour la composante 3 ; mais aussi, globalement, une plus forte fluorescence pour les échantillons les moins salins.

Le point de surface de 2007 « S05 2007 » montre bien une plus forte fluorescence, notamment pour la composante 3, que celui de surface de 2008 « S13 2008 », lui aussi prélevé à 20 cm de profondeur. Ceci tendrait donc à confirmer une plus forte activité biologique de surface observée en 2007. Cependant, les salinités étant différentes, il est nécessaire de raisonner et de comparer, encore une fois, plutôt les échantillons suivant leur salinité que leur profondeur.

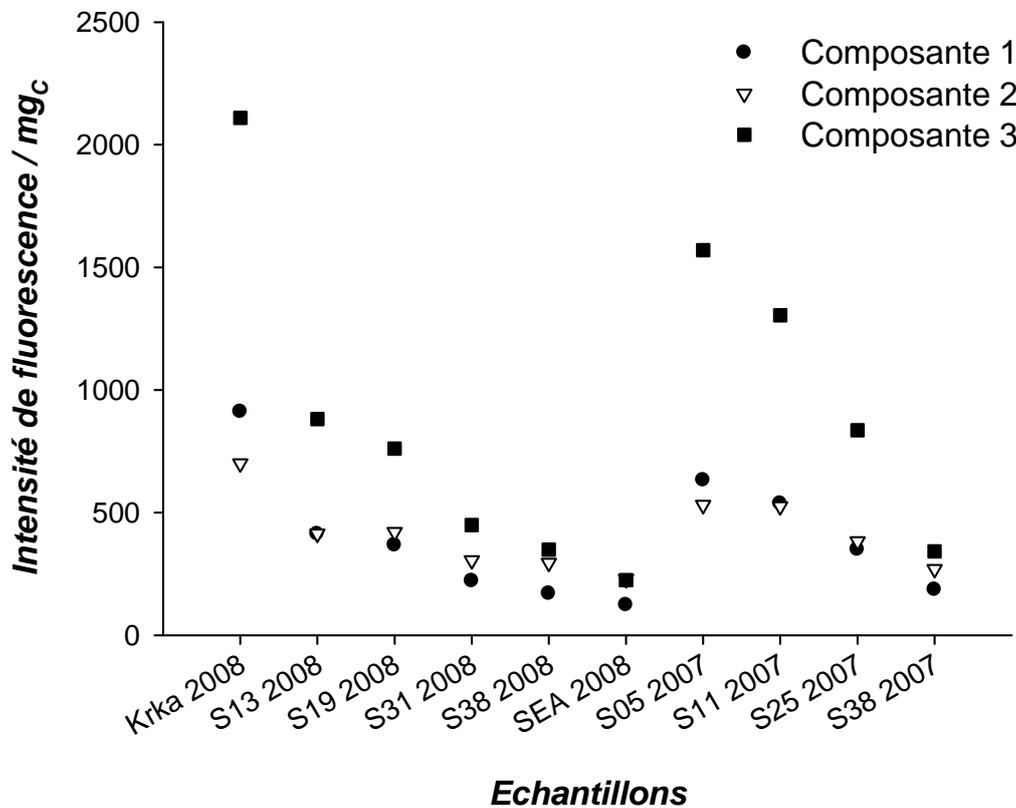


Figure IV-22 : Représentation des différents échantillons à partir des 3 composantes définies par PARAFAC corrigées du carbone

Ainsi, la **Figure IV-23** représente ces mêmes échantillons, mais en fonction de leur salinité. On peut remarquer que le point de salinité 5, correspondant au prélèvement de surface de 2007, ne sort pas ici significativement de la droite de dilution ; il est intéressant de noter que la composante 2, de type protéinique, ne montre pas d'augmentation montrant que l'activité biologique observée en surface en 2007 ne semble pas significativement influencer la qualité de la MOND fluorescente. Les trois différentes composantes suivent globalement leur droite de dilution (en pointillées), montrant une probable dilution de la matière organique fluorescente provenant de la rivière par de la MON marine peu fluorescente. Cependant, on peut tout de même souligner, le comportement quelque peu différent, des points situés dans la couche de mélange eau douce /eau marine, et notamment pour les composantes 1 et 3 qui présente des intensités de fluorescences globalement inférieures à la droite de dilution. Ceci tendrait à montrer une production de MOND non fluorescente dans l'estuaire, ce qui pourrait par exemple être la trace d'une exsudation phytoplanctonique qui se trouve être composée majoritairement de carbohydrates et de sucres de type aldose (Biersmith A. et Benner R., 1998). Ceci confirmerait aussi l'hypothèse avancée dans une partie précédente (**IVB1e**), où l'échantillon présent dans la couche intermédiaire serait donc bien physico-chimiquement différent de celui attendu pour une simple dilution de la MOND d'eau douce avec celle d'eau marine.

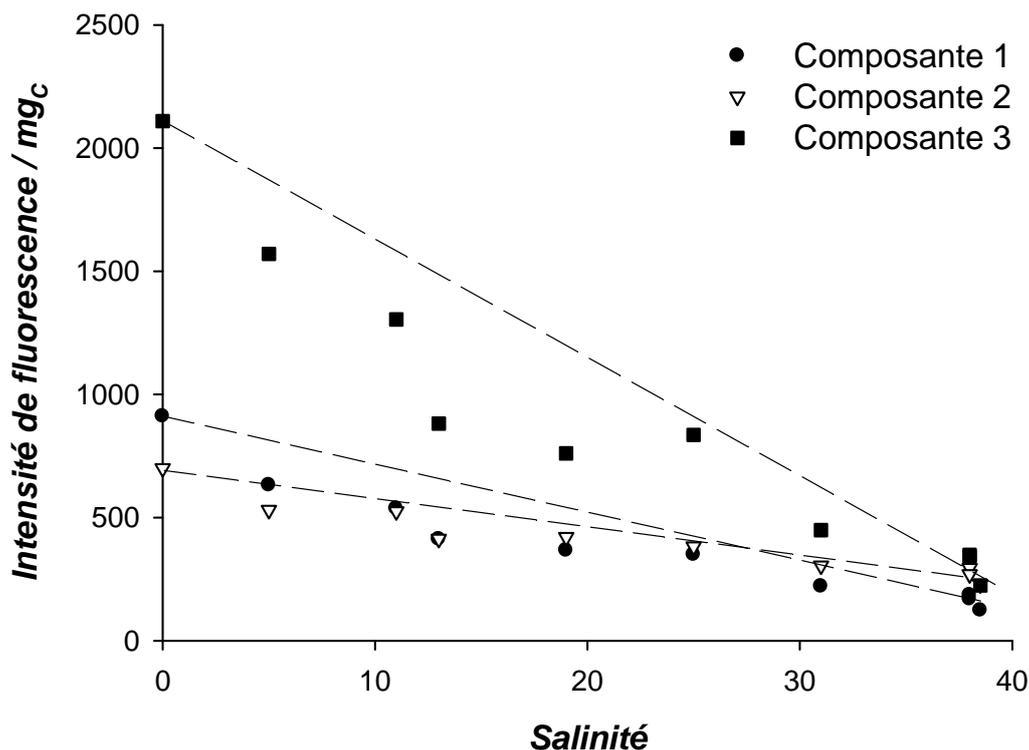


Figure IV-23 : Répartition des 3 différentes composantes corrigées du carbone en fonction de la salinité des échantillons

D'après ces observations, la majorité de la matière organique fluorescente présente dans tous les échantillons, serait donc principalement d'origine terrigène et subirait une dilution en arrivant dans l'estuaire. Si l'on norme les intensités de fluorescence observées par rapport au point de salinité 0 (figure non présentée), les composantes 1 et 3 varient exactement de la même manière, montrant que ces deux composantes sont liées ; ceci n'est pas surprenant dû au fait que ces 2 composantes présentent des pics de type humiques. Ainsi, d'un point de vue qualitatif, la MOND fluorescente paraît principalement être de type humique et d'origine terrigène avec aussi, mais en moindre proportion, une part correspondante à une partie protéinique, et qui serait elle aussi d'origine terrigène.

En se basant sur le pic « M », mis en évidence dans la composante 3, on peut dire que celui-ci ne paraît pas être forcément d'origine marine, comme proposé par Coble P.G. (1996), mais qu'il peut bien avoir une origine terrigène, comme observé par Luciani X. *et al.* (2008) sur des eaux douces Brésiliennes.

Il faut noter que l'absence de signature de MOND marine fluorescente ne signifie pas qu'il n'y en ait pas dans la MOND marine, mais simplement qu'il n'y a pas, ou très peu, de MOND fluorescente comparée à celle provenant de la rivière.

Ces observations, viennent appuyer le fait, que la matière organique d'origine terrigène présente plus de sites complexants et que ceux-ci seraient dilués par la MON d'origine marine, qui présente moins de sites complexants pour une même quantité de carbone. Il n'est donc pas surprenant que les constantes de complexation calculées, soient différentes entre les échantillons les plus marins et ceux de la rivière. Il est possible qu'au cours de la dilution de la MON terrigène dans l'eau marine, celle-ci subisse un changement de conformation pouvant probablement entraîner un changement de ses propriétés de complexations, mais aussi de ses propriétés de fluorescences.

IVC. Approche environnementale

IVC1. Modélisation des concentrations en cuivre libre dans la colonne d'eau suivant la contamination du milieu

Les paramètres de complexation, cinétiques et à l'équilibre, ayant été déterminés, ils vont maintenant être utilisés afin d'évaluer la capacité du système étudié à réagir à une éventuelle contamination du milieu. En effet en période estivale par exemple, il a été constaté que l'on pouvait aisément dépasser les 10 nM de cuivre total dissous (Omanović D., *et al.*, 2006), il est alors indispensable de modéliser la spéciation du cuivre dans ce milieu afin de pouvoir prédire, pour une concentration de cuivre totale donnée, quelle sera la réponse de la MOND, et ainsi quels niveaux de toxicité pourront être atteints. Pour ce faire, il est alors nécessaire de s'appuyer sur les propriétés de complexation de la MOND mises en évidence dans l'étude précédente, ainsi que les différentes concentrations de métal pouvant être présentes dans l'estuaire.

Les paramètres de complexation calculés à l'équilibre pour les échantillons de MOND de différentes profondeurs des campagnes de prélèvements de 2007 et 2008, ont donc été entrés dans un programme de calcul de spéciation chimique « MINEQL », avec des concentrations de cuivre dissous totales respectivement fixées à leurs concentrations naturelles, puis respectivement à 2, 10 et 50 nM. Les autres paramètres (pH, salinité, quantité de MOND) sont conservés identiques à ceux mesurés en 2007 et 2008. Ces concentrations en cuivre assez faibles, de l'ordre d'une dizaine de nano-molaires, peuvent assez facilement être atteintes localement en périodes estivales, comme en Juillet 2008, où des concentrations allant jusqu'à 15 nM de cuivre dissous total ont été rapportées pour le même point de prélèvement lors d'une nouvelle campagne de prélèvements en Juillet 2008 à Martinska.

Les figures suivantes (**Figure IV-24** et **Figure IV-25**) représentent, uniquement, les concentrations en cuivre libre (Cu^{2+}). Il est tout de même utile de rappeler ici, que les concentrations en cuivre labile, et donc potentiellement disponibles pour certaines espèces, peuvent quant à elles, être jusqu'à 100 fois supérieures à celles du cuivre libre pour la même concentration de cuivre total dissous.

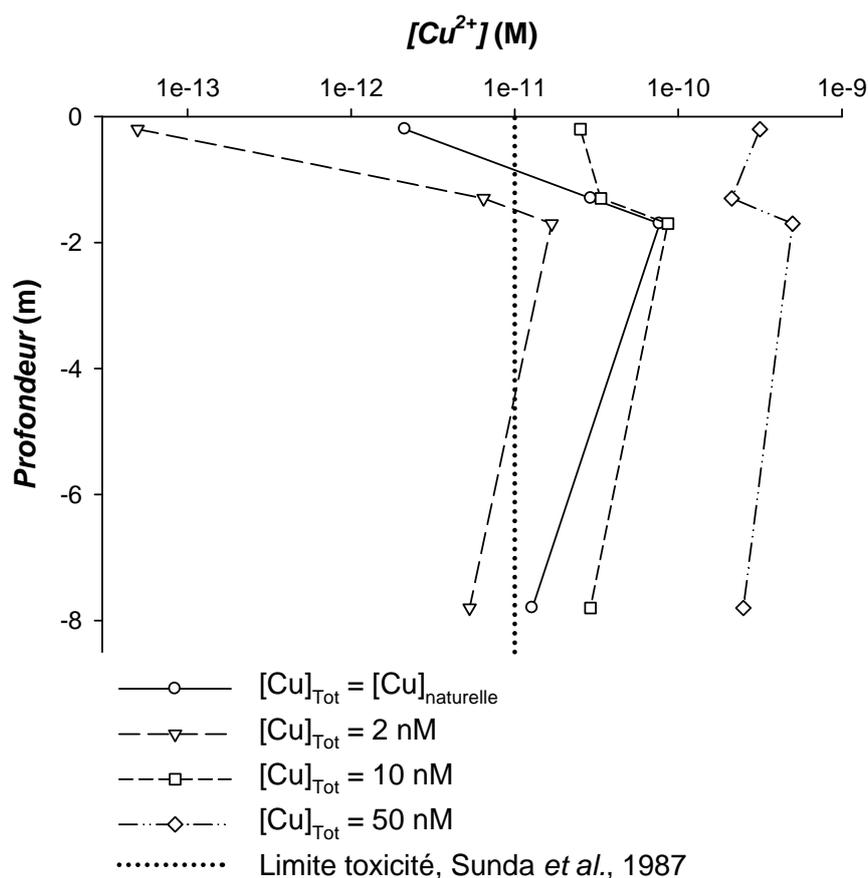


Figure IV-24 : Modélisation des concentrations en cuivre libre pouvant être rencontrées suivant les concentrations en cuivre totales présentes dans le milieu suivant les paramètres déterminés en 2007

La limite de toxicité de 1×10^{-11} M, indiquée sur ces graphiques, correspond à celle mise en évidence par Sunda W.G. *et al.* (1987) pour du phytoplancton estuarien.

On peut ainsi constater sur la **Figure IV-24** représentant les résultats d'une simulation pour le profil de 2007, que : dès 2 nM de cuivre total, la limite de toxicité peut être atteinte, principalement dans la zone de mélange où la MOND réagit peu à la présence du cuivre. En 2008 (**Figure IV-25**), pour cette même concentration en cuivre, la limite de toxicité n'est pas encore atteinte dans la zone de mélange, même si l'on s'en rapproche également, montrant une réactivité quelque peu différente de la MOND, principalement, due à la présence de sites forts pour les échantillons de 2008.

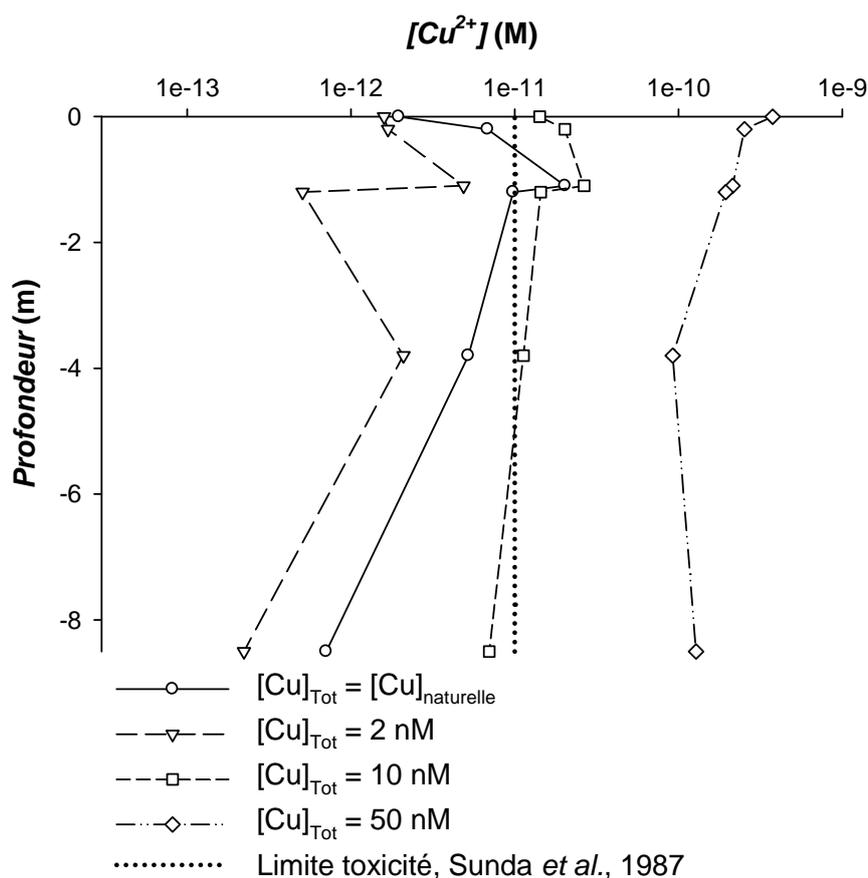


Figure IV-25 : Modélisation des concentrations en cuivre libre pouvant être rencontrées suivant les concentrations en cuivre totales présentes dans le milieu suivant les paramètres déterminés en 2008

Que ce soit pour 2007 ou 2008, les concentrations en cuivre libre initialement présentes dans la colonne d'eau sont globalement inférieures ou très proches de la limite de toxicité, mais dans la zone de mélange, où la quantité de cuivre totale était supérieure, cette limite se retrouve dépassée, pouvant alors présenter un risque de toxicité pour certaines espèces du milieu. Il n'est donc pas surprenant que pour des concentrations en cuivre légèrement supérieures, comme 10 nM ou même 50 nM, qui peuvent facilement être atteintes localement en périodes estivales, la limite de toxicité décrite par Sunda W.G. *et al.* (1987) soit plus ou moins largement dépassée. Ces modélisations montrent donc que la MOND présente en l'état, dans le milieu naturel, serait susceptible de ne pas pouvoir réagir à une soudaine contamination, même faible, pouvant intervenir, par exemple, en période estivale. C'est pourquoi, il est utile de savoir, d'un point de vue cinétique, les temps nécessaires à l'établissement d'un nouvel équilibre.

IVC2. Prédiction de la réactivité de la MOND, lors d'une contamination en cuivre

Comme nous venons de le voir, d'après Omanović D., *et al.* (2006), en période estivale les concentrations en cuivre total dans cet estuaire, notamment en surface, peuvent atteindre des concentrations supérieures à une dizaine de nano-molaires principalement due à l'activité de la marina.

En utilisant les paramètres cinétiques (L_{iT} , K_i^{equ} , k_i^1 et k_i^{-1}) obtenus dans notre étude de 2008, il est alors possible de prédire les variations de la spéciation du cuivre dans la colonne d'eau au cours du temps.

En s'appuyant sur les concentrations en cuivre mesurées dans la colonne d'eau par Omanović D., *et al.*, 2006 (**Figure IV-26,A**, croix), un nouveau profil de concentrations en cuivre a été établi (**Figure IV-26,A**, tirets) afin de faire correspondre à chaque point de 2008, une nouvelle concentration en cuivre (**Figure IV-26,A**, carrés) proche de celles qui ont pu être mesurées en période estivale. Globalement, les concentrations en cuivre rencontrées en période estivales atteignent environ 12 nM en surface de l'estuaire et 6 à 8 nM en profondeur. L'activité touristique engendre donc des changements notables des concentrations en cuivre dans la colonne d'eau.

Les constantes de stabilité ainsi que les concentrations en ligands calculées précédemment par l'approche cinétique, pour chaque échantillon, ont alors été introduites dans MINEQL afin de recalculer les concentrations en cuivre libre pour les nouvelles concentrations en cuivre (**Figure IV-26,B**, losanges vides), mais aussi celles de la campagne de 2008 (**Figure IV-26,B**, losanges pleins). Les concentrations en cuivre libre calculées pour le nouveau profil de concentration, représentatif d'une activité estivale, montrent qu'en surface de l'estuaire, toutes les concentrations en cuivre libre dépassent la limite de toxicité de 1.10^{-11} M définie par Sunda W.G. *et al.* (1987) contrairement aux valeurs mesurées en 2008. On peut tout de même remarquer, que malgré la concentration de 7 nM de cuivre présente dans la couche d'eau marine de l'estuaire, la concentration en cuivre libre reste en dessous de la limite de toxicité, ce qui montre la forte réactivité de la MOND marine.

Enfin, en utilisant les constantes cinétiques d'association et de dissociation, il a été calculé le temps de réaction nécessaire afin d'atteindre ce nouvel pseudo-équilibre (**Figure IV-27** et **Figure IV-26,C**).

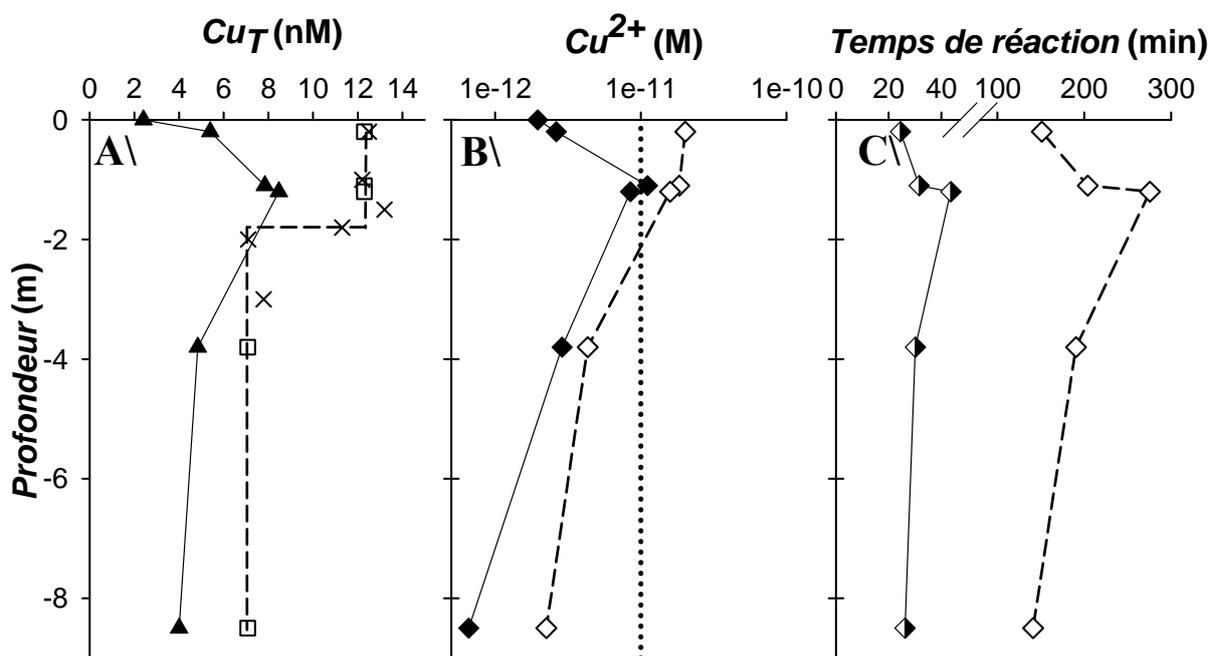


Figure IV-26 : A\ : Profils de concentrations en cuivre total pour la campagne de 2008 (triangles), celle de Omanović D., *et al.*, 2006 (croix), ainsi que le profil simulé (en tirets) à partir des profondeurs de 2008 (carrés). B\ : détermination des concentrations en cuivre libre pour 2008 (losanges pleins) et le profil simulé (losanges vides) ; limite de toxicité selon Sunda W.G. *et al.*, 1987 en pointillés. C\ : temps de réactions nécessaires afin de complexer 50% ($t_{50\%}$: losange à moitié vide) puis 99% ($t_{99\%}$: losange vide) du cuivre présent

Contrairement au programme d'optimisation développé sous Octave qui fitte les données sur une gamme de temps relativement courte (2h), dans cette application on a besoin de prédire la cinétique de complexation sur une plus large gamme de temps (30000s soit plus de 8h). La

fonction d'Octave sous Windows ne propose qu'un seul type de fonction d'intégration numérique qui s'est révélé problématique pour cette nouvelle configuration. Comme les codes Octaves et Matlab sont proches, on a reprogrammé un code sous Matlab (**Annexe 7**), avec l'aide du Dr. Redon R. (PROTEE), afin de bénéficier des différentes fonctions d'intégrations disponibles. La fonction ODE23s s'est trouvée être la plus satisfaisante afin d'intégrer les **Équation II-10** ou **Équation II-12** (suivant le nombre de ligands nécessaires).

En utilisant les paramètres cinétiques déterminés, et la nouvelle concentration en cuivre, le calcul effectué par MATLAB consiste à calculer les concentrations en cuivre labile en fonction du temps d'équilibre (0 à 30000 secondes, **Figure IV-27**) entre la concentration en cuivre labile initiale après une contamination en cuivre ($Cu_{equ1} + \Delta Cu_{Tot}$ sur la **Figure IV-27**) et celle à l'équilibre (Cu_{equ2}) atteinte après cette pollution, toutes 2 déterminables à l'aide des résultats obtenus par l'approche à l'équilibre. Les résultats obtenus permettent de calculer les temps de réactions pour lesquels la complexation est réalisée à 50% puis 99% (**Figure IV-27** et **Figure IV-26,C**). En terme de cinétique, les échantillons les plus rapides à atteindre l'équilibre sont ceux de surface et de profondeur. Le temps de demi réaction ($t_{50\%}$) pour ces échantillons est atteint en 25 minutes, et le pseudo-équilibre ($t_{99\%}$) est atteint en 2H30 (150 min). L'échantillon le plus long à atteindre l'équilibre est celui de la couche intermédiaire, avec un $t_{99\%}$ de 4h30, montrant la faible réactivité de la MOND de la couche interfaciale comparée à celle de l'eau de mer.

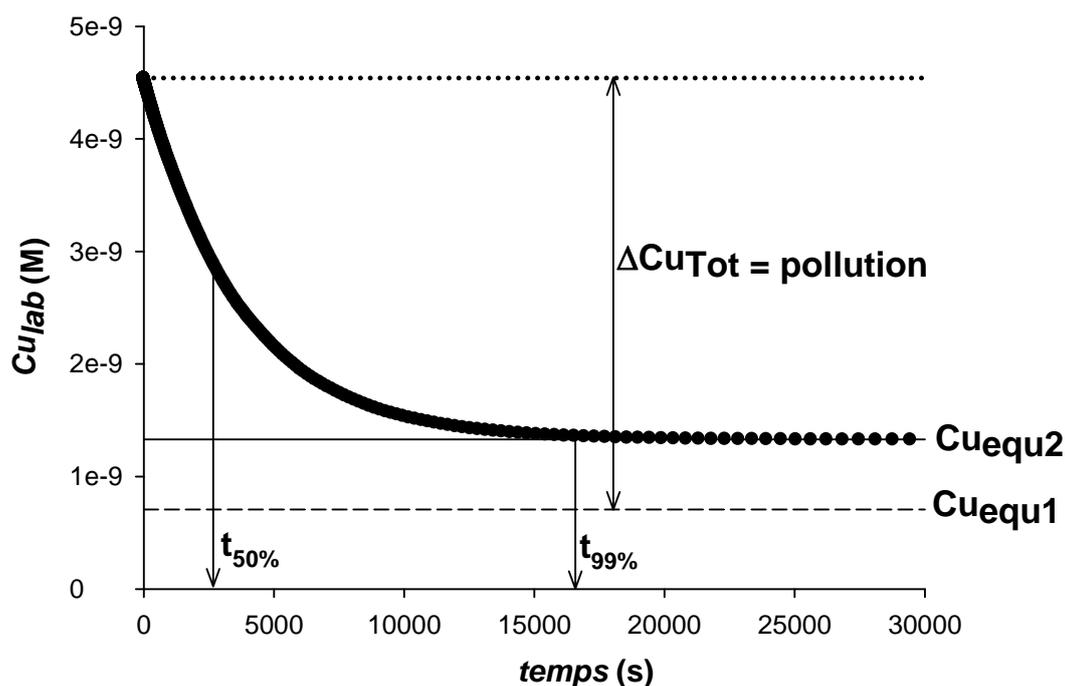


Figure IV-27 : Illustration de la prédiction cinétique de complexation lorsqu'un échantillon est soumis à une pollution métallique (ΔCu_{Tot}) ; Cu_{equ1} et Cu_{equ2} : respectivement concentration en cuivre labile à l'équilibre avant et après la pollution (calculées avec PROSECE). $t_{50\%}$ et $t_{99\%}$: temps au bout duquel respectivement 50% et 99% du cuivre est complexé ; échantillon de salinité 31 (2008)

L'échantillon de salinité 31 (profondeur -1,2m), comparé à celui de salinité 19 (profondeur -1,1m), présente une concentration en cuivre libre légèrement inférieure, mais un temps, afin d'atteindre l'équilibre, beaucoup plus long (**Figure IV-26,B** et **C**). Cette différence peut aisément s'expliquer par la présence d'un ligand fort (L_1) supplémentaire pour le point de salinité 31 (**Figure IV-12,A** et **B**) et par des constantes d'associations plus faibles pour le ligand faible de l'échantillon de salinité 31 (-1,2m).

Comparés aux variations hydrodynamiques se produisant dans ce type d'estuaire, ces temps d'équilibre relativement longs ne doivent pas être négligés. Il est probable que le système étudié ne se trouve donc pas à l'équilibre, particulièrement au niveau de la couche d'interfaciale où d'importantes transformations biogéochimiques sont susceptibles de se produire.

Jusqu'à maintenant, le système étudié a été considéré comme étant dans des conditions abiotiques, cependant, on pourrait supposer que le milieu naturel puisse s'adapter assez rapidement par différents moyens biologiques, afin de regagner un nouvel équilibre, qui lui, permettrait de revenir à des niveaux de métal libre moins toxiques. En effet, il a été démontré que certaines bactéries (Gordon A.S., *et al.*, 2000), certaines micro-algues (Gouvêa S.P., *et al.*, 2005) ou encore, certaines espèces de phytoplanctons (Lorenzo J.I., *et al.*, 2007), seraient en mesure d'excréter des ligands très complexants lorsqu'ils sont soumis à une augmentation du cuivre dans le milieu, pouvant alors tamponner la concentration en cuivre libre à des concentrations non toxiques pour la majorité des espèces du milieu.

Afin de pouvoir mieux appréhender ce qu'il se passe dans le milieu naturel, il serait donc nécessaire d'étudier le même système dans des conditions de pollutions plus fortes (comme en période estivales), avec un suivi de l'hydrodynamisme du profil vertical, ainsi qu'une meilleure résolution spatiale et temporelle.

C'est pourquoi une nouvelle campagne a été prévue en Juillet 2008 sur ce même estuaire avec plus de prélèvements sur la colonne d'eau, ainsi qu'un suivi détaillé des paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau et des conditions météorologiques.

IVC3. Analyse des résultats obtenus

Comme annoncé au début de l'étude sur ces échantillons estuariens, mis à part l'étude de l'estuaire lui-même, nous nous sommes posés la question de l'utilité d'une MOND marine modèle telle que celle déterminée dans le Chapitre III sur ce type d'échantillon.

Une modélisation a donc été réalisée grâce au logiciel MINEQL en intégrant les paramètres de complexations déterminés pour la MOND marine modèle, ainsi que les concentrations en carbone et en cuivre totales mesurées en 2008 dans l'estuaire. Afin d'avoir une meilleure représentativité des valeurs modélisées, il a aussi été calculé les concentrations en cuivre libre en tenant compte des erreurs obtenues sur les paramètres de complexation, que ce soit pour la MOND modèle ou les paramètres déterminés sur les échantillons de l'estuaire à partir du protocole simplifié.

Les concentrations en cuivre libre modélisées à partir de ces 2 approches sont représentées sur la **Figure IV-28**. On peut constater que, d'un point de vue environnemental, les résultats obtenus sont tout à fait différents. En effet, l'utilisation de la MOND marine modèle conduit globalement (sauf sur le point situé à -1,1m) à des concentrations en cuivre libres beaucoup plus fortes (cercles pleins, **Figure IV-28**), toutes situées au delà de la limite de toxicité de 1.10^{-11} M. De plus, l'utilisation de cette MOND modèle ne permet pas, non plus, de faire ressortir nettement la capacité des échantillons les plus marins à complexer le cuivre dans le milieu étudié.

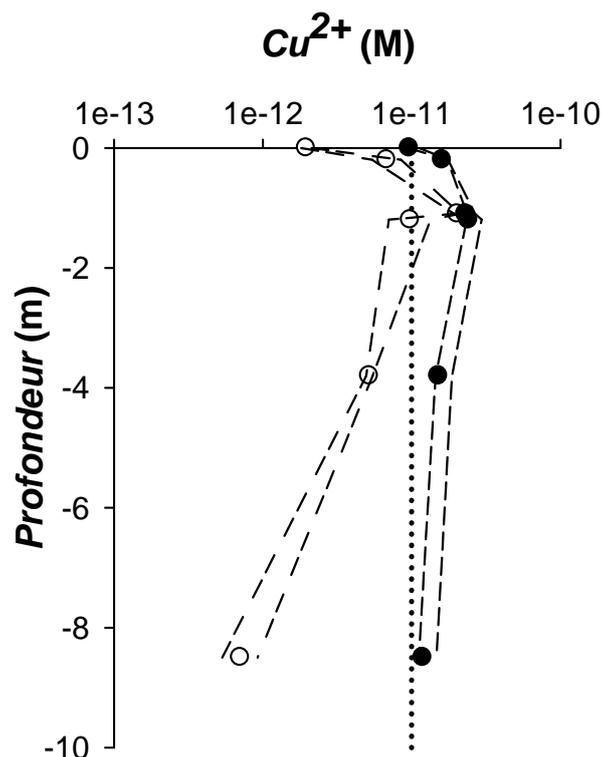


Figure IV-28 : Concentrations en cuivre libre modélisées à partir des paramètres de complexation de la MOND modèle déterminés dans le **Chapitre III** (cercles pleins) et celles modélisées à l'équilibre à partir du protocole simplifié ; les contours en tirets représentent les intervalles d'erreurs calculés et le trait pointillé la limite de toxicité définie par Sunda W.G. *et al.*, 1987

Dans la littérature, beaucoup d'études représentent la réactivité de la matière organique naturelle à l'aide des caractéristiques de MOND standards (Benedetti M.F. *et al.*, 1996, Benedetti M.F., 2006, Bryan S.E. *et al.*, 2002, Hamilton-Taylor J. *et al.*, 2002, Milne C.J. *et al.*, 2001), telles que celles intégrées aux modèles WHAM VI ou NICA-Donnan (Benedetti M.F. *et al.*, 1995, Kinniburgh D.G. *et al.*, 1996, Tipping E., 1994), déterminées le plus souvent à partir de MO extraite de sols. Les résultats de cette étude montrent que la compréhension du rôle de la MOND sur la distribution des éléments traces dans un système naturel peut difficilement se suffire de l'utilisation de ce type de MOND modèle, même si les caractéristiques de cette dernière ont été définies par l'étude d'une MOND provenant d'un écosystème similaire. Au contraire, il s'avère préférable de réaliser une étude détaillée d'échantillons représentatifs de l'écosystème tenant compte de ses principales variations (hydrodynamique, activité biologique, apports anthropiques, ...). Pour cela, il est nécessaire d'utiliser, pour chacun des échantillons de MOND, un protocole d'analyse et de modélisation adapté, tel que celui développé dans cette thèse.

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

Conclusions et perspectives

L'étude des interactions métaux traces – matière organique naturelle dissoute (MOND) en milieu marin et côtier n'est pas aisée à cause des faibles concentrations en métaux et en carbone (COD). Habituellement, la première étape pour pallier à cet état de fait, est d'utiliser une méthode de concentration. Toutefois, en milieu fortement salé, il n'est pas possible d'effectuer cette opération sans perte de matière conséquente. Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont porté sur l'étude d'échantillons marins concentrés, dans le cadre du groupement de recherche MONALISA (IFREMER), ainsi que sur des échantillons bruts provenant d'un estuaire Méditerranéen stratifié et peu contaminé.

Le travail réalisé est focalisé sur l'étude des interactions MOND-Cuivre, ce dernier étant représentatif des éléments en traces métalliques (ETM) potentiellement toxiques dans l'environnement.

Cette étude repose principalement sur l'utilisation de la technique voltamétrique de « Differential Pulse Anodic Stripping Voltametry » (DPASV). Cette technique analytique permet de mesurer des concentrations en cuivre labile (cuivre libre + espèces inorganiques), en milieu salin, sans interférence avec les chlorures contrairement à de nombreuses autres techniques, et de plus, avec de très faibles limites de détection ($LD < 0,1 \text{ nM}$).

De manière à balayer une gamme de concentration métallique suffisamment large pour déterminer les paramètres de complexation de la MOND pour des concentrations en carbone aussi basses que celles du milieu naturel, une titration par ajouts de métaux en mode logarithmique est utilisée. De plus, afin de mesurer uniquement le métal labile avec précision, la pseudopolarographie est un outil de choix dans cette étude, permettant de se placer à un potentiel de dépôt très précis, évitant de perdre une information sur une partie du métal pouvant être faiblement lié à la MOND.

Dans un premier temps, le travail a consisté en la mise au point d'un protocole d'analyse permettant de déterminer les propriétés de complexation d'une MOND représentative d'échantillons marins vis-à-vis du cuivre, mais aussi du calcium et du proton. Ceci permet au final de décrire des paramètres d'une MOND marine, pouvant être utilisée comme modèle dans des logiciels de calcul de spéciation, à l'image des modèles de MO existants pour représenter la matière organique du sol ou des rivières (modèles WHAM, NICA-Donnan, ...). La majeure partie du travail a servi à régler une multitude de problèmes analytiques (adsorption du système, ajouts précis de faibles volumes, évaporation de l'échantillon, adsorption de MON sur l'électrode de travail, traitement des signaux, détermination de la ligne de base, détermination de la sensibilité, ...), empêchant jusqu'à présent de travailler dans les conditions strictement naturelles.

Une importante avancée est apportée à la technique voltamétrique utilisée (DPASV), en mettant en place une étape électrochimique supplémentaire, permettant de désorber les substances actives de surfaces (SAS) fixées sur l'électrode de travail à la fin de l'étape de réduction. Ces substances, qui ne sont autres qu'une fraction de MON adsorbée à la surface de l'électrode, empêchent la réoxydation correcte du métal amalgamé dans l'électrode de mercure, induisant une déformation du signal. L'étape additionnelle mise en place, consiste à utiliser un potentiel très négatif ($-1,6 \text{ V}$) pendant une durée très brève (3 s) à la fin de l'étape de réduction, afin de désorber ces SAS qui ont une charge globale négative.

L'application systématique de cette étape permet, lors des mesures de propriétés complexantes, de fortement améliorer la détection du métal tout au long de la titration, mais

surtout, d'éliminer des phénomènes qui entraînent une surestimation des propriétés de complexation lors du traitement des données issues de la titration. Sans ce traitement, il est en effet démontré que les mesures de capacités complexantes se trouvent surestimées en présence de SAS, conduisant à des interprétations biaisées lors de l'utilisation de ces paramètres dans des logiciels de spéciation chimique appliqués à l'environnement.

Ce protocole de désorption des SAS peut être appliqué à d'autres techniques électrochimiques, comme la chronopotentiométrie, qui est connue comme étant une technique moins sensible aux phénomènes d'adsorption, et pour laquelle ce traitement permet tout de même d'améliorer significativement le signal obtenu en présence de SAS.

Le protocole mis en place, englobant (1) concentration (nanofiltration+osmose inverse) et purification (Chelex100) de l'échantillon, (2) analyses potentiométriques, voltamétriques et pseudopolarographiques et (3) traitements puis modélisations des données obtenues, a été appliqué sur une matière organique naturelle dissoute prélevée dans la petite rade de Toulon. Ce protocole appliqué sur un échantillon brut et concentré provenant du GDR MONALISA a permis à la fois de valider le protocole de caractérisation mis au point, mais aussi, le protocole de concentration mis en place dans le GDR. Le protocole de concentration utilisé a montré des pertes de MOND importantes durant les différentes étapes de concentration, mais les résultats ont montré que ces pertes n'entraînent pas de variations significatives de la réactivité de la MOND, par rapport à l'échantillon d'origine, indiquant que la fraction de MOND concentrée pourrait être celle qui joue un rôle primordial sur la complexation.

Le résultat majeur obtenu dans cette partie, outre la mise en place du protocole de caractérisation, a été la détermination de paramètres de complexation pour une MOND marine. Ces résultats, obtenus notamment grâce à des expériences de compétitions avec le proton et le calcium, qui ne sont pas réalisables sur un échantillon non concentré, viennent combler une lacune de la littérature actuelle concernant des valeurs de paramètres de complexation utilisables pour des MOND, et notamment des MOND marines. Les données ainsi obtenues, sont représentatives d'un échantillon de MOND marine et peuvent alors par la suite être utilisées, en temps que MOND marine modèle, dans des logiciels de modélisations, afin de prédire la spéciation métallique pour des échantillons principalement marins.

L'intégration des paramètres de complexation, déterminés pour la MOND marine modèle dans le cadre de ce travail, dans un logiciel de spéciation métallique (MINEQL) montre que le cuivre, pour la concentration de 14,8 nM mesurée dans cet environnement, se retrouve à plus de 80% complexé par la MOND du milieu, ce qui est un peu plus faible que les résultats de la littérature. On pourrait alors se demander si une partie des résultats rencontrés dans la littérature ne pourraient pas avoir été perturbés par l'existence de SAS. Il faut ajouter, que ce taux plus faible pourrait aussi s'expliquer par la faible concentration en carbone des milieux étudiés associée à des concentrations en cuivre non négligeables.

La technique voltamétrique de pseudopolarographie a également été utilisée, montrant la présence de cuivre sous 3 formes (libre/labile, complexé et réductible entre -0,3 V et -1,6 V, et les complexes électro-inactifs). Le pseudopolarogramme obtenu pour un échantillon est en quelque sorte une empreinte digitale de celui-ci. Ce type d'analyse, montrant une partie de la spéciation du cuivre, sans modifier l'échantillon, peut donc aussi être utilisé afin de comparer les échantillons entre eux et les caractériser suivant leurs formes différenciables électrochimiquement. Pour autant, il s'avère difficile d'en tirer des paramètres de complexation aptes à représenter le comportement de la MOND.

Un protocole de caractérisation simplifié a ensuite été mis en place, de manière à pouvoir être appliqué directement sur un échantillon naturel, peu concentré en carbone. Celui-ci est nécessaire afin d'éviter les étapes de concentration des échantillons naturels, responsables de pertes de MOND, et qui peuvent mener à de mauvaises déterminations des paramètres de complexation.

Cependant, l'utilisation d'un échantillon naturel marin, non concentré, ne permet pas encore de déterminer les propriétés des sites acides de la MOND, vu sa trop faible concentration. La détermination de ce type de site, pour un échantillon naturel marin, nécessiterait la mise en place d'un protocole potentiométrique adapté avec, par exemple, des volumes de titration beaucoup plus importants permettant d'avoir suffisamment de sites acides à titrer en solution. De même, ce type d'échantillon n'est pas non plus adapté à l'étude des phénomènes de compétition avec les cations majeurs divalents.

Ce protocole de caractérisation simplifié a été utilisé sur des MOND issues d'une colonne d'eau d'un estuaire stratifié, dans une zone connue comme étant très peu contaminée (Šibenik, Croatie) en métaux et oligotrophe. En mesurant des paramètres cinétiques de complexation au cours de la titration métallique, on a mis à profit les 2 heures d'équilibre nécessaires après chaque addition métallique pour étudier la vitesse de complexation. Cette approche novatrice est la seule permettant de pouvoir prédire la réactivité temporelle, dans des conditions naturelles, de la MOND du milieu. La comparaison des paramètres de complexation, déterminés à partir de l'approche cinétique et de l'approche à l'équilibre, a montré des résultats similaires, avec une légère différence sur les constantes de complexation, traduisant un faible biais existant entre les deux techniques.

Sur ces mêmes échantillons estuariens, des mesures de spectroscopie de fluorescence ont aussi été entreprises ; celles-ci ont montré un signal majoritairement d'origine terrigène de type humique et protéinique et diminuant avec l'augmentation de salinité. Les mesures montrent qu'il existe très peu de MON fluorescente d'origine marine comparé à la MON fluorescente mesurée dans la rivière.

La MOND présentant le plus de sites complexants, mais aussi des constantes de complexation plus faibles, dans l'estuaire de Šibenik, serait d'origine terrigène et / ou autochtone, contrairement à la MOND d'origine marine, qui présente moins de sites complexants, mais de plus fortes constantes de complexation, donc une plus grande spécificité vis-à-vis du cuivre.

La tendance observée sur les paramètres de complexation, dans cet estuaire, est inversée par rapport à la théorie pour une salinité croissante. En effet, si la MOND était issue principalement d'un apport terrigène, l'augmentation des effets de compétitions avec la salinité devrait entraîner une diminution de l'intensité de complexation lors du mélange. Il se produit donc, *in situ*, des modifications d'origines biologiques, qui nous laissent penser qu'il n'existe alors pas d'autres choix que de procéder à la caractérisation de la MOND effectivement présente dans la colonne d'eau, afin de pouvoir calculer la spéciation métallique dans ce milieu.

En effet, la comparaison (1) des prédictions réalisées à partir de la MOND marine modèle, en prenant en compte les concentrations en carbone, en cuivre et la salinité, mesurées dans le milieu étudié, (2) aux résultats de modélisation obtenus par l'utilisation du protocole de caractérisation simplifié appliqué à chaque échantillon de l'estuaire, montre des différences significatives. La MOND modèle sous-estime très nettement la concentration en cuivre labile, et donc, sa possible toxicité.

D'un point de vue plus environnemental, l'intégration des paramètres de complexation déterminés dans un logiciel de calcul de la spéciation métallique (MINEQL) a montré, que ce

soit pour l'échantillon de MOND marine concentrée étudié dans un premier temps, ou sur les échantillons estuariens, notamment à l'interface eau douce / eau marine, que même pour une très faible contamination de métal (10 nM), la concentration en métal libre (Cu^{2+}) peut s'avérer être potentiellement toxique pour le milieu. Des concentrations peuvent en effet par exemple atteindre 1.10^{-10} M dans la couche d'interface, ce qui est potentiellement toxique pour certaines espèces du milieu aquatique.

De plus, il a été montré que le temps nécessaire, après une contamination simulée, afin d'atteindre un nouvel équilibre, pouvait être assez long (2 à 5 heures). Ceci montre que les paramètres de complexation définis à l'équilibre doivent être complétés par des paramètres cinétiques pour comprendre, et donc prédire, le transport et/ou la spéciation des contaminants métalliques dans un environnement soumis, par exemple, à des variations hydrodynamiques rapides.

Il faut noter que les protocoles de caractérisation mis au point peuvent être transposés à l'étude d'autres métaux comme le cadmium, le plomb ou encore le zinc, qui sont facilement mesurables en DPASV. Ces protocoles pourraient aussi être transposés, moyennant peu de modifications, à d'autres techniques électrochimiques comme la chronopotentiométrie, voire d'autres outils analytiques comme le quenching de fluorescence. Le développement d'outils *in-situ* passifs (par exemple les DGT) ou actifs (par exemple les microélectrodes), étant en plein essor, il serait également intéressant de comparer ces différentes approches, notamment en ce qui concerne la compréhension de la cinétique de complexation.

Le protocole simplifié pourrait encore être optimisé de manière à pouvoir d'une part, traiter plus rapidement un grand nombre d'échantillons. Pour se faire, il serait nécessaire de mieux gérer les temps d'équilibre nécessaires après chaque ajout de métal lors de la titration, de manière à ne pas attendre plus de temps que nécessaire. D'autre part, le temps d'accumulation pourrait, lui aussi, être optimisé de manière à pouvoir plus précisément déterminer les pics, pour de faibles concentrations en métaux, sans toutefois perdre sur la largeur de la fenêtre analytique dû à une saturation plus rapide de l'électrode de travail.

De même, la technique de pseudopolarographie utilisée afin de déterminer des potentiels de dépôt très précis, adaptés à l'échantillon étudié, peut être modifiée afin de balayer une fenêtre plus réduite correspondante uniquement au métal étudié, ce qui permettrait encore de diminuer la durée du protocole utilisé.

Un autre aspect, très gourmand en temps, qui nécessiterait d'être amélioré, concerne le traitement des données avant leur modélisation, et notamment le fitting des voltamogrammes. En effet, actuellement ils sont traités l'un après l'autre manuellement à l'aide d'un tableur. Il serait donc intéressant de pouvoir automatiser, au moins en partie, le système afin de laisser par exemple à l'expérimentateur, juste le choix de valider la détermination du pic sur chaque voltamogramme.

Contrairement à ce qui est couramment fait dans la littérature pour étudier des MO, d'eaux de rivières ou de sols, il est ressorti de cette étude qu'il est difficile d'utiliser un modèle de MOND unique, même si ce dernier a été défini dans un milieu proche du milieu d'étude, pour comprendre le rôle de la MOND sur la distribution des ETM dans un environnement complexe tel qu'un estuaire. Il est alors recommandé d'utiliser un protocole adapté, comme celui mis en place dans cette étude, afin de déterminer directement les paramètres de complexation à partir des échantillons naturels, même peu concentrés en MOND.

Liste des Figures

Figure I-1: Cycle des métaux traces dans l'environnement aquatique (Branica M., 1990).....	12
Figure I-2 : Schéma représentatif de la répartition des différentes tailles de particules dans le milieu aquatique ; séparation du dissous et du particulaire à 0,45 μm	18
Figure I-3 : Détermination de la Capacité complexante selon la méthode de Chau	21
Figure I-4 : Distribution continue (bimodales) et discrète (6 sites)	23
Figure I-5: Comparaison schématique des interactions d'un groupement fonctionnel d'une MON avec différents cations, représentées par N ligands ou une seule quasi-particule non spécifique à N paramètres (Garnier C., 2004).....	25
Figure I-6 : Représentation schématique simplifiée du logiciel PROSECE d'après Garnier C. (2004)	26
Figure I-7 : Schéma de l'appareillage utilisé en DPASV avec le système d'ajout à 3 burettes permettant de couvrir une large gamme de concentration métallique	32
Figure I-8 : Représentation schématique de la cellule électrochimique décrivant les principaux composants du système en rapport avec celle-ci.....	33
Figure I-9 : Etape de pré-concentration du métal sur l'électrode de travail (SMDE).....	35
Figure I-10 : Etape de ré-oxydation du métal fixé sur l'électrode de travail (SMDE)	36
Figure I-11 : Représentation schématique des caractéristiques du signal de DPASV utilisé, 1/ Amplitude, 2/ durée de l'impulsion, 3/ temps entre les impulsions, 4 et 5/ points de mesures de l'intensité du courant	36
Figure I-12 : Construction d'un pseudopolarogramme avec I (nA) l'intensité du pic d'oxydation du métal considéré ; E_{dep} (V) le potentiel de dépôt ou d'accumulation imposé durant l'étape de pré-concentration ; E_{scan} (V) le potentiel de balayage couramment utilisé dans les mesures de DPASV	39
Figure I-13 : Représentation schématique de l'appareillage utilisé en potentiométrie	42
Figure II-1 : Montage utilisé pour diviser le flux d'azote en 2 en amont du stand de polarographie afin de limiter l'évaporation de l'échantillon par bullage dans de l'eau milliQ	48
Figure II-2 : Système d'ajout Initial avec le volume mort comblé par des billes en Téflon.....	49
Figure II-3 : Système d'ajout numéro 2 avec les tubes d'ajout en décalé pour éviter la contamination causée par la burette la plus concentrée sur les autres	50
Figure II-4 : Système d'ajout numéro 3 avec à nouveau les billes téflon et les tubes d'ajout décalés	51
Figure II-5 : Pompes (burettes) XE 1000 (TECAN) munies de seringues de 100 ou 500 μl utilisées pour les ajouts en mode logarithmique en voltamétrie	52
Figure II-6 : Différence observée sur le courant capacitif (mesuré à -0,6V) en fonction du potentiel d'accumulation (E_{acc}) utilisé pour l'échantillon du Gapeau (salinité 35) avec un temps d'accumulation de 60 s. (1) sans et (2) avec 1 seconde à -1,6V à la fin du potentiel d'accumulation (avec -1,6V utilisé comme potentiel de référence ou l'adsorption est mineure). (3) échantillon passé aux UV sans 1 s à -1,6V. Encart : Evolution du courant capacitif en fonction du temps d'accumulation : (1) $E_{\text{acc}} = -0,6 \text{ V}$; (2) $E_{\text{acc}} = -0,6 \text{ V}$ et $E_{\text{acc}} = -1,6 \text{ V}$ pendant 1 s; (3) $E_{\text{acc}} = -1,6 \text{ V}$. Paramètres : $F = 75,12 \text{ Hz}$, $t_{\text{mod}} = 0,21 \text{ s}$, $t_{\text{int}} = 0,61 \text{ s}$, angle de phase = 90°	55
Figure II-7 : DPAS voltamogrammes du cuivre dans l'échantillon du Gapeau (salinité 35) obtenus avec les paramètres expérimentaux suivants : (1) $t_{\text{acc}} = 300 \text{ s}$ à $E_{\text{acc}} = -0,45 \text{ V}$; (2) $t_{\text{acc}} = 300 \text{ s}$ à $E_{\text{acc}} = -1,6 \text{ V}$; (3) $t_{\text{acc}} = 297 \text{ s}$ à $E_{\text{acc}} = -0,45 \text{ V}$ et $t_{\text{acc}} = 3 \text{ s}$ à $E_{\text{acc}} = -1,6 \text{ V}$	56

Figure II-8 : Pseudopolarogrammes du cuivre obtenus pour un échantillon d'eau de mer sans (courbes 1) et avec (courbes 2) l'étape de désorption à -1,6V pendant 3 secondes. Sont exprimés en ordonnée : la hauteur du pic (a), le potentiel du pic (b) et la largeur à mi hauteur du pic (c). Le temps de dépôt est de $t_{acc}=300$ s. La courbe en trait plein dans la Figure (a) correspond au pseudopolarogramme du zinc réalisé dans un second échantillon (le courant du pic du zinc a été normalisé de façon à pouvoir être comparé à celui du cuivre).....	59
Figure II-9 : Courbes de titration d'une eau estuarienne pour la détermination de la capacité complexante sans (courbes 1) et avec (courbes 2) l'étape de désorption à -1,65V. Temps d'accumulation total $t_{acc}=300$ s, $E_{acc} = -0,5$ V, Etape de désorption $E_{acc} = -1,65$ V. Sur la figure « a » représentant l'intensité du signal mesurée en fonction du métal ajouté, la courbe 3 correspond au ratio de la hauteur de pic de la courbe 2 sur la courbe 1. La figure « b » représente le potentiel du pic de ré-oxydation et la figure « c » sa largeur à mi-hauteur.....	61
Figure II-10 : Modélisation d'une ligne de base pour les voltammogrammes. 1) partie polynomiale, 2) partie polynomiale + exponentielle.....	64
Figure II-11 : Exemple de déconvolution d'un voltammogramme afin d'en extraire l'aire du ou des pics caractéristiques de l'espèce étudiée. Exemple avec 2 pics de cuivre.....	65
Figure II-12 : Schéma de fonctionnement du programme de résolution des équilibres cinétiques.....	71
Figure II-13 : Exemple de résultats de cinétique obtenus pour un échantillon estuarien (Šibenik, Croatie) de Salinité 31 en 2008 pour des ajouts métalliques allant de 10 à environ 150 nM de métal total présent en solution. Les courbes tracées représentent les fitting associés à chacune des courbes cinétiques expérimentales.....	73
Figure II-14 : Protocole d'analyse mis en place pour l'analyse d'une MOND marine.....	76
Figure III-1 : Point de prélèvement de l'échantillon utilisé dans cette étude.....	81
Figure III-2 : Pseudopolarogrammes du cuivre et du zinc obtenus pour l'échantillon de MOND marine concentrée sans addition de métal. pH = 8,3, E_{dep} de -1,6 à -0,02V par pas de 20 mV, $t_{dep} = 360$ s.....	84
Figure III-3 : Pseudopolarogrammes du cuivre obtenus pour des pH de 8.3 (symboles vides) et 4 (symboles pleins) à des concentrations de cuivre naturel (courbes 1) puis pour des ajouts de 4 et 8 μ M (resp. courbes 2 et 3). a) pseudopolarogrammes bruts avec en tirets les valeurs de métal attendues en l'absence de complexation (sans MON), b) normalisation à la valeur de cuivre total.....	85
Figure III-4 : a) Pseudopolarogrammes du cuivre de la Figure III-3 normés au premier point, pH de 8.3 (symboles vides) et 4 (symboles pleins) à des concentrations de cuivre naturel (courbes 1) puis pour des ajouts de 4 et 8 μ M (resp. courbes 2 et 3), b) potentiels du pic de cuivre, c) largeur du pic de cuivre à mi-hauteur.....	88
Figure III-5 : a) Pseudopolarogrammes bruts du zinc pour des pH de 8,3 (symboles vides), 4 (symboles pleins) et 2 (symboles bicolores) à des concentrations de cuivre naturel (symboles ronds) puis pour des ajouts de 4 et 8 μ M de cuivre (resp. symboles carrés et losanges), b) variation du potentiel du pic de zinc, c) largeur du pic de zinc à mi-hauteur.....	90
Figure III-6 : Courbe de titrage potentiométrique de l'échantillon de MOND marine concentrée (cercles vides, $COD=1,2\text{mmol}_C.L^{-1}$) comparée à celle théorique de l'eau milliQ (trait plein).....	92
Figure III-7 : Titration potentiométrique de l'échantillon de MOND marine concentrée ($COD=1,2\text{mmol}_C.L^{-1}$) représenté par la variation du nOH (expérimental-théorique) en fonction du pH.....	93

Figure III-8 : Courbe de titration potentiométrique (cercles pleins) de l'échantillon de MOND marine concentrée ($\text{COD}=1,2\text{mmol}_C.L^{-1}$), et son Fitting par PROSECE (trait plein) pour 4 types de sites acides, croix = erreur sur le fitting en chaque point de la courbe expérimentale	94
Figure III-9 : Pseudopolarogrammes obtenus par DPASV pour des concentrations en cuivre ajoutées à l'échantillon de MOND marine concentrée ($\text{pH}= 8,2$; $\text{COD}=1,2\text{mmol}_C.L^{-1}$) inférieures à $20 \mu\text{M}$, représentés en fonction de l'intensité du pic normalisée en % (équivalent à la fraction de cuivre électro-labile mesurée pour un coefficient de diffusion des espèces labiles supposé constant) en fonction du potentiel de dépôt utilisé ($T_{\text{dep}} = 297\text{sec}$ à $E_{\text{acc}} + 3\text{sec}$ à $-1,6\text{V}$)	95
Figure III-10 : Proportions de cuivre électro-labile de l'échantillon de MOND marine concentrée ($\text{pH}= 8,2$; $\text{COD}=1,2\text{mmol}_C.L^{-1}$) en fonction du logarithme de la concentration de cuivre ajoutée ($T_{\text{dep}} = 297\text{sec}$ à $E_{\text{dep}} + 3\text{sec}$ à $-1,6\text{V}$) pour 2 potentiels de dépôt (cercles vides : $E_{\text{dep}}=-0,5\text{V}$; cercles pleins : $E_{\text{dep}}=-1,5\text{V}$; triangles : différence de concentration entre ces 2 potentiels de dépôt)	97
Figure III-11 : Expérience d'ajout logarithmique et fitting obtenu pour l'échantillon marin concentré ; $E_{\text{dep}} = -0,5\text{V}$; $\text{pH} = 8,2$; $\text{COD} = 1,2\text{mmol}_C.L^{-1}$	98
Figure III-12 : Fractions de cuivre labile par rapport au cuivre total ajouté et leurs fitting correspondants pour l'échantillon de MOND concentrée en fonction : a) de la concentration de calcium ajoutée pour une concentration de cuivre totale de $12,5\mu\text{M}$, $\text{pH} = 8,2$; b) du pH pour une concentration totale de cuivre de $4\mu\text{M}$. La valeur de 100% en ordonnée représente le cuivre total en solution	99
Figure III-13 : Comparaison de 2 ajouts logarithmiques menés à deux potentiels de dépôts différents ($-0,5\text{V}$ en points noirs et $-1,5\text{V}$ en points blancs et leur fitting associé en traits pointillés ; en encart : erreur sur le fitting pour les 2 expériences)	102
Figure III-14 : Expérience d'ajout logarithmique menée sur un échantillon naturel non-concentré ($\text{COD} = 0,09 \text{mmol}_C.L^{-1}$) filtré à $0,45\mu\text{m}$ et passé uniquement sur résine Chelex100 et sa courbe modélisée par MINEQL suivant les paramètres obtenus sur l'échantillon concentré. $\text{pH} = 8,2$; Salinité 37	103
Figure III-15 : Spéciation du cuivre en fonction du pH simulée par MINEQL dans des conditions naturelles pour une eau marine en utilisant les paramètres optimisés à partir de l'expérience sur l'échantillon concentré	104
Figure IV-1: Points de prélèvements réalisés sur l'estuaire de la Krka (Croatie).....	109
Figure IV-2 : Profil de salinité mesuré sur le terrain lors de la campagne d'Avril 2007 (croix) et Mars 2008 (triangles) sur l'Estuaire de la Krka (Croatie). Les points extremum situés sur la courbe de 2008 correspondent aux 2 prélèvements supplémentaires prélevés en amont et en aval du point de prélèvement de la colonne d'eau.....	112
Figure IV-3 : Profil de carbone organique dissous des campagnes de prélèvements d'Avril 2007 (croix) et Mars 2008 (triangles) sur l'Estuaire de la Krka (Croatie). Les points extremum situés sur la courbe de 2008 correspondent aux 2 prélèvements supplémentaires prélevés en amont et en aval du point de prélèvement de la colonne d'eau.....	113
Figure IV-4 : Courbe de dilution du NPOC suivant la salinité pour tous les points des campagnes de prélèvements d'Avril 2007 (croix) et Mars 2008 (triangles), $r^2= 0,9681$	114
Figure IV-5 : Profil de concentrations en cuivre total pour les campagnes de prélèvements d'Avril 2007 (croix) et Mars 2008 (triangles) sur l'Estuaire de la Krka (Croatie)	115

Figure IV-6 : Courbes paraboliques caractéristiques de la concentration en cuivre dissout totale (CuTot) suivant la salinité pour les points des campagnes de prélèvements d'Avril 2007 (croix et courbe en trait plein) et Mars 2008 (triangles et courbe en tirets). En pointillé : droite de dilution attendue pour un mélange conservatif. Cercles pleins : Données mesurées sur le site « E4a » en Mai 1988 (Elbaz-Poulichet F. <i>et al.</i> , 1991).....	116
Figure IV-7 : Pseudopolarogrammes obtenus pour une concentration en cuivre total de 100 nM normés à l'intensité du pic obtenue pour le potentiel de dépôt de -1,6V. $T_{dep} = 297$ sec + 3 sec à -1,6V. Echantillons de la campagne de prélèvements de 2007.....	117
Figure IV-8 : Titration logarithmique du cuivre sur l'échantillon de salinité 13 de 2008. A\ Fitting (trait plein) à l'équilibre des points expérimentaux (carrés) avec en pointillés la droite de non complexation. B\ Fitting (trait plein) cinétique des points expérimentaux (cercles pleins) pour la 9 ^{ème} addition de métal. Droite en tirets : métal total ; carrés : valeurs utilisées pour la titration à l'équilibre ; triangle : estimation du Cu_{labile} à $t=0$ s d'équilibre	118
Figure IV-9 : Influence du temps de stabilisation sur la mesure de capacité complexante, échantillon Sea Šibenik 2008 pour 2h ou 5 minutes de temps d'équilibre après chaque ajout de métal	119
Figure IV-10 : Modélisation du comportement d'une constante d'équilibre dans un gradient de salinité.....	122
Figure IV-11 : Variation de la constante de complexation $\log K_{CuL_2}$ selon la charge du site impliqué dans la complexation, exemple donné sur les constantes obtenues en 2008	123
Figure IV-12 : Concentrations en échelle logarithmique (A\) et constantes de stabilité (B\) en fonction de la profondeur pour les ligands forts (cercles) et faibles (triangles) pour les campagnes de 2007 (symboles vides) et 2008 (symboles pleins) ; (A\) courbe pointillée: salinité mesurée en 2008 ; courbe pleine: $\Sigma L_{IT}=f(\text{profondeur})$ pour 2008 ; C\ : Fraction de cuivre inorganique (carrés) et organique (croix) en fonction de la profondeur pour les échantillons de 2008 ; en encart : concentrations en cuivre libre et limite de toxicité en pointillés selon Sunda <i>et al.</i> , 1987. La zone barrée représente la couche interfaciale	125
Figure IV-13 : Courbes d'ajout log de l'échantillon de salinité 19 naturel de 2008, de l'échantillon synthétisé à partir des échantillons de la Krka et de l'eau de mer, et d'un échantillon théorique simulé avec MINEQL.	128
Figure IV-14: Courbe d'ajout log de l'échantillon de salinité 19 synthétique de 2008 modélisé avec 3 ligands dont les concentrations en ligands ont été fixées par celles des échantillons Krka et eau de mer, chacune divisées par 2 ; seuls les 3 $\log K$ sont modifiés lors du fitting	129
Figure IV-15 : Constantes cinétiques d'association $\log k_i^1$ et de dissociations $\log k_i^{-1}$ obtenues pour les échantillons de 2007 (triangles et croix vides) et 2008 (triangles et croix pleines). Sites forts représentés par des croix et sites faibles par des triangles.....	131
Figure IV-16 : Comparaison des résultats obtenus par l'approche à l'équilibre et cinétique (avec 2 techniques de modélisation cinétiques différentes) dans le cas de l'échantillon de salinité 38 (-3,8m) de 2008	133
Figure IV-17 : Comparaison des paramètres de complexations obtenues par l'approche cinétique (en ordonné) et à l'équilibre (en abscisse) pour 2007 (symboles vides) et 2008 (symboles pleins) et pour les ligands forts (cercles) et faibles (triangles)	135
Figure IV-18 : Exemple de courbes cinétiques obtenues à faible (a) et à fort (b) ratio $[M]/[L]$; échantillon de salinité 13, ajouts de métal 6 et 15.....	136
Figure IV-19 : Influence de la détermination du cuivre labile à $t = 0$ sur les mesures de cinétiques.....	137
Figure IV-20 : Pics de fluorescence caractéristiques d'une MON marine définis par Coble P.G. (1996).....	138

Figure IV-21 : 3 composantes isolées des spectres de fluorescence 3D obtenues après traitement simultané par PARAFAC des échantillons des 2 campagnes de prélèvements....	139
Figure IV-22 : Représentation des différents échantillons à partir des 3 composantes définies par PARAFAC corrigées du carbone	140
Figure IV-23 : Répartition des 3 différentes composantes corrigées du carbone en fonction de la salinité des échantillons.....	141
Figure IV-24 : Modélisation des concentrations en cuivre libre pouvant être rencontrées suivant les concentrations en cuivre totales présentes dans le milieu suivant les paramètres déterminés en 2007	143
Figure IV-25 : Modélisation des concentrations en cuivre libre pouvant être rencontrées suivant les concentrations en cuivre totales présentes dans le milieu suivant les paramètres déterminés en 2008	144
Figure IV-26 : A\ : Profils de concentrations en cuivre total pour la campagne de 2008 (triangles), celle de Omanović D., <i>et al.</i> , 2006 (croix), ainsi que le profil simulé (en tirets) à partir des profondeurs de 2008 (carrés). B\ : détermination des concentrations en cuivre libre pour 2008 (losanges pleins) et le profil simulé (losanges vides) ; limite de toxicité selon Sunda W.G. <i>et al.</i> , 1987 en pointillés. C\ : temps de réactions nécessaires afin de complexer 50% ($t_{50\%}$: losange à moitié vide) puis 99% ($t_{99\%}$: losange vide) du cuivre présent	145
Figure IV-27 : Illustration de la prédiction cinétique de complexation lorsqu'un échantillon est soumis à une pollution métallique (ΔCu_{Tot}) ; Cu_{equ1} et Cu_{equ2} : respectivement concentration en cuivre labile à l'équilibre avant et après la pollution (calculées avec PROSECE). $t_{50\%}$ et $t_{99\%}$: temps au bout duquel respectivement 50% et 99% du cuivre est complexé ; échantillon de salinité 31 (2008).....	146
Figure IV-28 : Concentrations en cuivre libre modélisées à partir des paramètres de complexation de la MOND modèle déterminés dans le Chapitre III (cercles pleins) et celles modélisées à l'équilibre à partir du protocole simplifié ; les contours en tirets représentent les intervalles d'erreurs calculés et le trait pointillé la limite de toxicité définie par Sunda W.G. <i>et al.</i> , 1987.....	148

Liste des Tableaux

Tableau I-1: Concentrations de quelques éléments traces dans la couche terrestre, une roche magmatique et une roche sédimentaire. Les unités sont en $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Alloway B.J. et Ayres D.C., 1993 ; Vignati D., 2004)	10
Tableau I-2 : Principales techniques voltamétriques utilisées pour les analyses de métaux traces et leurs fenêtres analytiques. v = vitesse de balayage du Potentiel; DE = Pulse amplitude; f = Fréquence; t_d = temps de Pré-concentration ; i_p = Courant du pic; E_p = Potentiel du pic (Buffle J. et Tercier-Waeber M.-L., 2005).....	30
Tableau I-3 : Procédure utilisée pour les mesures de cuivre sur des échantillons d'eau de mer à pH naturel	37
Tableau I-4 : Exemple de titration utilisée pour 20 ml d'échantillon, permettant de couvrir une large gamme analytique allant du nano molaire au micro molaire en 17 ajouts.....	41
Tableau II-1 : Concentration en ligand [L] et constante de stabilité apparente K' vis-à-vis du cuivre obtenues pour une eau estuarienne avec et sans l'étape de désorption	62
Tableau III-1 : Concentrations et constantes de complexation des 4 sites acides optimisés pour le fitting des données expérimentales.....	93
Tableau III-2 : Densité de sites complexants et leur constante de stabilité (envers le cuivre, le calcium et le proton) définis pour 2 quasi-particules L_{M1} et L_{M2} après un fitting simultané par PROSECE des 3 expériences (titration métallique, variation de la concentration de calcium et du pH)	100
Tableau IV-1 : Concentrations en carbone organique dissous mesurées sur les campagnes de prélèvements de l'estuaire de Šibenik en 2007 et 2008	113
Tableau IV-2 : Valeurs des paramètres de complexation obtenues pour 2 temps de stabilisation (2 heures et 5 minutes) après ajout de métal. Dupliquats réalisés sur 2 appareils différents à 1 mois d'intervalle	120
Tableau IV-3 : Comparaison des propriétés de complexations des échantillons Krka, eau de mer et salinité 19 naturel, synthétique et théorique.....	129

Bibliographie

- Achterberg E.P. and Braungardt C., 1999. Stripping voltammetry for the determination of trace metal speciation and in-situ measurements of trace metal distributions in marine waters, *Analytica chimica acta*, 400, 381-397.
- Ahel M., Barlow R.G., Mantoura R.F.C., 1996. Effect of salinity gradients on the distribution of phytoplankton pigments in a stratified estuary, *Marine ecology progress series*, 143, 289-295.
- Akinlua A., Torto N., Ajayi T.R., Oyekunle J.A.O., 2007. Trace metals characterisation of Niger delta kerogens, *Fuel*, 86, 1358-1364.
- Alloway B.J. and Ayres D.C., 1993. Chemical principles of environmental pollution, *Chapman & Hall*, London, ISBN 0 75140 013 0, pp 291.
- Aluwihare L.I., Repeta D.J., Chen R.F., 1997. A major biopolymeric component to dissolved organic carbon in surface sea water, *Nature*, 387, 166-169.
- Anderson D.M. and Morel F.M.M., 1978. Copper sensitivity of *Gonyaulax tamarensis*, *Limnology and Oceanography*, 23, 283-295.
- Andrade S., Moffett J.W., Correa J.A., 2006. Distribution of dissolved species and suspended particulate copper in an intertidal ecosystem affected by copper mine tailings in northern Chile, *Marine Chemistry*, 101, 203-212.
- Aoustin E., Schafer A.I., Fane A.G., Waite T.D., 2001. Ultrafiltration of natural organic matter, *Separation and Purification Technology*, 22-23, 63-78.
- Bard A.J. and Faulkner L.R., 1983. Electrochimie Principes, méthodes et applications, *Masson, Paris*, ISBN 2 225 78595 3, pp 791.
- Benedetti M.F., Milne C.J., Kinniburgh D.G., Van Riemsdijk W.H., Koopal L.K., 1995. Metal ion binding to Humic Substances: Application of the Non-Ideal Competitive Adsorption Model, *Environmental Science and Technology*, 29, 446-457.
- Benedetti M.F., Van Riemsdijk W.H., Koopal L.K., Kinniburgh D.G., Goody D.C., Milne C.J., 1996. Metal ion Binding by natural organic matter: From the model to the field, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60, 2503-2513.
- Benedetti M.F., 2006. Metal ion binding to colloids from database to field systems, *Journal of Geochemical Exploration*, 88, 81-85.
- Benner R., Pakulski J.D., Mccarthy M., Hedges J.I., Hatcher P.G., 1992. Bulk chemical characteristics of dissolved organic-matter in the ocean, *Science*, 255, 1561-1564.
- Benner R., 2002. Chemical composition and reactivity, In: *Hansell D.A., Carlson C.A. (Eds), Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*, Academic Press, pp 774.
- Bersier P. M., Howell H., Bruntlett C., 1994. Advanced electroanalytical techniques versus atomic absorption spectrometry, inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry in environmental analysis, *Analyst*, 119, 219-233.
- Biddanda B. and Benner R., 1997. Carbon, nitrogen and carbohydrate fluxes during the production of particulate and dissolved organic matter by marine phytoplankton, *Limnology Oceanography*, 42, 506-518.
- Biersmith A. and Benner R., 1998. Carbohydrates in phytoplankton and freshly produced dissolved organic matter, *Marine Chemistry*, 63, 131-144.

- Bonacci O., Jukić D., Ljubenković I., 2006. Definition of catchment area in karst: case of the river Krka and Krka, Croatia, *Journal of Hydrological Sciences*, 51, 682-699.
- Boussemart M., Menargues L., Benaim J., 1993. Anodic Stripping Voltammetry of Copper in natural waters: a qualitative approach to the additional peak(s) occurrence, *Electroanalysis*, 5, 125-133.
- Boutier B., Chiffolleau J.F., Auger D., Truquet I., 1993. Influence of the Loire river on dissolved lead and cadmium concentrations in coastal waters of Brittany, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 36, 133-145.
- Branica G., 1990. Environmental Research in Aquatic Systems, *Scientific Series of the International Bureau*, 3, Forschungszentrum Jülich GmbH, ISBN 3 89336 053 0, pp 766.
- Branica G. and Lovrić M., 1997. Pseudopolarography of totally irreversible redox reactions, *Electrochimica Acta*, 42, 1247-1251.
- Bro R., 1997. PARAFAC. Tutorial and applications, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 38, 149-171.
- Bruland K.W., Donat J.R., Hutchins D.A., 1991. Interactive influences of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters, *Limnology Oceanography*, 36, 1555-1577.
- Bruland K.W., Rue E.L., Donat J.R., Skrabal S.A., Moffett J.W., 2000. Intercomparison of voltammetric techniques to determine the chemical speciation of dissolved copper in a coastal seawater sample, *Analytica Chimica Acta*, 405, 99-113.
- Bruland K.W. and Lohan M.C., 2004. Controls of trace metals in seawater. In: H.D. Holland, K.K. Turekian (Eds.), *Treatise on geochemistry (vol. 6)*, Elsevier Pergamon, pp. 23-47.
- Bryan S.E., Tipping E., Hamilton-Taylor J., 2002. Comparison of measured and modelled copper binding by natural organic matter in freshwaters, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 133, 37-49.
- Bubić S. and Branica M., 1973. Voltammetric characterization of ionic state of cadmium present in seawater, *Thalassia Jugoslavia*, 9, 47-53.
- Buck T.K.N. and Bruland K.W., 2005. Copper speciation in San Francisco Bay: A novel approach using multiple analytical windows, *Marine Chemistry*, 96, 185- 198.
- Buffle J., 1981. Calculation of the surface concentration of the oxidized metal during the stripping step in the anodic stripping techniques and its influence on speciation measurements in natural waters, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 125, 273-294.
- Buffle J., Vuilleumier J.J., Tercier M.L., Parthasarathy N., 1987. Voltammetric study of humic and fulvic substances V. Interpretation of metal ion complexation measured by anodic stripping voltammetric methods, *The Science of the Total Environment*, 60, 75-96.
- Buffle J., 1988. Complexation reaction in Aquatic Systems - analytical approach, *Ellis Horwood series Limited in analytical chemistry*, Chichester, England, ISBN 0 85312 557 0, pp 692.
- Buffle J. and Tercier-Waeber M.-L., 2005. Voltammetric environmental trace-metal analysis and speciation: from laboratory to *in situ* measurements, *Trends in Analytical Chemistry*, 24, 172-191.
- Cabaniss S.E. and Shuman M.S., 1988. Copper binding by dissolved organic matter: I. Suwannee river fulvic acid equilibria, *Geochimica Cosmochimica Acta*, 52, 185-193.

- Carlson C.A., 2002. Production and removal processes. In : *Hansell D.A., Carlson D.A. (Eds), Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter, Academic Press, St. Louis, MO, 91-151.*
- Castilla J.C., 1996. Copper mine tailing disposal in northern Chile rocky shores: *Enteromorpha compressa* (Chlorophyta) as a sentinel species, *Environmental Monitor Assessment* 40, 171-184.
- Cauwet G., 1991. Carbon inputs and biogeochemical processes at the halocline in a stratified estuary : Krka River, Yugoslavia, *Marine Chemistry*, 32, 269-283.
- Chakraborty P., Fasfous I.I., Murimboh J., Chakrabarti C.L., 2007. Simultaneous determination of speciation parameters of Cu, Pb, Cd and Zn in model solutions of Suwannee River fulvic acid by pseudopolarography, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388, 463-474.
- Chau Y.K. and Lum-Shue-Chan K., 1974. Determination of labile and strongly bound metals in lake water, *Water Research*, 8, 383-388.
- Chau Y.K., Gachter R., Lum-Shue-Chan K., 1974. Determination of the apparent Complexing Capacity of Lake Water, *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 31, 1515-1519.
- Chaumeton H., Asselborn E., Chiappero P.-J., Galvier J., 1987. Les minéraux, *Guide Vert*, Solar, ISBN 2 263 01164 1, pp 384.
- Cheng T., and Allen H.E., 2006. Comparison of zinc complexation properties of dissolved natural organic matter from different surface waters, *Journal of Environmental Management*, 80, 222-229.
- Chester R., 2000. Marine Geochemistry, *Blackwell science, Oxford*, ISBN 0 632 05432 8, pp 506.
- Coale K.H. and Bruland K.W., 1988. Copper complexation in the Northeast Pacific, *Limnology and Oceanography*, 33, 1084-1101.
- Coble P.G., 1996. Characterization of marine and terrestrial Dom in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy, *Marine Chemistry*, 51, 325-346.
- Contreras L., Medina M.H., Andrade S., Oppliger V., Correa J.A., 2007. Effects of copper on early developmental stages of *Lessonia nigrescens* Bory (Phaeophyceae), *Environmental Pollution*, 145, 75-83.
- Corvasce M., Zsolnay A., D'Orazio V., Lopez R., M. Miano T., 2006. Characterization of water extractable organic matter in a deep soil profile, *Chemosphere*, 62, 1583-1590.
- Croot P.L., Moffett J.W., Luther III G.W., 1999. Polarographic determination of half-wave potentials for copper-organic complexes in seawater, *Marine Chemistry*, 67, 219-232.
- Croué J.P., Benedetti M.F., Violleau D., Leenheer J.A., 2003. Characterization and copper binding of humic and non humic organic matter isolated from the South Platte river: evidence for the presence of nitrogenous binding site, *Environmental Science and Technology*, 37, 328-336.
- Cuculić V. and Branica M., 1996. Adsorption of trace metals from sea-water onto solid surfaces: Analysis by anodic stripping voltammetry, *The Analyst*, 121, 1127-1131.
- Cukrov N., Cmok P., Mlakar M., Omanović D., 2008. Spatial distribution of trace metals in the Krka River, Croatia: An example of the self-purification, *Chemosphere*, 72, 1559-1566.
- Davies C.M., Apte S.C., Johnstone A.L., 1998. A bacterial bioassay for the assessment of copper bioavailability in freshwaters, *Environmental Toxicology and Water Quality*, 13, 263-271.

- Denant V., Saliot A., Mantoura R.F.C., 1991. Distribution of algal chlorophyll and carotenoid pigments in a stratified estuary: the Krka River, Adriatic Sea, *Marine Chemistry*, 32, 285-297.
- De Schamphelaere K.A.C., Unamuno V.I.R., Tack F.M.G., Vanderdeelen J., Janssen C.R., 2005. Reverse osmosis sampling does not affect the protective effect of dissolved organic matter on copper and zinc toxicity to freshwater organisms, *Chemosphere*, 58, 653-658.
- Decker H., Schweikardt T., Nillius D., Salzbrunn U., Jaenicke E., Tucek F., 2007. Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases, *Gene*, 398, 183-191.
- Ding Y-X., Chin W-C., Verdugo P., 2007. Development of a fluorescence quenching assay to measure the fraction of organic carbon present in self-assembled gels in seawater, *Marine Chemistry*, 106, 456-462.
- Domingos R.F., Benedetti M.F., Croué J.P., Pinheiro J.P., 2004. Electrochemical methodology to study labile trace metal/natural organic matter complexation at low concentration levels in natural waters, *Analytica Chimica Acta*, 521, 77-86.
- Donat J. and Van Den Berg C.M.G., 1992. A new cathodic stripping voltammetric method for determining organic copper complexation in seawater, *Marine Chemistry*, 38, 69-90.
- Druffel E.R.M., Williams P.M., Bauer J.E., Ertel J.R., 1992. Cycling of Dissolved and Particulate Organic Matter in the Open Ocean, *Journal of Geophysical Research*, 97, 15639-15659.
- Dudal Y. and Gérard F., 2004. Accounting for natural organic matter in aqueous chemical equilibrium models: a review of the theories and applications, *Earth-Science Reviews*, 66, 199-216.
- Duffus J.H., 2002. "Heavy Metals"- A meaningless term?, (IUPAC Technical Report), *Pure and Applied Chemistry*, 74, 793-807.
- Dzombak D.A., Fish W., Morel F.M.M., 1986. Metal-Humate interactions. 1: Discrete ligand and continuous distribution models, *Environmental Science and Technology*, 20, 669-675.
- Eggleton J. and Thomas K.V., 2004. A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events, *Environment International*, 30, 973-980.
- Elbaz-Poulichet F., Guan D.M., Martin J-M., 1991. Trace metal behaviour in a highly stratified Mediterranean estuary: the Krka (Yugoslavia), *Marine Chemistry*, 32, 211-224.
- European Community, 1989. *Journal Officiel Communautés Européenne*, 55, 11-145.
- Fasfous I.I., Yapici T., Murimboh J., Hassan N.M., Chakrabarty C.L., Back M.H., 2004. Kinetics of trace metal competition in the freshwater environment: Some fundamental characteristics, *Environmental Science and Technology*, 38, 4979-4986.
- Fernandez F., Colon C., Duran A., Barajas R., d'Ors A., Becerril M., Llopis J., Paje S.E., Saez-Puche R., Julian I., 1998. The Y₂BaCuO₅ oxide as green pigment in ceramics, *Journal of Alloys and Compounds*, 275-277, 750-753.
- Fichet D., Radenac G., Miramand P., 1998. Experimental studies of impacts of harbour sediments resuspension to marine invertebrates larvae: Bioavailability of Cd, Cu, Pb, and Zn and toxicity, *Marine Pollution Bulletin*, 36, 509-518.
- Filella M., 2008. Freshwaters: which NOM matters?, *Environmental chemistry letters*, 6, Novembre 2008 DOI 10.1007/s10311-008-0158-x.

- Fish W., Dzombak D.A., Morel F.M.M., 1986. Métal-Humate interactions. 2: Application and comparison of models, *Environmental Science and Technology*, 20, 676-683.
- Flores-Veles L.M., Ducaroir J., Jaunet A.M., Robert M., 1996. Study of the distribution of copper in an acid sandy vineyard soil by three different methods, *European Journal of Soil Science*, 47, 523-532.
- Fogg C.E. and Westlake D.F. 1955. The importance of extracellular products of algae in freshwater, *Proceedings of the International Association of Theoretical and Applied Limnology*, 12, 219-232.
- Garnier C., Pižeta I., Mounier S., Cuculić V., Benaïm J.Y., 2005. An analysis of distinguishing composite dissolved metal-ligand systems measurable by stripping voltammetry, *Analytica Chimica Acta*, 538, 263-271.
- Garnier C., 2004, Modélisation et évaluation des équilibres de complexation entre la matière organique naturelle, les métaux traces et le proton. Application aux eaux naturelles, *Thèse de Doctorat* du 12 juillet 2004, Université du Sud Toulon-Var, pp 200.
- Garnier C., Mounier S., Benaïm J.Y., 2004a. Metal logarithmic scale titration as a tool for complexing ligand distribution determination: an application by DPASV, *Environmental Technology*, 25, 589-599.
- Garnier C., Pižeta I., Mounier S., Benaïm J.Y., Branica M., 2004b. Influence of the type of titration and of data treatment methods on metal complexing parameters determination of single- and multi-ligand systems measured by stripping voltammetry, *Analytica Chimica Acta*, 505, 263-275.
- Garnier C., Mounier S., Benaïm J.Y., 2004c. Influence of dissolved organic carbon content on modelling natural organic matter acid-base properties, *Water Research*, 38, 3685-3692.
- Gašparović B., Plavšić M., Bošković N., Čosović B., Reigstad M., 2007. Organic matter characterization in Barents Sea and eastern Arctic Ocean during summer, *Marine Chemistry*, 105, 151-165.
- Gondar D., Thacker S.A., Tipping E., Baker A., 2008. Functional variability of dissolved organic matter from the surface water of a productive lake, *Water Research*, 42, 81-90.
- Gonzalez J.L., Thouvenin B., Dange C., Fiandrino A., Chiffolleau J.F., 2001. Modeling of Cd speciation and dynamics in the Seine estuary (France), *Estuaries*, 24, 1041-1055.
- Gordon A.S., Donat J.R., Kango R.A., Dyer B.J., Stuart L.M., 2000. Dissolved copper-complexing ligands in cultures of marine bacteria and estuarine water, *Marine Chemistry*, 70, 149-160.
- Gouvêa S.P., Vieira A.A.H., Lombardi A.T., 2005. Copper and cadmium complexation by high molecular weight materials of dominant microalgae and of water from a eutrophic reservoir, *Chemosphere*, 60, 1332-1339.
- Gun J., Salaün P., Van den Berg C.M.G., 2006. Advantages of using a mercury coated, micro-wire, electrode in adsorptive cathodic stripping voltammetry, *Analytica Chimica Acta*, 571, 86-92.
- Guthrie J.W., Hassan N.M., Salam M.S.A., Fasfous I.I., Murimboh C.A., Murimboh J., Chakrabarti C.L., Grégoire D.C., 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, 205-218.
- Hamilton-Taylor J., Postill A.S., Tipping E., Harper M.P., 2002. Laboratory measurements and modelling of metal-humic interactions under estuarine conditions, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 66, 403-415.

- Hansell D.A. and Carlson C.A., 2002. Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter, *Academic Press, St. Louis, M.O.*, ISBN 0 12323 841 2, pp 774.
- Hansell D.A., 2002. DOC in the global carbon cycle, *In: Hansell D.A., Carlson C.A. (Eds), Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter, Academic Press, St. Louis, M.O.*, 685-711.
- Hedges J.I., 1988. Polymerization of humic substances in natural environments. *In: Frimmel F.H., Christman R.F. (Eds.), Humic substances and their role in the environment, John Wiley & Sons, Chichester*, 45-58.
- Hedges J.I., 1992. Global biogeochemical cycles: progress and problems, *Marine Chemistry*, 39, 67-93.
- Her N., Amy G., Chung J., Yoon J., Yoon Y., 2008. Characterizing dissolved organic matter and evaluating associated nanofiltration membrane fouling, *Chemosphere*, 70, 495-502.
- Hering J.G. and Morel F.M.M., 1989. Slow coordination reactions in seawater, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 53, 611-618.
- Heyrovsky J. and Kuta J., 1966. Principles of polarography, Prague, Pub, *House of Czechoslovak Academy of Sciences, Academic Press, New York*, ISBN 0 12346 650 4, pp 581.
- Hirose K., 1994. Conditional stability constants of metal complexes of organic ligands in sea water: past and present, and a simple coordination chemistry model, *Analytica Chimica Acta*, 284, 621-634.
- Hirose K., 2006. Chemical Speciation of Trace Metals in Seawater: a Review, *Analytical Sciences*, 22, 1055-1063.
- Hirose K., 2007. Metal–organic matter interaction: Ecological roles of ligands in oceanic DOM, *Applied Geochemistry*, 22, 1636-1645.
- Honeychurch K.C., Hawkins D.M., Hart J.P., Cowell D.C., 2002. Voltammetric behaviour and trace determination of copper at a mercury-free screen-printed carbon electrode, *Talanta*, 57, 565-574.
- Huang Z.L. and Failla M.L., 2000. Copper Deficiency Suppresses Effector Activities of Differentiated U937 Cells, *The Journal of Nutrition*, 130, 1536-1542.
- Hunter K.A. and Liss P.S., 1981. Organic sea surface films. *In: E. K. Duursma, R. Dawson (Eds.), Marine organic chemistry, Elsevier, Amsterdam*, 259-298.
- Imai A., Fukushima T., Matsushige K., Kim Y-H., Choi K., 2002. Characterization of dissolved organic matter in effluents from wastewater treatment plants, *Water Research*, 36, 859-870.
- Ineris, 2005. Cuivre et ses dérivés, *Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques*, INERIS –DRC-02-25590-02DF54, pp 66.
- Jiang W., Liu D., Liu X., 2001. Effects of copper on root growth, cell division, and nucleolus of *Zea mays*, *Biologia Plantarum*, 44, 105-109.
- Kang K-H., Shin H.S., Park H., 2002. Characterization of humic substances present in landfill leachates with different landfill ages and its implications, *Water Research*, 36, 4023-4032.
- Karlsson J. and Eklund B., 2004. New biocide-free anti-fouling paints are toxic, *Marine Pollution Bulletin*, 49, 456-464.
- Kieber R.J., Hydro L.H., Seaton P.J., 1997. Photooxidation of triglycerides and fatty acids in seawater: implication toward the formation of marine humic substances, *Limnology Oceanography*, 44, 1454-1462.

- Kim S., Simpson A.J., Kujawinski E.B., Freitas M.A., Hatcher P.G., 2003. High resolution electrospray ionization mass spectrometry and 2D solution NMR for the analysis of DOM extracted by C18 solid phase disk, *Organic Geochemistry*, 34, 1325-1335.
- Kinniburgh D.G., Milne C.J., Benedetti M.F., Pinheiro J.P., Filius J., Koopal L.K., Van Riemsdijk W.H., 1996. Metal ion binding by humic acid: Application of the NICA-Donnan Model, *Environmental Science and Technology*, 30, 1687-1698.
- Kinniburgh D.G., Van Riemsdijk W.H., Koopal L.K., Borkovec M., Benedetti M.F., Avena M.J., 1999. Ion binding to natural organic matter: competition, heterogeneity, stoichiometry and thermodynamic consistency, *Colloids and surfaces A*, 151, 147-166.
- Kogut M.B. and Voelker B.M., 2001. Strong copper binding behavior of terrestrial Humic Substances in seawater, *Environmental Science and Technology*, 35, 1149-1156.
- Konstantinou I.K. and Albanis T.A., 2004. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review, *Environment International*, 30, 235-248.
- Koopal L.K., van Riemsdijk W.H., de Wit J.C.M., Benedetti M.F., 1994. Analytical Isotherm Equations for Multicomponent Adsorption to Heterogeneous Surfaces, *Journal of Colloid and Interface Science*, 166, 51-60.
- Koutsaftis A. and Aoyama I., 2007. Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*, *Science of the Total Environment*, 387, 166-174.
- Kozelka P.B. and Bruland K.W., 1998. Chemical speciation of dissolved Cu, Zn, Cd, Pb in Narragansett Bay, Rhode Island, *Marine Chemistry*, 60, 267-282.
- Kraepiel A.M., Chiffoleau J.F., Martin J.M., Morel F.M.M., 1997. Geochemistry of trace metals in the Gironde estuary, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61, 1421-1436.
- Letizia D. and Gnudi F., 1999. Phenolic compounds in surface water, *Water Research*, 33, 3213-3219.
- Lewis B.L., Luther G.W., Lane H., Church T.M., 1995. Determination of Metal-Organic complexations in natural waters by SWASV with Pseudopolarograms, *Electroanalysis*, 7, 166-177.
- Lorenzo J.I., Nieto O., Beiras R., 2006. Anodic stripping voltammetry measures copper bioavailability for sea urchin larvae in the presence of fulvic acids, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 36-44.
- Lorenzo J.I., Nieto-Cid M., Alvarez-Salgado X.A., Pérez P., Beiras R., 2007. Contrasting complexing capacity of dissolved organic matter produced during the onset, development and decay of a simulated bloom of the marine diatom *Skeletonema costatum*, *Marine Chemistry*, 103, 61-75.
- Louis Y., Cmok P., Omanović D., Garnier C., Lenoble V., Mounier S., Pižeta I., 2008. Speciation of trace metals in natural waters: The influence of an adsorbed layer of natural organic matter (NOM) on voltammetric behaviour of copper, *Analytica Chimica Acta*, 606, 37-44.
- Louis Y., Garnier C., Lenoble V., Omanović D., Mounier S., Pižeta I., 2008. Characterisation and modelling of marine dissolved organic matter interactions with major and trace cations, **soumise**.
- Lu Y. and Allen H., 2002. Characterization of copper complexation with natural dissolved organic matter (DOM)—link to acidic moieties of DOM and competition by Ca and Mg, *Water Research*, 36, 5083-5101.
- Lu Y. and Allen H., 2006. A predictive model for copper partitioning to suspended particulate organic matter in river waters, *Environmental pollution*, 143, 60-72.

- Luciani X., Mounier S., Paraquetti H.H.M., Redon R., Lucas Y., Bois A., Lacerda L.D., Raynaud M., Ripert M., 2008. Tracing of dissolved organic matter from the SEPETIBA Bay (Brazil) by PARAFAC analysis of total luminescence matrices, *Marine Environmental Research*, 65, 148-157.
- Luther III G.W., Rozan T.F., Witter A., Lewis B., 2001. Metal-Organic complexation in the marine environment, *Geochemical Transaction*, 2, 65-74.
- Ma H., Kim S.D., Cha D.K., Allen H.E., 1999. Effect of kinetics of complexation by humic acid on toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 828-837.
- Ma H., Allen H.E., Yin Y., 2001. Characterisation of isolated fractions of dissolved organic matter from natural waters and a wastewater effluent, *Water research*, 35, 985-996.
- Mac Carthy P., 2001. The principles of humic substances, *Soil Science*, 166, 738-751.
- Mackie D.S., Van den Berg C.M.G., Readman J.W., 2004. Determination of pyriothione in natural waters by cathodic stripping voltammetry, *Analytica Chimica Acta*, 511, 47-53.
- Mantoura R.F.C. and Riley J.P., 1975. The use of gel filtration in the study of metal binding by humic acids and related compounds, *Analytica Chimica Acta*, 78, 193- 200.
- Mariot M., Dudal Y., Furian S., Sakamoto A., Vallès V., Fort M., Barbiero L., 2007. Dissolved organic matter fluorescence as a water-flow tracer in the tropical wetland of Pantanal of Nhecolândia, Brazil, *Science of the Total Environment*, 388, 184-193.
- Masini J., Abate G., Lima E., Hahn L., Nakamura M., Lichtig J., Nagatomy H., 1998. Comparison of methodologies for determination of carboxylic and phenolic groups in humic acids, *Analytica Chimica Acta*, 364, 223-233.
- Massart D.L., Vandeginste B.G.M., Buydens L.M.C., De Jong S., Lewi P.J., Smeyers-Verbeke J., 1997. Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A, *Elsevier*, Amsterdam, ISBN 0 44489 724 0, pp 886.
- McKnight D.M. and Morel F.M.M., 1979. Release of weak and strong copper-complexing agents by algae, *Limnology and Oceanography*, 24, 823-837.
- Medina M., Andrade S., Faugeron S., Mella D., Correa J., 2005. Biodiversity of rocky intertidal benthic communities associated with copper mine tailing discharge in northern Chile, *Marine Pollution Bulletin*, 50, 396-406.
- Milne C.J., Kinniburgh D.G., Tipping E., 2001. Generic NICA-Donnan Model Parameters for proton binding by Humic Substances, *Environmental Science and Technology*, 35, 2049-2059.
- Miquel G., 2001. Rapport sur les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé, *rapport No 261 de l'Office Parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques*, pp 366.
- Moffett J.W., Brand L.E., Croot P.L., Barbeau K., 1997. Cu speciation and cyanobacterial distribution in harbors subject to anthropogenic Cu input, *Limnology and Oceanography*, 42, 789-799.
- Morel M.L.L., 1983. Principles of aquatic chemistry, *John Wiley & Sons, New York*, ISBN 0 47108 683 5, pp 446.
- Muller F.L.L., 1999. Evaluation of the effects of natural dissolved and colloidal organic ligands on the electrochemical lability of Cu, Pb and Cd in the Arran Deep, Scotland, *Marine Chemistry*, 67, 43-60.
- Muller F.L.L., Gulín S.B., Kalvøy Å., 2001. Chemical speciation of copper and zinc in surface waters of the western Black Sea, *Marine Chemistry*, 76, 233-251.

- Nagata T., 2000. Production mechanisms of dissolved organic matter. *In* : Kirchman D.L. (Ed.), *Microbial Ecology of the Ocean*, Wiley-Liss, New York, N.Y, 121-152.
- Nelson A. and Mantoura R.F.C., 1984. Voltammetry of copper species in estuarine waters: Part I. Electrochemistry of copper species in chloride media, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 164, 237-252.
- Nicolau R., 2005. Caractérisation et quantification des transferts dus aux petites rivières côtières Méditerranéennes, *Thèse de Doctorat* du 26 septembre 2005, Université du Sud Toulon-Var, pp 144.
- Nicolau R., Louis Y., Omanović D., Garnier C., Mounier S., Pižeta I., 2008. Study of interactions of concentrated marine dissolved organic matter with copper and zinc by pseudopolarographie, *Analytica Chimica Acta*, 618, 35-42.
- Nimmo D.W.R., Preul M.A., Castle C.J., Self J.R., Pillsbury R.W., Bergey E.A., 2003. Effects of Excess Copper on Growth of wild Rice (*Zizania palustris*) Seedlings Tested in Reconstituted and Natural Waters, *Environmental Management*, 32, 466-475.
- Omanović D., Pižeta I., Peharec Ž., Branica M., 1996. Voltammetric Determination of the Metal Complexing Capacity in Model Solutions, *Marine Chemistry*, 53, 121-129.
- Omanović D., Peharec Ž., Pižeta I., Brug G., Branica M., 1997. A new electrode for trace metal analysis, *Analytica Chimica Acta*, 339, 147-153.
- Omanović D. and Branica M., 1998. Automation of Voltammetric Measurements by Polarographic Analyser PAR 384B, *Croatica Chemica Acta*, 71, 421-433.
- Omanović D. and Branica M., 2004. Pseudopolarography of trace metals. Part II. The comparison of the reversible, quasireversible and irreversible electrode reactions, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 565, 37-48.
- Omanović D., 2006. Pseudopolarography of trace metals. Part III. Determination of stability constants of labile metal complexes, *Croatica Chemica Acta*, 79, 67-76.
- Omanović D., Kwokal Ž., Goodwin A., Lawrence A., Banks C.E., Compton R.G., Komorsky-Lovrić Š., 2006. Trace metal detection in Šibenik bay, Croatia: Cadmium, Lead and Copper with Anodic Stripping Voltammetry and Manganese *via* Sonoelectrochemistry. A case Study, *Journal of the Iranian Chemical Society*, 3, 128-139.
- OMS-IPCS, 1998. Copper, World Health Organisation, International Program on Chemical Safety, *Environmental Health Criteria n°200*, ISBN 9 24157 200 0, pp 360.
- Ouyang T.P., Zhu Z.Y., Kuang Y.Q., Huang N.S., Tan J.J., Guo G.Z., Gu L.S., Sun B., 2006. Dissolved trace elements in river water: spatial distribution and the influencing factor, a study for the Pearl River Delta Economic Zone, China, *Environmental Geology*, 49, 733-742.
- Parlanti E., Wörz K., Geoffroy L., Lamotte M., 2000. Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs, *Organic Geochemistry*, 31, 1765-1781.
- Patel-Sorrentino N., Mounier S., Lucas Y., Benaim J-Y., 2004. Effects of UV-visible irradiation on natural organic matter from the Amazon basin, *Science of the total Environment*, 321, 231-239.
- Pedro G. et Scherer S., 1974. Essai d'interprétation géochimique de la carte pédologique de France (échelle 1/1 000 000), *Annales agronomiques*, 25, 25-48.
- Perdue E.M. and Lytle C.R., 1983. Distribution Model for Binding of Proton and metal ions by Humic Substances, *Environmental Science and Technology*, 17, 654-660.

- Perdue E.M., 1985. Acidic functional groups of humic substances. In: Aiken G.R., McKnight D.M., Wershaw R.L., MacCarthy P., (Eds.), *Humic substances in soil, sediment and water*, Wiley, New York, Chapter 20.
- Pinto E., Sigaud-Kutner T.C.S., Leitão M.A.S., Okamoto O.K., Morse D., Colepicolo P., 2003. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology*, 39, 1008-1018.
- Pižeta I. and Branica M., 1997. Simulation and fitting of anodic stripping voltammetry data for determination of the metal complexing capacity, *Analytica Chimica Acta*, 351, 73-82.
- Pižeta I., Billon G., Omanović D., Cuculić V., Garnier C., Fischer J.C., 2005. Pseudopolarography of lead (II) in sediment and in interstitial water measured with a solid microelectrode, *Analytica Chimica Acta*, 551, 65-72.
- Plavšić M. and Čosović B., 1994. Influence of surface-active substances on the redox processes of metal ions: a contribution to the speciation analysis of metals in aquatic systems, *Analytica Chimica Acta*, 284, 539-545.
- Plavšić M., Krznarić D., Čosović B., 1994. The electrochemical processes of copper in the presence of triton X-100, *Electroanalysis*, 6, 469-474.
- Rahmi D., Zhu Y., Fujimori E., Umemura T.i., Haraguchi H., 2007. Multielement determination of trace metals in seawater by ICP-MS with aid of down-sized chelating resin-packed minicolumn for preconcentration, *Talanta*, 72, 600-606.
- Riso R.D., Le Corre P., Chaumery C.J., 1997. Rapid and simultaneous analysis of trace metals (Cu, Pb and Cd) in seawater by potentiometric stripping analysis, *Analytica Chimica Acta*, 351, 83-89.
- Ritchie J.D. and Perdue J.M., 2003. Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter, *Geochemica and cosmochemica Acta*, 67, 85-96.
- Rozan T.F., Benoit G., Marsh H., Chin Y.-P., 1999. Intercomparison of DPASV and ISE for the measurement of Cu complexation characteristics of NOM in freshwater, *Environmental Science and Technology*, 33, 1766-1770.
- Ružić I., 1982. Theoretical aspects of the direct titration of natural waters and its information yield for trace metal speciation, *Analytica Chimica Acta*, 140, 99- 113.
- Sahlin E. and Jagner D., 1998. Calibration-Free Determination of Copper, Zinc, Cadmium and Lead in Tap Water Using Coulometric Stripping Potentiometry, *Electroanalysis*, 10, 532-535.
- Sarazin M., Alexandre C., Thomas T., 2000. Influence des apports en oligoéléments, protéines, lipides, glucides et vitamines sur le métabolisme osseux, *Revue du Rhumatisme*, 67, 486-497.
- Sawyer D.T., Sobkowiak A., Roberts J., 1995. *Electrochemistry for chemists*, second edition. Wiley & Sons, ISBN 0 47159 468 7, pp 505.
- Scarano G. and Bramanti E., 1993. Voltammetric behavior of marine hydrophobic copper complexes: effect of adsorption processes at mercury electrode, *Analytica Chimica Acta*, 277, 137-144.
- Scatchard G., 1949. The attraction of proteins for small molecules and ions, *Annals of New York Academy of Sciences*, 51, 660-672.
- Schiff K., Diehl D., Valkirs A., 2004. Copper emissions from antifouling paint on recreational vessels, *Marine Pollution Bulletin*, 48, 371-377.

- Scoullou M., Plavšić M., Karavoltzos S., Sakellari A., 2006. Partitioning and distribution of dissolved copper, cadmium and organic matter in Mediterranean marine coastal areas: The case of a mucilage event, *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 67, 484-490.
- Seritti A., Morelli E., Nannicini L., Del Vecchio R., 1994. Production of hydrophobic fluorescent organic matter by marine diatom *Pheodactylum tricorutum*, *Chemosphere*, 28, 117-129.
- Serkiz S.M. and Perdue E.M., 1990. Isolation of dissolved organic matter from the Suwannee river using reverse osmosis, *Water Research*, 24, 911-916.
- Shank G.C., Skrabal S.A., Whitehead R.F., Kieber R.J., 2004. Strong copper complexation in an organic-rich estuary: the importance of allochthonous dissolved organic matter, *Marine Chemistry*, 88, 21-39.
- Sheldon A.R. and Menzies N.W., 2005. The effect of copper toxicity on the growth and root morphology of Rhodes grass (*Chloris gayana Knuth.*) in resin buffered solution culture, *Plant and Soil*, 278, 341-349.
- Sigg L., Stumm W., Behra P., 1992. Chimie des milieux aquatiques, *Eds Masson, Paris*, ISBN 2 22583 905 0, pp 391.
- Sleighter R.L. and Hatcher P.G., 2008. Molecular characterization of Dissolved Organic Matter (DOM) along a river to ocean transect of the lower Chesapeake Bay by ultrahigh resolution electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Marine Chemistry*, 110, 140-152.
- Sposito G., 1981. Trace Metals in contaminated waters, *Environmental Science and Technology*, 15, 396-403.
- Stevenson F.J., 1994. Humus Chemistry, *Wiley, New York*, ISBN 0 47159 474 1, pp 512.
- Sunda W.G. and Guillard R.R.L., 1976. Relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton, *Journal of Marine Research*, 34, 511-529.
- Sunda W.G., Tester P.A., Huntsman S.A., 1987. Effects of cupric and zinc ion activities on the survival and reproduction of marine copepods, *Marine Biology*, 94, 203-210.
- Svetličić V., Žutić V., Tomaić J., 1991. Estuarine transformation of organic matter: single coalescence events of estuarine surface active particles, *Marine Chemistry*, 32, 253-267.
- Tang T., Warnken K.W., Santschi P.H., 2001. Organic complexation of copper in surface waters of Galveson Bay, *Limnology and Oceanography*, 46, 321-330.
- Thacker S.A., Tipping E., Baker A., Gondar D., 2005. Development and application of functional assays for freshwater dissolved organic matter, *Water Research*, 39, 4559-4573.
- Thurman E.M., 1985. Organic Geochemistry of Natural Waters, *Kluwer Academic, Boston, MA, USA*, ISBN 9 02473 143 7, pp 516.
- Thurman E.M. and Malcolm R.L., 1981. Preparative isolation of aquatic humic substances, *Environmental Sciences and Technology*, 15, 463-466.
- Tipping E., Lofts S., Lawlor A.J., 1998. Modelling the chemical speciation of trace metals in the surface waters of the Humber system, *Science of the Total Environment*, 210-211, 63-77.
- 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, *Computer geoscience*, 20, 973-1023.

- Town R.M. and Filella M., 2000a. Dispelling the myths: Is the existence of L1 and L2 ligands necessary to explain metal ion speciation in natural waters?, *Limnology and Oceanography*, 45, 1341-1357.
- Town R.M. and Filella M., 2000b. Determination of metal ion binding parameters for humic substances: Part 2. Utility of ASV pseudo-polarography, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 488, 1-16.
- Town R.M. and van Leeuwen H.P., 2006. Comparative evaluation of scanned stripping techniques: SSCP vs. SSV, *Croatica Chemica Acta*, 79, 15-25.
- Tsang J.J., Rozan T.F., Hsu-Kim H., Mullaugh K.M., Luther G.W., 2006. Pseudopolarographic determination of Cd²⁺ complexations in freshwater, *Environmental Science and Technology*, 40, 5388-5394.
- Van den Berg C.M.G., 1982a. Determination of copper complexation with natural organic ligands in seawater by equilibration with MnO₂ I. Theory, *Marine Chemistry*, 11, 307-322.
- Van den Berg C.M.G., 1982b. Determination of copper complexation with natural organic ligands in seawater by equilibration with MnO₂ II. Experimental procedures and application to surface seawater, *Marine Chemistry*, 11, 323-342.
- Van den Berg C.M.G., 1984. Determination of the complexing capacity and conditional stability constants of complexes of copper(II) with natural organic ligands in seawater by cathodic stripping voltammetry of copper-catechol complex ions, *Marine Chemistry*, 15, 1-18.
- Van den Berg C.M.G., 1989. The Electroanalytical Chemistry of Sea-water, *In: Chemical Oceanography*, Riley J.P. (Ed.), London, 9, 197-245.
- Van Elteren J.T., and Woroniecka U.D., 2003. Investigation into sorption processes in the anodic stripping voltammetric speciation of Cu in natural waters, *Analytica Chimica Acta*, 476, 33-42.
- Vasconcelos M.T.S.D. and Leal M.F.C., 2001. Antagonistic interactions of Pb and Cd on Cu uptake, growth inhibition and chelator release in the marine algae *Emiliana Huxleyi*, *Marine Chemistry*, 75, 123-129.
- Vetter T.A., Perdue E.M., Ingall E., Koprivnjak J.-F., Pfromm P.H., 2007. Combining reverse osmosis and electrodialysis for more complete recovery of dissolved organic matter from seawater, *Separation and purification Technology*, 56, 383-387.
- Vignati D., 2004. Trace Metal Partitioning in Freshwater as a Function of Environmental Variables and its Implications for Metal Bioavailability, *Thèse N° 3477*, Université de Genève, pp 272.
- Voelker B.M. and Kogut M.B., 2001. Interpretation of metal speciation data in coastal waters: the effects of humic substances on copper binding as a test case, *Marine Chemistry*, 74, 303-318.
- Wang W., Chen H., Wang A., 2007. Adsorption characteristics of Cd(II) from aqueous solution onto activated palygorskite, *Separation and purification Technology*, 55, 157-164.
- Waeles M., Riso R.D., Maguer J.-F., Le Corre P., 2004. Distribution and chemical speciation of dissolved cadmium and copper in the Loire estuary and North Biscay continental shelf, France, *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 59, 49-57.
- Waeles M., Riso R.D., Le Corre P., 2005. Seasonal variations of dissolved and particulate copper species in estuarine waters, *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 62, 313-323.

- Wells M.L., Kozelka P.B., Bruland K.W., 1998. The complexation of "dissolved" Cu, Zn, Cd and Pb by soluble and colloidal matter in Narragansett Bay, RI, *Marine Chemistry*, 62, 203-217.
- Westall J.C., Zachary J.L., Morel F., 1976. MINEQL, a computer program for the calculation of chemical equilibrium composition of aqueous systems, *R.M. parsons laboratory technical note 18*, Massachusetts institute of technology, Cambridge, MA.
- Wise J.A., Roston D.A., Heineman W.R., 1983. The effects of Copper-Zinc and Copper-Cadmium intermetallic compounds in different systems used for anodic stripping voltammetry, *Analytica Chimica Acta*, 154, 95-104.
- Zsolnay A., 2003. Dissolved organic matter: artefacts, definitions, and functions, *Geoderma*, 113, 187-209.

ANNEXES

Annexe 1 :

Projet programmé sous GPES afin de réaliser une titration logarithmique

```
Procedure!Method = VA
Message("Début de la manip Vérifier: burettes sous tension, burettes
initialisées, tubes d'ajouts en place, fichier logadd et addition ok?")

;-----Homogénéisation de l'échantillon avec purge d'azote 10 minutes
    DIO!SetByte("P1","A","6")
    Utility!Delay = 600
    DIO!SetByte("P1","A","5")

;-----Contrôle des métaux présents et mesures de la Solution initiale,
    Dataset!AutoNum = 1
    Dataset!AutoReplace("xxx")
    Procedure!Open("D:\YOANN_POLARO\Croatie2008\proc1.2")
    Procedure!Start
    Dataset!SaveAs("D:\YOANN_POLARO\Croatie2008\Ajlog\stab\Aj0_-
1.2V_xxx")
    Repeat(4)
        Procedure!Open("D:\YOANN_POLARO\Croatie2008\proc0.5")
        Procedure!Start
        Dataset!SaveAs("D:\YOANN_POLARO\Croatie2008\Ajlog\Aj0_-0.5V_xxx")
    EndRepeat

;-----AJOUTS et STABILISATION sur 120 min
Dataset!AutoNum = 1
Dataset!AutoReplace("xxxx")
Repeat(16)
    System!Run("C:\Autolab\Log_add2")
    DIO!SetByte("P1","A","6")
    Utility!Delay = 30
    DIO!SetByte("P1","A","5")

    Repeat(20)
        Procedure!Open("D:\YOANN_POLARO\Croatie2008\proc0.5")
        Procedure!Start
        Dataset!SaveAs("D:\YOANN_POLARO\Croatie2008\Ajlog\stab\Stab_xxxx")
    EndRepeat

    Repeat(2)
        Procedure!Open("D:\YOANN_POLARO\Croatie2008\proc0.5")
        Procedure!Start
        Dataset!SaveAs("D:\YOANN_POLARO\Croatie2008\Ajlog\Aj-0.5V_xxxx")
    EndRepeat
EndRepeat

;-----Contrôle des métaux présents en fin d'ajout log
Repeat(3)
    Procedure!Open("D:\YOANN_POLARO\Croatie2008\proc1.2")
    Procedure!Start
    Dataset!SaveAs("D:\YOANN_POLARO\Croatie2008\Ajlog\Ajfin_-
1.2_xxxx")
EndRepeat

Message("fin aj log")
```

Annexe 2 :

Code du programme de résolution des expériences cinétiques pour 1 ligand

```
clear all
clear

global t M alpha K LT M0 MT Mcalc Kvar LTvar sim

load -force calcul1/data; %matrice temps t(s), concentration M (mol/L)
load -force calcul1/parametres; %vecteur ligne concentrations LT (mol/L), M0
(mol/L), MT (mol/L), coefficient speciation inorganique (Mlibre=alpha*M), log
constantes kl (L/mol/s) k-1 (s)

more off
ignore_function_time_stamp="all" ;

'***INITIALISATION***'

t=data(:,1);
M=data(:,2);
LT=parametres(1);
M0=parametres(2);
MT=parametres(3);
alpha=parametres(4);
K(:)=parametres(5:6);

LTvar=LT;
Kvar=K;

Mcalc = lsode ("integration_ML", M0, t);

bias=zeros(1,size(LT,2)+size(K,2)+1);
for i=1:size(t,1)
    bias(1)=bias(1)+norm(log(Mcalc(i))-log(M(i)));
end

%-----;
clearplot;
title("Initialisation");
plot(t,Mcalc,"1",t,M,"1*");
replot;
%-----;

' bias initial '
bias(1)

save -text calcul1/resMcalcini Mcalc
save -text calcul1/resbiasini bias

'***OPTIMISATION***'

'definition du simplex'
sim=zeros(size(LT,2)+size(K,2)+1,size(LT,2)+size(K,2));
for i=1:size(LT,2)
    sim(i+1,i)=LT(i)*0.1;
end
for i=(size(LT,2)+1):(size(LT,2)+size(K,2))
    sim(i+1,i)=K(i-size(LT,2))*0.1;
end
```

```

sim
simini=sim;

'---- calcul pour les points du simplex ----'
motion=1;old_imax=0;old_imin=0;

for i=2:size(sim,1) %calcul l erreur pour tous les points du simplex sauf le
premier
    LTvar(1:size(LT,2))=LT(1:size(LT,2))+sim(i,1:size(LT,2));
    Kvar(1:size(K,2))=K(1:size(K,2))+sim(i,(size(LT,2)+1):(size(LT,2)+size(K
,2)));
    Mcalc = lsode ("integration_ML", M0, t);
    bias(i)=0;
    for j=1:size(t,1)
        bias(i)=bias(i)+norm(log(Mcalc(j))-log(M(j)));
    end
end

'bias du simplex'
bias

iteration=0;
iterationbis=0; % pour ne tracer le graph que tous les 10 iterations
biasmin=0;
biasmax=0;
deviationstandard=mean(std(sim)./abs(mean(sim)+1E-20)*100);

while ((iteration<500) && (log10(deviationstandard)>-2) && (motion>1e-10)) %
tant que la déviation standard du simplex n'est pas suffisamment faible ou que
le nombre d itérations ne dépasse pas le nombre limite
    [biasmax, imax]=max(bias); %cherche l erreur max
    [biasmin, imin]=min(bias); %cherche l erreur min
    iteration=iteration+1;
    iterationbis=iterationbis+1;
    printf("nombre d'iterations: %d ",iteration);
    printf("Erreur = %f ..... ",biasmax); % affiche l erreur max
    if imax~=old_imax % ce point ne vient-il pas d etre cree ?
        cof=1.2; %1.2
        printf("deplacement du point %d du simplex de ", imax);% le point
symetrique
    else
        cof=0.5; %0.5
        printf("recul et reduction du simplex, deplacement du point %d de
",imax); %la taille diminue pour eviter l oscillation
    end
    new_point=1/(size(sim,1)-1)*((1+cof)*sum(sim)-
(1+cof*size(sim,1))*sim(imax,:));
    for j=1:size(LT,2) %toutes les concentrations
        if (LT(j)+new_point(j))<0 %pour eviter les mauvaises sorties de
Newton (i.e. Ntot+modif<0)
            new_point(j)=-LT(j)+1E-18;
            printf("Concentration optimisée <0 pour l'espèce n°: %d
",j);
        end
        j=j+1;
    end
    motion=norm(new_point-sim(imax,:)); printf("%f\n",motion);% calcul du
deplacement
    sim(imax,:)=new_point; % modification du simplex
    LTvar(1:size(LT,2))=LT(1:size(LT,2))+sim(imax,1:size(LT,2));

```

```

        Kvar(1:size(K,2))=K(1:size(K,2))+sim(imax,(size(LT,2)+1):(size(LT,2)+size(K,2)));
    Mcalc = lsode ("integration_ML", M0, t);
    bias(imax)=0;
    for j=1:size(t,1)
        bias(imax)=bias(imax)+norm(log(Mcalc(j))-log(M(j)));
    end
    bias
    old_imax=imax;
    deviationstandard=mean(std(sim)./abs(mean(sim)+1E-20)*100);
    printf("deviation standard moyenne de sim = %f ",deviationstandard);
    if (iterationbis==10) % pour ne tracer le graph que tous les 10
iterations
        iterationbis=0;
        %-----;
        clearplot;
        title(num2str(iteration));
        plot(t,Mcalc,"1",t,M,"1*");
        replot;
        %-----;
    end
end

'***Résultats***'

LTvar(1:size(LT,2))=LT(1:size(LT,2))+sim(imin,1:size(LT,2));
Kvar(1:size(K,2))=K(1:size(K,2))+sim(imin,(size(LT,2)+1):(size(LT,2)+size(K,2)
));
Mcalc = lsode ("integration_ML", M0, t);
%-----;
clearplot;
title("Final");
plot(t,Mcalc,"1",t,M,"1*");
replot;
%-----;

'bias'
min(bias)

'Nombre d iterations'
iteration

'Constantes et concentrations optimisees:'
'LT='
LTvar(1:size(LT,2))=LT(1:size(LT,2))+sim(imin,1:size(LT,2))
'K='
Kvar(1:size(K,2))=K(1:size(K,2))+sim(imin,(size(LT,2)+1):(size(LT,2)+size(K,2)
))

'Sauvegarde des résultats'

save -text calcul1/resbias bias;
save -text calcul1/resMcalc Mcalc;
save -text calcul1/resLT LTvar;
save -text calcul1/resK Kvar;
save -text calcul1/resiteration iteration;
save -text calcul1/ressim sim;

'***Calcul des erreurs sur les parametres optimises***'

erreur=min(bias);

```

```

erreurmin=zeros(1,size(sim,1))+erreur;
erreurmax=zeros(1,size(sim,1))+erreur;
stdmin=zeros(1,size(sim,1));
stdmax=zeros(1,size(sim,1));
LT=LTvar; % LT optimisees
K=Kvar; % K optimisees

simerreur=simini;

for i=1:size(sim,1)
    for j=1:size(sim,2)
        if (simerreur(i,j)~=0)
            simerreur(i,j)=1;
        end
    end
end
'Calcul de l erreur positive (augmente la valeur optimisee) jusqu à modifier
de plus de 10 pour cent le bias'
parametre=2; %ne compte pas le premier point
while (parametre<=size(sim,1))
    std=0;
    while ((erreurmax(1,parametre)<=(erreur*1.1)) && std<500) % dans la
limite d une variation de 50 pour cent
        LTvar=(LT+(LT.*(simerreur(parametre,1:size(LT,2))*std/1000)));
%augmente d un dixieme de pour cent LT

        Kvar=(K+(K.*(simerreur(parametre,(size(LT,2)+1):(size(LT,2)+size(K,2)))*
std/1000))); %augmente d un dixieme de pour cent K en log
        Mcalc = lsode ("integration_ML", M0, t);
        erreurmax(1,parametre)=0;
        for j=1:size(t,1)

            erreurmax(1,parametre)=erreurmax(1,parametre)+norm(log(Mcalc(j))-
log(M(j)));
        end
        stdmax(1,parametre)=std/10;
        std=std+1;
    end
    parametre=parametre+1;
end

'variation du bias en augmentant les valeurs des parametres optimises'
erreurmax
'pourcentage de variation positive max sans augmenter le bias de plus de 10
pour cent'
stdmax

'Calcul de l erreur negative (diminue la valeur optimisee) jusqu à modifier de
plus de 10 pour cent le bias'
parametre=2; %ne compte pas le premier point
while (parametre<=size(sim,1))
    std=0;
    while ((erreurmin(1,parametre)<=(erreur*1.1)) && std<500) % dans la
limite d une variation de 50 pour cent
        LTvar=max(1E-18,(LT-
(LT.*(simerreur(parametre,1:size(LT,2))*std/1000))); %diminue d un dixieme de
pour cent LT
        Kvar=(K-
(K.*(simerreur(parametre,(size(LT,2)+1):(size(LT,2)+size(K,2)))*std/1000)));
%diminue d un dixieme de pour cent K en log
        Mcalc = lsode ("integration_ML", M0, t);

```

```

    erreurmin(1,parametre)=0;
    for j=1:size(t,1)

        erreurmin(1,parametre)=erreurmin(1,parametre)+norm(log(Mcalc(j))-
log(M(j)));
        end
        stdmin(1,parametre)=-std/10;
        std=std+1;
    end
    parametre=parametre+1;
end

'variation du bias en diminuant les valeurs des parametres optimisés'
erreurmin
'pourcentage de variation negative max sans augmenter le bias de plus de 10
pour cent'
stdmin

save -text calcul1/reserreurmin erreurmin; % variation du bias en augmentant
les valeurs des parametres optimisés
save -text calcul1/resstdmin stdmin; % pourcentage de variation positive max
sans augmenter le bias de plus de 10 pour cent
save -text calcul1/reserreurmax erreurmax; % variation du bias en diminuant
les valeurs des parametres optimisés
save -text calcul1/resstdmax stdmax; % pourcentage de variation negative max
sans augmenter le bias de plus de 5 pour cent

```

Fonction Mdot: Permet d'intégrer l'équation cinétique à 1 ligand et d'en sortir une solution numérique

```

function Mdot = integration_ML(M, t)

global alpha Kvar LTvar MT

Mdot = -(10^Kvar(1))*M*(M+(LTvar-MT)) + (10^Kvar(2))/alpha*(MT-M);

Endfunction

```

Annexe 3 :

Code du programme de résolution des expériences cinétiques pour 2 ligands

```
clear all
clear

global t M alpha K LT M0 MT Mcalc Kvar LTvar sim

load -force calcul1/data; %matrice temps t(s), concentration M (mol/L)
load -force calcul1/parametres; %vecteur ligne concentrations L1T, L2T, M0, MT
(mol/L), coefficient speciation inorganique (Mlibre=alpha*M), log constantes
k1 (L/mol/s), k-1 (1/s), k2 (L/mol/s) et k-2 (1/s)

more off
ignore_function_time_stamp="all" ;

'***INITIALISATION***'

t=data(:,1);
M=data(:,2);
LT=parametres(1:2);
M0=parametres(3);
MT=parametres(4);
alpha=parametres(5);
K(:)=parametres(6:9);

LTvar=LT;
Kvar=K;

Mcalc = lsode ("integration_ML2", M0, t);

bias=zeros(1,size(LT,2)+size(K,2)+1);
for i=1:size(t,1)
    bias(1)=bias(1)+norm(log(Mcalc(i))-log(M(i)));
end

%-----;
clearplot;
title("Initialisation");
plot(t,Mcalc,"1",t,M,"1*");
replot;
%-----;

' bias initial '
bias(1)

save -text calcul1/resMcalcini Mcalc
save -text calcul1/resbiasini bias

'***OPTIMISATION***'

'definition du simplex'
sim=zeros(size(LT,2)+size(K,2)+1,size(LT,2)+size(K,2));
for i=1:size(LT,2)
    sim(i+1,i)=LT(i)*0.1;
end
for i=(size(LT,2)+1):(size(LT,2)+size(K,2))
    sim(i+1,i)=K(i-size(LT,2))*0.1;
```

```

end
sim
simini=sim;

'---- calcul pour les points du simplex ----'
motion=1;old_imax=0;old_imin=0;

for i=2:size(sim,1) %calcul l erreur pour tous les points du simplex sauf le
premier
    LTvar(1:size(LT,2))=LT(1:size(LT,2))+sim(i,1:size(LT,2));
    Kvar(1:size(K,2))=K(1:size(K,2))+sim(i,(size(LT,2)+1):(size(LT,2)+size(K
,2)));
    Mcalc = lsode ("integration_ML2", M0, t);
    bias(i)=0;
    for j=1:size(t,1)
        bias(i)=bias(i)+norm(log(Mcalc(j))-log(M(j)));
    end
end

'bias du simplex'
bias

iteration=0;
iterationbis=0; % pour ne tracer le graph que tous les 10 iterations
biasmin=0;
biasmax=0;
deviationstandard=mean(std(sim)./abs(mean(sim)+1E-20)*100);

while ((iteration<500) && (log10(deviationstandard)>-2) && (motion>1e-10)) %
tant que la déviation standard du simplex n'est pas suffisamment faible ou que
le nombre d itérations ne dépasse pas le nombre limite
    [biasmax, imax]=max(bias); %cherche l erreur max
    [biasmin, imin]=min(bias); %cherche l erreur min
    iteration=iteration+1;
    iterationbis=iterationbis+1;
    printf("nombre d'iterations: %d ",iteration);
    printf("Erreur = %f ..... ",biasmax); % affiche l erreur max
    if imax~=old_imax % ce point ne vient-il pas d etre cree ?
        cof=1.2; %1.2
        printf("deplacement du point %d du simplex de ", imax);% le point
symetrique
    else
        cof=0.5; %0.5
        printf("recul et reduction du simplex, deplacement du point %d de
",imax); %la taille diminue pour eviter l oscillation
    end
    new_point=1/(size(sim,1)-1)*((1+cof)*sum(sim)-
(1+cof*size(sim,1))*sim(imax,:));
    for j=1:size(LT,2) %toutes les concentrations
        if (LT(j)+new_point(j))<0 %pour eviter les mauvaises sorties de
Newton (i.e. Ntot+modif<0)
            new_point(j)=-LT(j)+1E-18;
            printf("Concentration optimisée <0 pour l'espèce n°: %d
",j);
        end
        j=j+1;
    end
    motion=norm(new_point-sim(imax,:)); printf("%f\n",motion);% calcul du
deplacement
    sim(imax,:)=new_point; % modification du simplex
    LTvar(1:size(LT,2))=LT(1:size(LT,2))+sim(imax,1:size(LT,2));

```

```

    Kvar(1:size(K,2))=K(1:size(K,2))+sim(imax,(size(LT,2)+1):(size(LT,2)+size(K,2)));
Mcalc = lsode ("integration_ML2", M0, t);
bias(imax)=0;
for j=1:size(t,1)
    bias(imax)=bias(imax)+norm(log(Mcalc(j))-log(M(j)));
end
bias
old_imax=imax;
deviationstandard=mean(std(sim)./abs(mean(sim)+1E-20)*100);
printf("deviation standard moyenne de sim = %f ",deviationstandard);
if (iterationbis==10) % pour ne tracer le graph que tous les 10
iterations
    iterationbis=0;
    %-----;
    clearplot;
    title(num2str(iteration));
    plot(t,Mcalc,"l",t,M,"1*");
    replot;
    %-----;
end
end

'***Résultats***'

LTvar(1:size(LT,2))=LT(1:size(LT,2))+sim(imin,1:size(LT,2));
Kvar(1:size(K,2))=K(1:size(K,2))+sim(imin,(size(LT,2)+1):(size(LT,2)+size(K,2)
));
Mcalc = lsode ("integration_ML2", M0, t);
%-----;
clearplot;
title("Final");
plot(t,Mcalc,"l",t,M,"1*");
replot;
%-----;

'bias'
min(bias)

'Nombre d iterations'
iteration

'Constantes et concentrations optimisees:'
'LT='
LTvar(1:size(LT,2))=LT(1:size(LT,2))+sim(imin,1:size(LT,2))
'K='
Kvar(1:size(K,2))=K(1:size(K,2))+sim(imin,(size(LT,2)+1):(size(LT,2)+size(K,2)
))

'Sauvegarde des résultats'

save -text calcul1/resbias bias;
save -text calcul1/resMcalc Mcalc;
save -text calcul1/resLT LTvar;
save -text calcul1/resK Kvar;
save -text calcul1/resiteration iteration;
save -text calcul1/ressim sim;

'***Calcul des erreurs sur les parametres optimises***'

erreur=min(bias);

```

```

erreurmin=zeros(1,size(sim,1))+erreur;
erreurmax=zeros(1,size(sim,1))+erreur;
stdmin=zeros(1,size(sim,1));
stdmax=zeros(1,size(sim,1));
LT=LTvar; % LT optimisees
K=Kvar; % K optimisees

simerreur=simini;

for i=1:size(sim,1)
    for j=1:size(sim,2)
        if (simerreur(i,j)~=0)
            simerreur(i,j)=1;
        end
    end
end
'Calcul de l erreur positive (augmente la valeur optimisee) jusqu à modifier
de plus de 10 pour cent le bias'
parametre=2; %ne compte pas le premier point
while (parametre<=size(sim,1))
    std=0;
    while ((erreurmax(1,parametre)<=(erreur*1.1)) && std<500) % dans la
limite d une variation de 50 pour cent
        LTvar=(LT+(LT.*(simerreur(parametre,1:size(LT,2))*std/1000)));
%augmente d un dixieme de pour cent LT

        Kvar=(K+(K.*(simerreur(parametre,(size(LT,2)+1):(size(LT,2)+size(K,2)))*
std/1000))); %augmente d un dixieme de pour cent K en log
        Mcalc = lsode ("integration_ML2", M0, t);
        erreurmax(1,parametre)=0;
        for j=1:size(t,1)

            erreurmax(1,parametre)=erreurmax(1,parametre)+norm(log(Mcalc(j))-
log(M(j)));
        end
        stdmax(1,parametre)=std/10;
        std=std+1;
    end
    parametre=parametre+1;
end

'variation du bias en augmentant les valeurs des parametres optimises'
erreurmax
'pourcentage de variation positive max sans augmenter le bias de plus de 10
pour cent'
stdmax

'Calcul de l erreur negative (diminue la valeur optimisee) jusqu à modifier de
plus de 10 pour cent le bias'
parametre=2; %ne compte pas le premier point
while (parametre<=size(sim,1))
    std=0;
    while ((erreurmin(1,parametre)<=(erreur*1.1)) && std<500) % dans la
limite d une variation de 50 pour cent
        LTvar=max(1E-18,(LT-
(LT.*(simerreur(parametre,1:size(LT,2))*std/1000))); %diminue d un dixieme de
pour cent LT
        Kvar=(K-
(K.*(simerreur(parametre,(size(LT,2)+1):(size(LT,2)+size(K,2)))*std/1000)));
%diminue d un dixieme de pour cent K en log
        Mcalc = lsode ("integration_ML2", M0, t);

```

```

    erreurmin(1,parametre)=0;
    for j=1:size(t,1)

        erreurmin(1,parametre)=erreurmin(1,parametre)+norm(log(Mcalc(j))-
log(M(j)));
        end
        stdmin(1,parametre)=-std/10;
        std=std+1;
    end
    parametre=parametre+1;
end

'variation du bias en diminuant les valeurs des parametres optimisés'
erreurmin
'pourcentage de variation negative max sans augmenter le bias de plus de 10
pour cent'
stdmin

save -text calcul1/reserreurmin erreurmin; % variation du bias en augmentant
les valeurs des parametres optimisés
save -text calcul1/resstdmin stdmin; % pourcentage de variation positive max
sans augmenter le bias de plus de 10 pour cent
save -text calcul1/reserreurmax erreurmax; % variation du bias en diminuant
les valeurs des parametres optimisés
save -text calcul1/resstdmax stdmax; % pourcentage de variation negative max
sans augmenter le bias de plus de 5 pour cent

'***Fin***'

```

Fonction Mdot: Permet d'intégrer l'équation cinétique à 2 ligands et d'en sortir une solution numérique

```

function Mdot = integration_ML2(M, t)

global alpha Kvar LTvar MT

L1T=LTvar(1);
L2T=LTvar(2);
k1=10^Kvar(1);
Kth1=k1/(10^Kvar(2));
k2=10^Kvar(3);
Kth2=k2/(10^Kvar(4));

Mdot=1/alpha*(-k1*alpha*M*L1T+(k1*alpha*M+k1/Kth1-k2*alpha*M-
k2/Kth2)*(Kth1*alpha*M*L1T)/(1+Kth1*alpha*M)-k2*alpha*M*L2T+(MT-
M)*(k2*alpha*M+k2/Kth2));

Endfunction

```




available at www.sciencedirect.com



journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca



Speciation of trace metals in natural waters: The influence of an adsorbed layer of natural organic matter (NOM) on voltammetric behaviour of copper

Yoann Louis^a, Petra Cmuk^b, Dario Omanović^{b,*}, Cédric Garnier^c, Véronique Lenoble^a, Stéphane Mounier^a, Ivanka Pižeta^b

^a Laboratoire PROTEE, Université du Sud Toulon-Var, BP 132, 83957 La Garde, France

^b Center for Marine and Environmental Research, Ruđer Bošković Institute, P.O. Box 180, 10002 Zagreb, Croatia

^c Groupe de Physico Toxico Chimie des Systèmes Naturels, Institut des Sciences Moléculaires (ISM-UMR CNRS 5255), Université Bordeaux I, 33405 Talence, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 July 2007

Received in revised form

10 September 2007

Accepted 7 November 2007

Published on line 17 November 2007

Keywords:

Anodic stripping voltammetry

Metal complexing capacity

Organic matter

Pseudopolarography

Speciation

Trace metals

ABSTRACT

The influence of an adsorbed layer of the natural organic matter (NOM) on voltammetric behaviour of copper on a mercury drop electrode in natural water samples was studied. The adsorption of NOM strongly affects the differential pulse anodic stripping voltammogram (DPASV) of copper, leading to its distortion. Phase sensitive ac voltammetry confirmed that desorption of adsorbed NOM occurs in general at accumulation potentials more negative than -1.4 V. Accordingly, an application of negative potential (-1.6 V) for a very short time at the end of the accumulation time (1% of total accumulation time) to remove the adsorbed NOM was introduced in the measuring procedure. Using this protocol, a well-resolved peak without interferences was obtained. It was shown that stripping chronopotentiogram of copper (SCP) in the depletive mode is influenced by the adsorbed layer in the same manner as DPASV. The influence of the adsorbed NOM on pseudopolarographic measurements of copper and on determination of copper complexing capacity (CuCC) was demonstrated. A shift of the peak potential and the change of the half-peak width on the accumulation potential (for pseudopolarography) and on copper concentration in solution (for CuCC) were observed. By applying a desorption step these effects vanished, yielding different final results.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The bioavailability and toxicity of metal ions to aquatic organisms is mainly related to concentrations of their free (hydrated) form [1–3]. The distribution of inorganic metal species in natural waters with known composition of major

anions is predictable. However, for many metals the speciation is predominantly controlled by interactions with ligands/active sites of natural organic matter (NOM) [1–3]. In most cases, complexation of trace metals with organic matter decreases their bioavailability and toxicity. Among several methods for determination of chemical speciation [3], anodic

* Corresponding author. Tel.: +385 1 4680 231; fax: +385 1 4680 231.

E-mail addresses: louis@univ-tln.fr (Y. Louis), pcmuk@irb.hr (P. Cmuk), omanovic@irb.hr (D. Omanović), c.garnier@ism.u-bordeaux1.fr (C. Garnier), lenoble@univ-tln.fr (V. Lenoble), mounier@univ-tln.fr (S. Mounier), pizeta@irb.hr (I. Pižeta).

0003-2670/\$ – see front matter © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.aca.2007.11.011

stripping voltammetry (ASV) is an attractive method which satisfies the requirements concerning sensitivity and selectivity, while offering the benefit of low contamination risk and alteration of original sample composition during analysis. Speciation of trace metals by ASV is usually performed by determination of metal complexing capacity (MCC) [3–5]. As a final result, concentration of ligands forming stable inert complexes with a metal of interest and the corresponding conditional stability constants (K') are determined. It was recently shown that voltammetric titration data (interactions of trace metals with active sites of NOM) are mainly fitted to model encompassing two discrete classes of ligands [4]. To ensure the reliability of the obtained information, application of a wider detection window (using logarithmic additions) is proposed [5].

According to some studies, the limitation of ASV for metal speciation is that it is a kinetically dependent technique [6], i.e. some inert complexes may dissociate during the accumulation period, which could lead to underestimation of complexing parameters. However, this could be a good point because such processes might occur on the biological cell membranes as well [6].

The well-known pseudopolarographic approach in trace metal speciation [7–20] has recently attracted new attention due to the possibility to automate the process of recording of pseudopolarograms. The benefit of using pseudopolarography and a recently developed analogous technique, scanned (deposition potential) stripping chronopotentiometry (SSCP), is that obtained information about metal complexation are similar to classical polarography, but achieved at significantly lower metal concentrations [11,22–24]. As it is theoretically described and experimentally verified, the complexation of a metal by a ligand will cause a (slight) shift of reduction wave of labile complexes towards more negative potentials, while the inert complexes are separately reduced at more negative potentials comparing to labile complexes [7–24]. The magnitude of these shifts (for both labile and inert complexes) is related to the stability constant of the formed complex and to the concentration of the free complexing ligand in the case of labile complexes.

The interferences in voltammetry [3,23–31] are well known, and one important problem is adsorption of surface active substances (SAS) on the electrode surface. As a significant part of NOM usually exhibit the properties of SAS [32], this process is likely to occur when dealing with real sample in ASV. In the literature it has been reported how the adsorption of SAS influences the electrochemical reactions of copper [25–27] and also that the desorption of adsorbed SAS occurs at more negative potentials, producing well-resolved copper peak [25,31].

Each interference affecting measurement is in some extent converted into final speciation data and contributes to more or less erroneous data. Thus, the intention is to exclude interferences as much as possible during measurements.

The main objective of this paper is to explore the impact of an adsorbed layer of SAS on a mercury electrode in measurements of copper complexing properties. The benefit of removing the adsorbed layer by applying desorption step in the procedure of complexing capacity determination and

pseudopolarographic measurement in seawater samples is demonstrated.

2. Experimental

All voltammetric measurements were carried out using an Autolab potentiostat (EcoChemie, Utrecht, The Netherlands) (μ Autolab or PGSTAT12) equipped with a Metrohm 663 VA stand (Metrohm, Herisau, Switzerland). The instrument was computer-controlled using GPES 4.9 control software. The working electrode was a static mercury drop electrode (size 1, 0.25 mm²), the counter electrode was a platinum wire or a glassy carbon rod, and the reference electrode was Ag|AgCl (sat. NaCl). Stirring of the solution was performed by built-in Teflon stirrer rotating at 3000 rpm. All measurements were performed at room temperature (22 ± 1 °C). pH was controlled by a Metrohm pH meter (Model 713) with a glass pH electrode.

Differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV), phase sensitive ac voltammetry and stripping chronopotentiometry (SCP) were used as measuring techniques under the following conditions (if not otherwise noted in figure captions): pulse amplitude, $A = 20$ mV; potential step increment, $E_{\text{stinc}} = 2$ mV; time between pulses, $t_{\text{int}} = 0.1$ s; pulse duration, $t_{\text{mod}} = 0.04$ s; phase angle, $\theta = 90^\circ$. Other procedure parameters are given in figure captions. For pseudopolarographic measurements, accumulation of metal ions was performed during the deposition time (t_{acc}) consecutively, at a selected range of deposition potentials (E_{acc}) in defined steps.

Pseudopolarographic measurements were carried out automatically using the measuring procedure integrated in the PROJECT mode offered by the GPES 4.9 software. A home-written program capable to change either conditioning or deposition potential was integrated in the measurement protocol to simplify the measurement protocol/project. Analysis of voltammetric peaks and construction of pseudopolarograms was performed using home-written software [10] (the two home-written programs are available on request free of charge).

All solutions were prepared in deionised water from a Millipore Milli-Q system (Bedford, USA). Stock metal solutions (Cu, Zn) were prepared by diluting a commercial standard solution (1.0 g L⁻¹, Fluka, Buchs) in MQ-water. Concentrated nitric acid was of *supra pur* grade (Merck, Darmstadt). Samples in the cell (except for a.c. voltammetric measurements) were purged with oxygen-free nitrogen for at least 5 min prior the measurement, followed by maintaining a nitrogen blanket above the electrolyte surface during the measurement.

Natural water samples were taken in estuary of the Gapeau river (Hyères, France) (sample 1, salinity = 35‰), in a small port on island Prvić (Šepurine, Croatia) (sample 2, salinity = 38‰) and in estuary of the Krka river (Šibenik, Croatia) (sample 3, salinity = 24‰). Surface water samples (0.2 m) were sampled and stored in pre-cleaned 1 L high-density polyethylene bottles (HDPE) or in 1 L FEP (fluorinated ethylene propylene) bottles (both from Nalgene Labware). Samples were filtered through 0.45 μ m cellulose-nitrate filters and stored at 4 °C until analysed.

3. Results and discussions

The influence of SAS on the voltammetric behaviour of copper was studied by anodic stripping voltammetry (ASV), phase sensitive ac voltammetry, stripping chronopotentiometry (SCP) and pseudopolarography.

3.1. Influence of SAS on ASV of copper

Voltammograms of copper ($1.4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, determined after acidification and UV digestion) in seawater using DPASV and different parameters during the accumulation period are shown in Fig. 1. An appropriate accumulation potential to reduce the labile part only was selected on the basis of corresponding pseudopolarograms [10]. Electrochemical reaction of copper in chloride media occurs via a monovalent copper (Cu(I)) intermediate [27,33], which causes a shift in the copper peak position toward a more negative potential, a half-peak width which corresponds to a one-electron charge transfer reaction, and a peak height about half the value of that recorded in the absence of chloride (oxidation from monovalent copper to divalent copper also occurs but overlaps with the mercury oxidation and is therefore not observed). The anodic peak observed at -0.17 V in curve 1 (Fig. 1) was obtained with an accumulation potential of -0.45 V . The measured half-peak width is 115 mV , which is wider than expected. The relatively high and slowly rising background current and the poorly defined peak made it difficult to determine exactly the copper peak height. Furthermore, an additional small peak was observed on the anodic side of the main peak, indicating occurrence of non-faradaic surface reactions from the adsorbed state [25,26].

Curve 2 (Fig. 1) was obtained using an accumulation potential of -1.6 V . Compared to curve 1, a more pronounced oxidation peak of copper was observed, together with a significant decrease in the background current. The peak current was increased by a factor of three, and the half-peak width was reduced to 85 mV (corresponding to a reversible one-electron

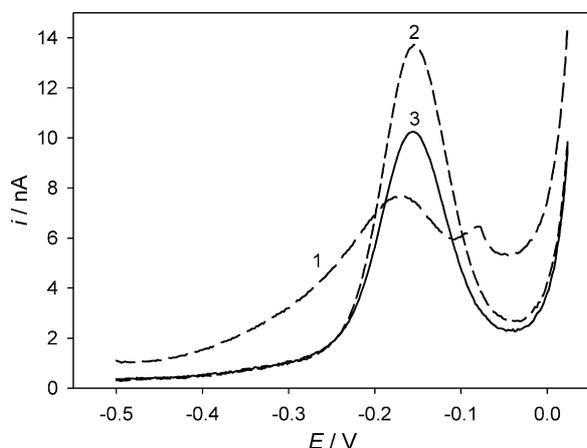


Fig. 1 – DPAS voltammograms of copper in seawater sample (sample 1) obtained using different experimental parameters: (1) $t_{\text{acc}} = 300 \text{ s}$ at $E_{\text{acc}} = -0.45 \text{ V}$; (2) $t_{\text{acc}} = 300 \text{ s}$ at $E_{\text{acc}} = -1.6 \text{ V}$; (3) $t_{\text{acc}} = 297 \text{ s}$ at $E_{\text{acc}} = -0.45 \text{ V}$ and $t_{\text{acc}} = 3 \text{ s}$ at $E_{\text{acc}} = -1.6 \text{ V}$.

charge transfer). Taking into account that more stable metal complexes also should be reduced at very negative potentials [12–17], the results obtained in curves 1 and 2 indicate that only approximately 30% of the total dissolved copper exists in labile metal complexes in the actual sample. However, on the basis of curve 3 (Fig. 1), a completely different conclusion is drawn. In this experiment, the same accumulation potential as in curve 1 (-0.45 V) was used for 297 s, and then for the last 3 s the applied potential was set to -1.6 V . The peak height decreased only by about 30% compared to curve 2, and the half-peak width remained surprisingly the same (87 mV). It is obvious that, by applying a very negative potential for only 1% of the total accumulation time, significant changes regarding the electrochemical processes at the mercury surface occur. This phenomenon is described in the literature for model solutions using extracted hydrophobic organic matter from seawater added to perchlorate supporting electrolyte [25]. It is supposed that the adsorbed SAS hinders the electrochemical reaction of copper during the stripping mode (curve 1) although, by applying a very negative potential, desorption of SAS takes place and produces a stripping peak without interferences (curve 3). The small difference between peak heights in curves 2 and 3 could be attributed to the actual difference between the fraction of labile and stronger metal complexes. If experiments are performed in such a way that initial potential is in the range of SAS adsorption (more positive than -1.1 V), some small portion of SAS will be adsorbed on the electrode surface during the equilibrium time and stripping time. However, as during this time the mass transfer is controlled mainly by the diffusion, the extent of adsorbed SAS could be considered as minor. To explore this phenomenon of SAS adsorption, experiments utilizing phase sensitive ac voltammetry were performed.

It is well known that adsorption of surface active substances (SAS) on a mercury electrode surface occurs usually in a potential range from 0.1 to -1.3 V [34–36]. Adsorption of SAS is usually the strongest in the range of an electrocapillary maximum of the mercury electrode (around -0.6 V) and depends both on the type of SAS and on the sample composition (major ions). The content of SAS in a natural sample could be easily quantified and characterized using phase sensitive ac voltammetry (phase angle = 90°) [34–36]. The procedure is based on the measurement of the capacitive current (or capacitance) at a potential of maximum adsorption (around -0.6 V) after applying an accumulation step (usually at accumulation potential of -0.6 V) during the chosen accumulation time. The resulting decrease in capacitive current corresponds to the concentration of SAS, while the capacitive current at zero accumulation time was taken as the reference value without adsorbed SAS. To explore these phenomena observed in Fig. 1, measurements of capacitive current at different accumulation potentials were performed (sample 1). Fig. 2 shows the differences in capacitive currents (related to the current at the most negative accumulation potential, -1.6 V) in relation to the accumulation potential. The procedure for curve 1 was the following: accumulation at desired potentials (during 60 s) followed by measurement of the capacitive current at -0.60 V , while for curve 2 at the end of accumulation time the potential of -1.6 V was applied for 1 s. It is evident that by applying the negative potential, almost a complete layer of

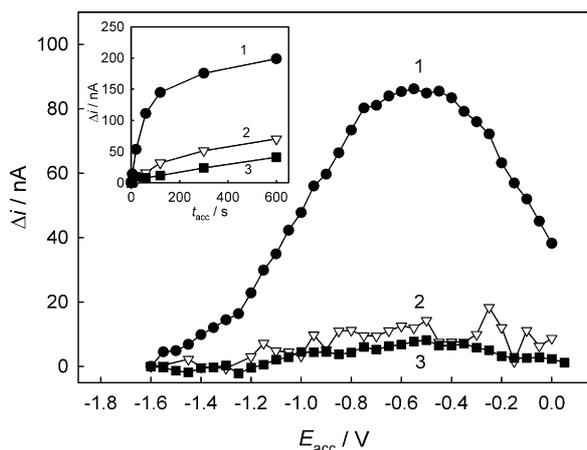


Fig. 2 – Difference of capacitive current (measured at -0.6 V) vs. accumulation potential obtained in seawater sample (sample 1) using accumulation time of 60 s and without (1) and with (2) 1 s at -1.6 V at the end of accumulation time (-1.6 V used as reference potential). Curve 3 corresponds to UV irradiated sample without desorption step. Inset: dependence of the difference of capacitive current on the accumulation time: (1) $E_{\text{acc}} = -0.6$ V; (2) $E_{\text{acc}} = -0.6$ V and $E_{\text{acc}} = -1.6$ V for 1 s; (3) $E_{\text{acc}} = -1.6$ V. Parameters: $f = 75.12$ Hz, $t_{\text{mod}} = 0.21$ s, $t_{\text{int}} = 0.61$ s, phase angle = 90° .

adsorbed SAS is removed from the mercury surface. From the inset to Fig. 2, it can be evaluated that a degree of surface coverage attained during 30 s at -0.6 V without the desorption step (curve 1) corresponds to the degree attained during 600 s of accumulation time for curve with the potential jump (curve 2). However, compared to the dependence obtained for the accumulation at only the most negative potential (-1.6 V, curve 3), some SAS still remained on the mercury surface. For comparison, measurements in a UV irradiated sample without using the desorption step was performed (curve 3). As the NOM was destroyed by the prolonged exposure of the sample to UV light (14 h), the observed effect of adsorbed layer decreased to less than 10% of that obtained in the UV untreated sample (curve 1).

From the results given in Figs. 1 and 2, it is obvious that the ASV of copper (curve 1, Fig. 1) is strongly influenced by the adsorbed SAS layer. The simple experiments presented above show that such undesired effects can easily be eliminated or reduced, giving more correct information about speciation.

3.2. Stripping chronopotentiometric (SCP) measurements

Usually, substances adsorbed on an electrode surface have more effect on voltammetric shape obtained using pulse techniques than using direct mode techniques. It was demonstrated in model electrolyte solutions that stripping chronopotentiometry (SCP) in depletive mode has an advantage over ASV in pulsed mode if adsorption processes take place at the electrode surface [21–24]. Because of NOM heterogeneity, such situations are likely to occur in analysis of natural water samples, and SCP should be taken into account

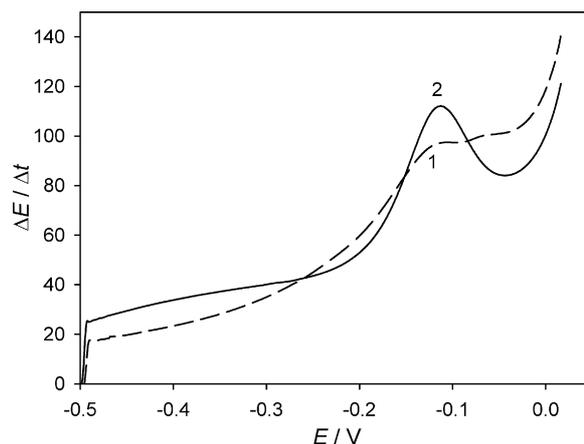


Fig. 3 – Stripping chronopotentiograms of copper in seawater sample (sample 1) obtained using different experimental parameters: (1) $t_{\text{acc}} = 300$ s at $E_{\text{acc}} = -0.45$ V; (2) $t_{\text{acc}} = 297$ s at $E_{\text{acc}} = -0.45$ V and $t_{\text{acc}} = 3$ s at $E_{\text{acc}} = -1.6$ V. $I_{\text{stripp}} = 2 \times 10^{-9}$ A. For both curves, an equilibrium potential of -0.5 V for 10 s was used.

in the measurement protocols as a comparative technique. In general, SCP offers better resolution/separation of adjacent peaks than ASV, but its detection limit is in most cases poorer than that of ASV.

Fig. 3 shows the stripping chronopotentiograms of copper in sample 1. According to the literature, SCP in depletive mode is recommended because all the accumulated metal is stripped out from the mercury, while at the same time slow oxidation produces less interferences on the mercury surface [23]. Thus, the stripping current of 2×10^{-9} A was applied in the stripping stage. Curve 1 is acquired by accumulation at -0.45 V during 300 s. Comparing to curve 1 in Fig. 1 a similar shape is obtained, but taking into account the background current, the copper peak is poorly defined, which supports the thesis of lower sensitivity of SCP compared to ASV in pulse mode. Small shoulder on the anodic side of the peak is also noticeable, indicating some surface reaction, probably non-faradic. Similarly to ASV, keeping the electrode for only three (3) seconds at the end of the accumulation time at a very negative potential (-1.6 V), resulted in a more pronounced peak (curve 2, Fig. 3). This experiment shows that, although the SCP in some cases is superior to ASV, in our sample of seawater the improvement of the signal resolution/evolution was not registered, and all the subsequent experiments were carried out employing only ASV.

3.3. Pseudopolarographic measurements

The influence of SAS adsorption on a mercury electrode on the shape of copper pseudopolarograms in the seawater sample (sample 2) was investigated. Copper pseudopolarograms were recorded without added copper, because relatively high concentration of copper was found in the sample (1.8×10^{-7} mol L $^{-1}$).

Fig. 4a shows two pseudopolarograms of copper obtained with different voltammetric parameters during the accumulation period. To exclude a possible change in the sample

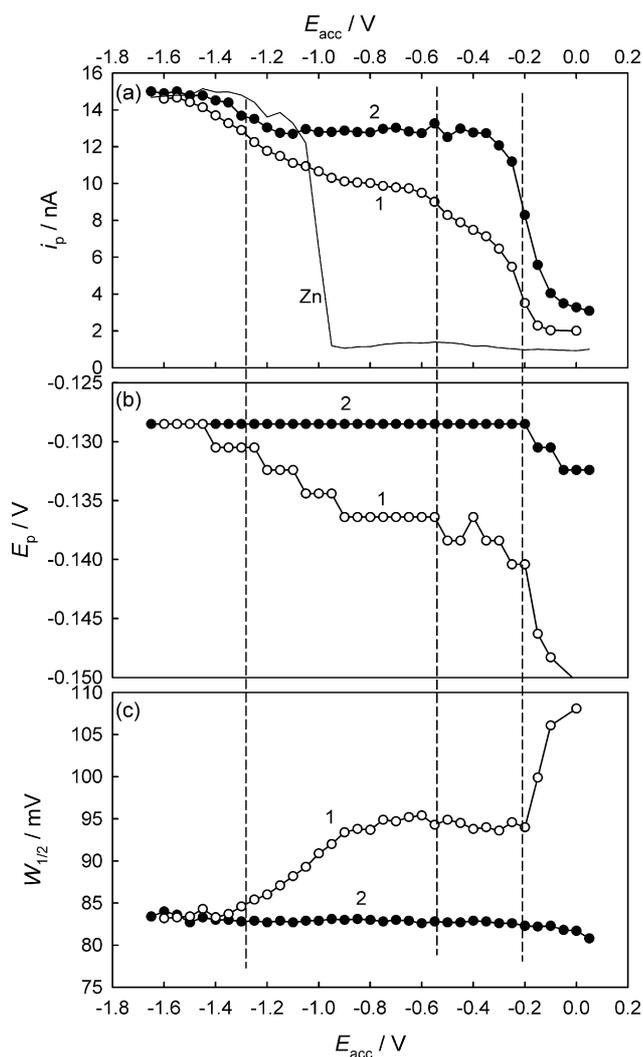


Fig. 4 – Pseudopolarograms of copper in seawater sample (sample 2) obtained without (curve 1) and with (curve 2) desorption step constructed using peak height (a), anodic peak potential (b) and half-peak width (c). Total accumulation time was $t_{acc} = 300$ s. Solid line in (a) corresponds to pseudopolarogram of zinc performed separately in a new sample (peak currents of zinc are scaled by factor of 0.75 to correspond to peak currents of copper).

properties and experimental conditions during prolonged measurements (several hours), the pseudopolarograms were recorded in a way that both voltammetric procedures (with 3 s of desorption time at -1.6 V and without it) were applied for each accumulation potential one after the other (in a commutation mode). As in previous figures, curve 1 represents the procedure performed without applying the desorption step, while for curve 2, a potential jump to -1.6 V for 3 s at the end of the accumulation time was applied. The difference between the two pseudopolarograms is obvious. Using the desorption step (curve 2), two very well defined waves were obtained. The first wave at a potential of -0.2 V corresponds to the reduction of labile copper complexes. In the potential range between -0.4 and -1.15 V, a wide plateau was

registered, which indicates that no reduction process of any additional copper species took place. At more negative potentials (< -1.15 V) the copper peak current increased, producing a wave that extended over the potential range of 300 mV. Several speculations could be drawn for this wave: (1) the reduction of a group of inert copper complexes with very high stability constants [9,12–15], (2) an intermetallic compound of Cu and Zn, which is formed in this range of potentials, usually increases the copper peak height [20,23], and (3) a decrease in SAS adsorption on the mercury surface with an increase in the accumulation potential to more negative values (see Fig. 2). The detailed analysis of the pseudopolarograms and additional measurements performed on separate samples showed that the first (1) scenario is the most probable one, i.e. the reduction of inert metal complexes. Assumption 2 was discarded by additional insight in the zinc pseudopolarogram (Fig. 4a), which shows that the rising part of the copper peak height started at potentials where the main portion of the limiting current of zinc pseudopolarogram has already been reached. In the case of formation of an intermetallic compound between Cu and Zn, the starting point of the wave should be more positive than what we observed. Assumption 3 is less probable than assumption 1 since by comparing Fig. 4b and c, it can be noticed that both the peak potential and the half-peak width in this potential range do not change after using the desorption step. As the increase of this wave, compared to the preceding plateau, is about 20%, it is to expect a small change in values of these two parameters (peak potential and half-peak width). This assumption is drawn on the basis of the dependences of peak potential and half-peak width on the accumulation potential without the desorption step, where a considerable change of these two parameters occurred (curves 1).

The three plots in Fig. 4 clearly evidence that the adsorbed layer of SAS has a significant impact on all three parameters of the voltammetric peak (height, potential and half-width). The intensity of this influence is dependent on the accumulation potential, as well as on the concentration of copper inside the mercury drop. The obtained results are in a very good agreement with our results obtained with ac voltammetry. At potentials more negative than -1.4 V the effect is negligible. However, by increasing the accumulation potential, the influence of SAS also increases and remains constant around the potential of maximal adsorption (~ -0.6 V). At accumulation potentials more positive than -0.2 V, the peak height decreased (reduction wave of labile copper) causing a shift in peak potential and broadening of the peak.

A detailed examination of curve 1 in Fig. 4a reveals three separate waves. The height of the first wave at -0.2 V barely reaches 50% of the equivalent wave using the desorption step (curve 2), while the wave at the more negative potential (around -1.3 V) expands from -0.9 to -1.5 V. An additional (third) poorly resolved wave appears at a potential around -0.5 V. Compared to curve 2, a considerable detachment is evident by applying the desorption step. As pointed out in several papers, the position, numbers, and shape of the pseudopolarographic waves is dependent on the metal complexes existing in the sample [10,12–23,37], and stability constants of labile metal complexes can easily be calculated [12–15,38]. The more negative pseudopolarographic wave that we obtained using

the desorption step corresponds to a thermodynamic stability constant of the formed complex in the order of $\log K \sim 39$ (estimated according to "chelate scale" previously presented by group of Luther III [12–15]). Such a high stability constant of copper complexes has previously been reported by pseudopolarography and ascribed to the complex formed with a ligand produced by cyanobacteria [13]. However, a more detailed study should be performed to confirm such an assumption for our sample.

Similarly to the more negative wave, the small (third) wave around -0.5 V observed on curve 1 could be assigned to the reduction of a copper complex. However, as this wave is not registered using the desorption step (curve 2), it is fully clear that its formation is the result of surface reactions on the mercury electrode caused by the adsorbed organic matter, and that metal complex does not exist in the bulk of the sample in sufficient concentration to produce measurable wave.

The curves representing the dependence of the peak position and half-peak width on the accumulation potential (Fig. 4b and c) show strong interaction of copper with ligands from the adsorbed layer during oxidation process and indicate formation of kinetically labile complexes which affect the peak position and half-peak width [26,28]. Although studies of such interactions are important and useful for interpretation of voltammetric data [28,35], the main goal in speciation measurements is characterization of trace metal interactions with ligands within the bulk of the sample [2]. Thus, any interference in the voltammetric measurement occurring at the surface of the electrode is inauspicious and should be avoided. This evident example shows a delicate situation, which could initiate inaccurate conclusion about metal speciation in natural water sample.

3.4. Determination of metal complexing capacity (MCC)

Determination of metal complexing capacity (MCC) is very often used as a method to characterize particular natural water, either as a parameter in metal speciation or the characterization of the natural organic matter (NOM) [1–5]. Copper is usually used as the target metal, because it forms the most stable complexes among metals which are easily determined by ASV. However, the above-mentioned complications regarding the adsorption of NOM in ASV are strongly pronounced in a stripping process of copper [25].

Fig. 5 shows an example of determination of copper complexing capacity (CuCC) in a brackish water sample (sample 3) using the two different protocols mentioned in previous sections. Curve 1 on each plot corresponds to the protocol without using the desorption step, while all curves 2 were obtained by applying a potential jump to -1.65 V for 3 s at the end of the accumulation time (297 s). The initial (ambient) copper concentration in the sample was $1.05 \times 10^{-8}\text{ mol L}^{-1}$. As the reduction of only labile fraction of copper is a prerequisite in CuCC determination, a proper accumulation potential of -0.5 V is selected on the basis of the copper pseudopolarogram shown in Fig. 4a, curve 2. The difference between the complexing curves recorded using the two protocols is evident (Fig. 5a). Although the shape is not strongly influenced, the relatively large difference in peak currents is obvious. The ratio of

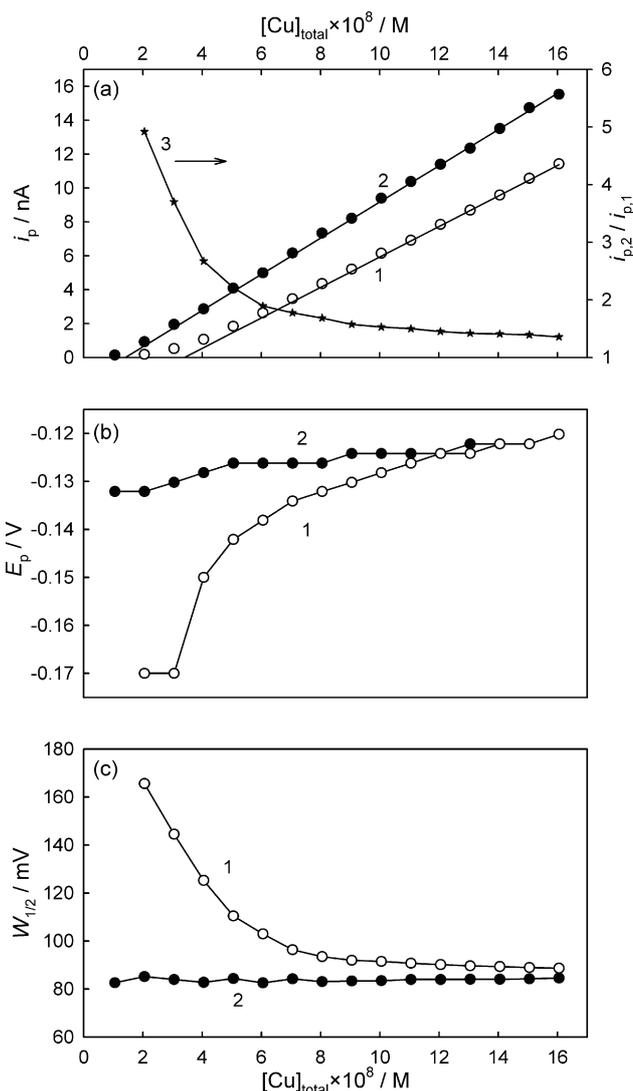


Fig. 5 – Copper ion titration curve for the determination of CuCC in brackish water sample (sample 3) without (curve 1) and with (curve 2) applied desorption step. Procedure parameters: total $t_{\text{acc}} = 300\text{ s}$, $E_{\text{acc}} = -0.5\text{ V}$, desorption potential, $E_{\text{acc}} = -1.65\text{ V}$. Curve 3 corresponds to peak height ratio of curve 2 and 1.

Table 1 – Ligand concentration, [L] and apparent stability constant, K' obtained in brackish water sample using two different protocols

	[L] (mol L^{-1})	K' ($\text{mol}^{-1}\text{ L}$)
Without desorption step	3.40×10^{-8}	4.14×10^8 ($\log K' = 8.62$)
With desorption step	1.41×10^{-8}	2.70×10^8 ($\log K' = 8.43$)

peak currents (curve 3) decreases by addition of copper, which indicates a relatively diminishing influence of the adsorbed SAS on copper electrochemical reactions occurring during the stripping step. Complexing capacity parameters (ligand concentration and stability constant) were obtained using the Ružić-van den Berg linearization method [39,40] assuming the 1:1 metal-ligand interaction (Table 1). Without the desorption

step, almost a 2.5 times higher concentration of complexing ligand was obtained, while the apparent stability constant increased only slightly. It is obvious that the increased ligand concentration obtained without the desorption step is the result of the adsorbed SAS. Although the absolute difference in ligand concentration is not large, it is evident that without the desorption step, the ligand concentration is overestimated. As a consequence, different speciation results concerning copper distribution in a particular sample are inevitable.

Very important parameter in the protocol of MCC determination is the sensitivity, which is used for transformation of peak heights into the concentration of metal found in the sample (this step is a prerequisite for all calculations in metal speciation studies using voltammetric methods) [5]. Usually, authors use the sensitivity obtained either in the range where, according to the titration curve, all sites are almost saturated (linear part of the plot) [39,41] or from the separately determined sensitivity in a UV digested sample (where all organic matter is destroyed) [31]. According to the theoretical calculations for metal complexes with known stability constants, the slope which corresponds to the titration curve without the ligands is never reached in real samples (only asymptotically approaching) [5]. The intensity of convergence depends on the stability constant of formed metal complexes. As the apparent stability constant is lower, higher concentrations of added metal are needed in order to be closer to the real slope, and the logarithmic model of metal addition is advisable [5]. If the slope/sensitivity obtained in the UV sample is used for data transformation, more erroneous results could be obtained, if the protocol without the desorption step is used (in the UV sample, SAS are destroyed and the effect of adsorbed SAS on the peak height vanishes, see curve 3 in Fig. 2). However, for the transformation of data obtained using the desorption step, the sensitivity obtained in the UV sample is recommended, but critical examination of both slopes should be done before the final data treatment/conversion.

4. Conclusion

As shown in many papers, the adsorption of natural organic matter (NOM) on the surface of working electrodes produces effects which interfere with electrochemical reactions of metal ions. Such interferences are amplified in ASV of copper in natural water samples. In this work, we used a protocol which utilizes desorption of the NOM to obtain reliable copper voltammograms, free of interferences. According to phase sensitive ac voltammetric measurements, most of the NOM is desorbed at potentials < -1.4 V. Application of a very negative potential in ASV at the end of the accumulation time for a short period of time (3 s) produced anodic peaks of copper free of artefacts. Although it is shown in the literature that stripping chronopotentiometry in the depletive mode is less sensitive to adsorption processes than ASV in the pulse mode, no benefit is obtained using this technique in measurements in natural samples without the desorption step. The application of desorption step could be very beneficial in ASV measurements using solid electrodes.

Recently, it was shown that pseudopolarography (and an analogue method, scanned stripping chronopotentiometry) is a powerful technique in the speciation of trace metals in natural waters. Various theories, describing probable conditions which could arise in such measurements, were developed and tested in model solutions. However, as the natural water is a mixture of many different compounds, it is very important to resolve/recognize processes which occur during the measurements. We showed that the adsorbed layer of NOM strongly influences a pseudopolarogram of copper, producing changes in its shape and intensity. It also influences the peak potential and half-peak width of single copper anodic voltammograms. Analysis of such pseudopolarograms according to theoretical postulates could lead to incorrect conclusions. Application of the desorption step produces very well resolved pseudopolarograms of copper, without any of the above mentioned drawbacks, which is a benefit in copper speciation consideration.

Similar benefits of the desorption step were registered in the determination of copper complexing capacity (CuCC). The adsorbed layer of NOM caused an apparent 2.5-fold increase in ligand concentration compared to the protocol which utilizes the desorption of NOM, while the conditional stability constant slightly increased. It is important to note that the amount of reduced copper from inert copper complexes during short desorption step at -1.6 V is negligible comparing to amount of labile copper reduced at more positive potentials (~ -0.5 V), which is prerequisite in determination of CuCC (desorption step usually contributes to only 1% of the total accumulation).

These experiments show the importance of distinguishing processes which occur as the consequence of metal complexation with ligands from the bulk of the solution, and processes arising as the product of a surface reaction with adsorbed ligands.

To eliminate the artefacts of the adsorption of NOM upon the copper speciation results using ASV, the application of described desorption step is recommended.

Acknowledgments

This work was accomplished within the framework of French project (grant no. 03/1214910/T) called MONALISA (Matière Organique Naturelle en milieu Salé). The grant of the University of the South -Toulon-Var for Ph.D. and researcher exchanges between France and Croatia, as well as financial supports of the Ministry of Science, Education and Sports of the Republic of Croatia (through grant no. 098-0982934-2720) are gratefully acknowledged.

REFERENCES

- [1] P.G.C. Campbell, in: A. Tessier, D.R. Turner (Eds.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, John Wiley & Sons, 1995, p. 45.
- [2] J. Buffle, *Complexation Reactions in Aquatic Systems; An Analytical Approach*, Ellis Harwood, Chichester, 1988.
- [3] G.E. Batley, S.C. Apte, J.L. Stauber, *Aust. J. Chem.* 57 (2004) 903.
- [4] R.M. Town, M. Filella, *Limnol. Oceanogr.* 45 (2002) 1341.

- [5] C. Garnier, I. Pižeta, S. Mounier, J.Y. Benaïm, M. Branica, *Anal. Chim. Acta* 505 (2004) 263.
- [6] H.P. van Leeuwen, R.M. Town, J. Buffle, R.F.M.J. Cleven, W. Davison, J. Puy, W.H. van Riemsdijk, L. Sigg, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 8545.
- [7] S. Bubić, M. Branica, *Thalassia Jugoslav.* 9 (1973) 47.
- [8] D. Omanović, M. Branica, *J. Electroanal. Chem.* 543 (2003) 83.
- [9] D. Omanović, M. Branica, *J. Electroanal. Chem.* 565 (2004) 37.
- [10] D. Omanović, *Croat. Chem. Acta* 79 (2006) 67.
- [11] H.P. van Leeuwen, R.M. Town, *J. Electroanal. Chem.* 536 (2002) 129.
- [12] B.L. Lewis, G.W. Luther III, H. Lane, T.M. Church, *Electroanalysis* 7 (1995) 166.
- [13] P. Croot, J.W. Moffet, G.W. Luther III, *Mar. Chem.* 67 (1999) 219.
- [14] J.J. Tsang, T.F. Rozan, H. Hsu-Kim, K.M. Mullaugh, G.W. Luther III, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 5388.
- [15] T.F. Rozan, G.W. Luther III, D. Ridge, S. Robinson, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 3845.
- [16] R.M. Town, M. Fillela, *J. Electroanal. Chem.* 488 (2000) 1.
- [17] G. Branica, M. Lovrić, *Electrochim. Acta* 42 (1996) 1247.
- [18] J. Murimboh, M.T. Lam, N.M. Hassan, C.L. Chakrabarti, *Anal. Chim. Acta* 423 (2000) 115.
- [19] I.I. Fasfous, C.L. Chakrabarti, J. Murimboh, T. Yapici, *Environ. Chem.* 3 (2006) 276.
- [20] P. Chakraborty, I.I. Fasfous, J. Murimboh, C.L. Chakrabarti, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 463.
- [21] N. Serrano, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *J. Electroanal. Chem.* 560 (2003) 105.
- [22] R.M. Town, J.-P. Pinheiro, R. Domingos, H.P. van Leeuwen, *J. Electroanal. Chem.* 580 (2005) 57.
- [23] R.M. Town, H.P. van Leeuwen, *Croat. Chem. Acta* 79 (2006) 15.
- [24] N. Serrano, J.M. Díaz-cruz, C. Arino, M. Esteban, J. Puy, E. Companys, J. Galceran, J. Cecilia, *J. Electroanal. Chem.* 600 (2007) 275.
- [25] G. Scarano, E. Bramanti, *Anal. Chim. Acta* 277 (1993) 137.
- [26] M. Boussemart, L. Menargues, J. Benaïm, *Electroanalysis* 5 (1993) 125.
- [27] M. Plavšić, D. Krznarić, B. Čosović, *Electroanalysis* 6 (1994) 469.
- [28] M.G. Bugarin, A.M. Mota, J.P. Pinheiro, M.L.S. Gonçalves, *Anal. Chim. Acta* 294 (1994) 271.
- [29] A.E. Witter, S.A. Mabury, A.D. Jones, *Sci. Total Environ.* 212 (1998) 21.
- [30] M.P. Hurst, K.W. Bruland, *Anal. Chim. Acta* 546 (2005) 68.
- [31] K.W. Bruland, E.L. Rue, J.R. Donat, S.A. Skrabal, J.W. Moffett, *Anal. Chim. Acta* 405 (2000) 99.
- [32] K.A. Hunter, P.S. Liss, *Organic sea surface films*, in: E.K. Duursma, R. Dawson (Eds.), *Marine Organic Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 1982, p. 259.
- [33] A. Nelson, R.F.C. Mantoura, *J. Electroanal. Chem.* 164 (1984) 237.
- [34] B. Čosović, V. Vojvodić, *Mar. Chem.* 28 (1989) 183.
- [35] M. Plavšić, B. Čosović, *Anal. Chim. Acta* 284 (1994) 539.
- [36] B. Gašparović, B. Čosović, *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 58 (2003) 555.
- [37] I. Pižeta, G. Billon, D. Omanović, V. Cuculić, C. Garnier, J.-C. Fischer, *Anal. Chim. Acta* 551 (2005) 65.
- [38] D.D. DeFord, D.N. Hume, *J. Am. Chem. Soc.* 73 (1951) 5321.
- [39] I. Ružić, *Anal. Chim. Acta* 140 (1982) 99.
- [40] C.M.G. van den Berg, *Mar. Chem.* 11 (1982) 323.
- [41] B. Gašparović, M. Plavšić, B. Čosović, A. Saliot, *Mar. Chem.* 105 (2007) 1.



available at www.sciencedirect.com



journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca



Study of interactions of concentrated marine dissolved organic matter with copper and zinc by pseudopolarography

Rudy Nicolau^{a,d}, Yoann Louis^a, Dario Omanović^b, Cédric Garnier^{a,c}, Stéphane Mounier^a, Ivanka Pižeta^{b,*}

^a Laboratoire PROTEE, Université du Sud Toulon - Var - BP 132, 83957 La Garde, France

^b Center for Marine and Environmental Research, Ruđer Bošković Institute, P.O. Box 180, 10002 Zagreb, Croatia

^c Groupe de Physico Toxico Chimie des Systèmes Naturels, Institut des Sciences Moléculaires (ISM - UMR CNRS 5255), Université Bordeaux I, 33405 Talence, France

^d GRESE, ENSIL, Université de Limoges, 16 rue Atlantis, 87068 Limoges cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 November 2007

Received in revised form

14 April 2008

Accepted 16 April 2008

Published on line 24 April 2008

Keywords:

Dissolved organic matter

Pseudopolarography

Copper

Zinc

Metal speciation

Sea water

ABSTRACT

The interaction of dissolved organic matter (DOM) with copper and zinc in a concentrated seawater sample was characterised by pseudopolarography. Measurements performed at increased concentrations of copper(II) ions showed successive saturation of active DOM sites which indicate possible partition of copper between (i) free or labile complexes, (ii) reduced and released within the potential window of the method, and (iii) electroinactive copper complexes. Pseudopolarograms measured at pH 4 indicate a release of copper which was bound to the active sites of DOM that formed non-labile complexes. Variation of the peak position and half-peak width along the scanned deposition potentials and with the increasing concentration of copper bear the information about the complex electrochemical processes at the electrode surface and in the bulk of the solution. Pseudopolarograms of zinc showed a strong dependence of the peak current and the peak position along the scanned deposition potentials on pH values, indicating preferentially complexation of zinc with carboxylic-like active sites of DOM in the measured sample. Pseudopolarography is a valuable method in the trace metal complexation and speciation studies, serving as a fingerprint of the analysed sample.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Dissolved organic matter (DOM) in natural aquatic systems, such as marine waters and estuaries, is well known to interact with metals and organic pollutants, thus modifying their speciation and subsequently their transport, fate, and bioavailability towards micro- and macro-organisms [1–2]. Organic pollutants–DOM associations occur mostly due to the DOM hydrophobic nature, and are simply characterised by par-

titution coefficients (K_{DOC}), often correlated to the octanol/water partition coefficient (K_{ow}) [3]. In contrast, metal ions–DOM associations, although often of great intensity (e.g. more than 99% of Fe^{III} or Cu^{II} are strongly bound by organic ligands in surface seawaters [4–6]), are metal- and DOM-specific complexes, dependent on the physico-chemical conditions: ionic strength, pH, presence of other major and trace cations. Characterisation of the DOM binding properties has been a subject of numerous studies, leading to the development of analyti-

* Corresponding author. Tel.: +385 1 4680 231; fax: +385 1 4680 231.

E-mail addresses: rudy.nicolau@ensil.unilim.fr (R. Nicolau), louis@univ-tln.fr (Y. Louis), omanovic@irb.hr (D. Omanović), c.garnier@ism.u-bordeaux1.fr (C. Garnier), mounier@univ-tln.fr (S. Mounier), pizeta@irb.hr (I. Pižeta).

0003-2670/\$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.aca.2008.04.038

cal techniques and modelling tools (e.g. [7–9]). However, due to low organic carbon content ($0.1\text{--}1\text{ mgC L}^{-1}$) and trace levels of metals (rarely higher than several nmol L^{-1}), a study of DOM–metal binding properties in unpolluted marine waters still remains a challenge.

In order to understand the role of the marine DOM in metals speciation, various techniques have been used ([10], and references cited therein). Among them anodic stripping methods offer satisfactory sensitivity and selectivity and could provide useful information about the DOM–metal association (complexing parameters) required by the mathematical speciation programs [11–13]. Titration of the marine DOM with metals (preferably in a non-linear addition mode [14]) and/or methods based on ASV measurement at different deposition potentials (pseudopolarography, pseudovoltammetry or scanned (deposition potential) stripping technique) were widely used to accomplish this [15–28].

Pseudopolarography and analogues techniques have been used for speciation studies for the last 30 years [15–28]. But, as it is a time-consuming technique, it has seldom been used until the last decade, when new computer-controlled instruments offered the possibility to automate the whole process. The theory and experimental verification of pseudopolarography [15–23] and scanned stripping chrono-potentiometry [24,25] are well described. The main benefit of using pseudopolarography when compared to the classical polarography/voltammetry is the possibility to measure speciation at natural concentration level of trace metals ($<10^{-8}\text{ mol L}^{-1}$). This technique allows discrimination/separation of different fractions of metals, from the electrochemically labile to the inert ones, regarding the analytical window of the method. It is successfully applied for the speciation of metals in model solutions and in natural waters, both for the labile and for the inert metal complexes. According to the theory and to experimental evidences [15–17,22], one or more reduction waves could be obtained (similarly like in classical polarography) which correspond to one labile and/or to one or more inert metal complexes. The position of those waves (half-wave potentials) depends on the corresponding stability constants of the formed metal complexes. Although the theory for inert metal complexes is valid only for the standard electrode potentials [16], experimentally obtained dependence of the reduction half-wave potential on the stability constants (“chelate scale”) was successfully applied for the estimation of the stability constants of unknown inert metal complexes in natural waters [19–22]. Since the DOM is of complex and heterogeneous nature, complications such as its adsorption on electrode surface could occur and lead to erroneous results [29–31]. Thus, special attention should be given to the interpretation of obtained results.

In an unpolluted marine environment, average DOM concentration is about 1 mgL^{-1} . In such clean seawater systems the determination of complexing parameters by stripping voltammetry was often achieved near the detection limit or resolution capability of the method [14]. So, the opportunity has been taken to join the project which concentrated the DOM in a marine sample [32], and to analyse its interactions with metal by pseudopolarography, exploring and showing more clearly the possibilities of the method.

The objective of this work is to explore the pseudopolarographic behaviour of the copper and zinc complexes present in the seawater sample with high concentration of DOM. An attempt has been made to extract some quantitative data regarding the metal complexes in the sample and to point out certain features of the pseudopolarographic approach as a kind of “finger-print” method.

2. Experimental

2.1. Sample preparation

The seawater sample was taken in the coastal area of southern France. The sampling site (bay of Balaguier: $43^{\circ}05'51.70''\text{N}$ – $5^{\circ}54'28.5''\text{E}$), in the bay of Toulon, is interesting as a semi-enclosed area subjected to different anthropogenic activities: a military port, tourism and aquaculture activities. The sample was taken at 1-m depth in the middle of the bay with a Teflon membrane pump (RETSCH GMBH) connected to a N_2 bottle, filtered in-line through a $0.22\text{ }\mu\text{m}$ -filter Whatman, Polycap 150TF. 940 L of filtered sample was stored in Nalgene bottles (20 and 50 L) at 4°C in the dark before concentration.

Within the framework of a French research project (called MONALISA for Matière Organique Naturelle en milieu SALé), coordinated by IFREMER (French Research Institute for Exploitation of the Sea), a new methodology has been developed to concentrate marine DOM in large volumes (500–1000 L), using two subsequent concentrations steps: nanofiltration followed by reverse-osmosis [32]. The concentration step is necessary to obtain a sufficient quantity of DOM for the subsequent characterisation of its properties by other MONALISA participants by using NMR ^{13}C , NMR ^{113}Cd , pyrolysis–GC–MS, HPSEC and acido-basic titrations. The method was conducted in two steps: (1) with osmosis equipment (TIA) by nanofiltration (Osmonics DL2540) from 940 L of filtered sample of the salinity $S=37$ and $\text{DOC}=1.1\text{ mgL}^{-1}$, the sample reached 32 L with an addition of MilliQ water at the end to decrease the salinity to the value of $S=10.2$ and $\text{DOC}=10.8\text{ mgL}^{-1}$, and (2) with reverse-osmosis (Filmtec SW30–2540) the final 10.5 L of the sample with the salinity of $S=28$ and $\text{DOC}=30.4\text{ mgL}^{-1}$ was obtained. The obtained DOM concentrated sample, stored in the dark at 4°C after spiking with NaN_3 ($100\text{ }\mu\text{L}$ of 0.1 mol L^{-1}) to prevent any biological activity, was subsequently analysed with voltammetric methods by the addition of copper(II) ions and by changing the pH of the sample.

2.2. Chemicals, instrumentation and measurement protocol

A copper stock solution was prepared using a salt of copper nitrate trihydrate of reagent grade (MERCK, Darmstadt). Samples were acidified using 69% HNO_3 (J.T. Baker). All measurements were carried out with voltammetric analyser PGSTAT 12 with GPES 4.9 software (EcoChemie, Utrecht, The Netherlands) coupled to a three-electrode system of a Metrohm 663 VA Stand. The working electrode was a static mercury drop electrode (SMDE) (drop area of 0.25 mm^2). All potentials were referred to $\text{Ag|AgCl|KCl } 3\text{ mol L}^{-1}$ reference

electrode. A carbon rod was used as a counter electrode. The electrolyte solution was stirred at 3000 rpm using a Teflon rotating stirrer. To minimise adsorption of metal ions a Teflon electrochemical cell was used. Before each measurement all vessels, the cell and electrodes were cleaned with 10% (analytical grade) nitric acid and rinsed with ultra-pure MilliQ-water. pH was controlled by a pH meter (Metrohm 713) with a combined pH-micro-electrode (Mettler, Inlab422, reference: Ag|AgCl|KCl 3.0 mol L⁻¹).

For each experiment, 20 mL of sample was placed in the voltammetric cell. Dissolved oxygen was removed from the solution prior to the measurements by purging with water-saturated nitrogen for 15 min and a nitrogen blanket was maintained above the sample surface during the measurement. Measurement protocol: total metal concentrations were determined by standard additions of Cu and Zn ions by differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV) after UV-irradiation (Hanovia, 450 W medium Hg pressure, 12 h) at acidic pH. Voltammograms for pseudopolarography were recorded using DPASV with the following measurement parameters: deposition potential $E_{\text{dep}} = -1.6$ to -0.020 V in steps of 0.020 V (altogether 80 scans), deposition time $t_{\text{dep}} = 360$ s, pulse amplitude $A = 25$ mV, interval time $t_{\text{int}} = 0.15$ s, modulation time $t_{\text{mod}} = 0.04$ s, step increment $E_{\text{st}} = 0.002$ V, initial potential $E_i = -1.2$ V, final potential $E_f = 0.01$ V. An equilibration at -1.2 V for 15 s was applied at the end of the accumulation period. During this period, desorption of adsorbed surface active substances on the mercury surface occurs, preventing negative effects on the copper anodic peak [31]. A home-written program incorporated in the Project mode of the GPES software was used to automate pseudopolarographic measurements. The voltammetric parameters (peak height, peak position and half-peak width) were automatically determined by the home-written software, as well.

3. Results and discussion

The purpose of this work was a pseudopolarographic study of copper complexes in concentrated seawater sample. As the procedure of voltammetric measurements included a zinc oxidation peak as well, it was found very interesting to present and to try to interpret behaviour of zinc pseudopolarograms in addition to the copper ones. The formation of CuZn intermetallic compound is not likely to occur, because of much lower concentrations of copper and zinc in our experiments when compared to those reported in literature, which should be in a milli-molar range [33,34].

While in the original sample total copper(II) concentration was found to be $(1.48 \pm 0.12) \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, the concentration was 100 times higher $(1.43 \pm 0.17) \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ in the concentrated sample. Total zinc concentration in the concentrated sample was $(3.9 \pm 0.3) \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Dissolved organic carbon (DOC) before and after pre-concentration was 1.1 and 30.4 mg L⁻¹, respectively. This showed that during the concentration process ratios of analytes were changed, but it is not the subject of this study.

A set of anodic stripping voltammograms obtained in a concentrated seawater sample without metal additions

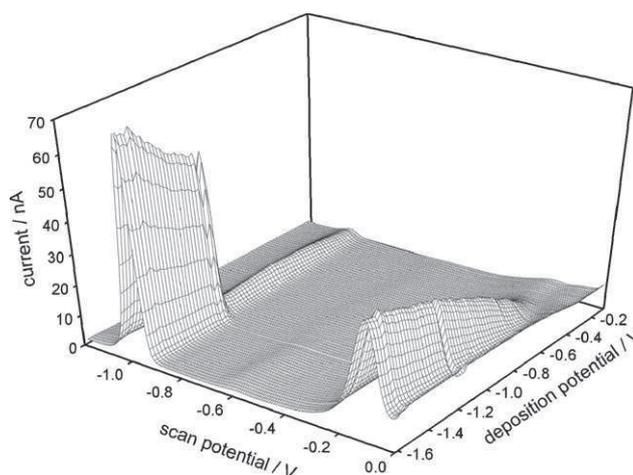


Fig. 1 – Set of voltammograms of pure concentrated sample of pH 8.3. Measurement parameters: DPASV method; E_{dep} interval: from -1.6 to -0.02 V in steps of 20 mV, $t_{\text{dep}} = 360$ s, $A = 25$ mV, $t_{\text{int}} = 0.15$ s, $t_{\text{mod}} = 0.04$ s, $E_{\text{st}} = 0.002$ V, $E_i = -1.2$ V, $E_f = 0.01$ V.

appears in Fig. 1. Two well separated and expressed peaks related to zinc (~ -1.0 V) and copper (~ -0.18 V) are evident, ensuring the accurate and reliable peak parameters read outs needed for the construction of corresponding pseudopolarograms. It is interesting to note that although total copper concentration was 3.5 times higher than that of zinc, the obtained anodic peak of copper (at $E_{\text{dep}} = -1.6$ V) was about half of that of zinc. Taking into account that copper in chloride solutions undergoes one-electron charge transfer [35] and that the sensitivity is half of that required for two-electron charge transfer, still remains the factor of 3.5 to be explained. Such a smaller copper peak could be attributed to the presence of its organic complexes which are either (i) non-electroactive at this potential, (ii) have much lower diffusion coefficient from that of free/labile copper, or both of this. This example simply illustrates that experiments performed in natural samples should be very carefully analysed in respect to the expected theoretical behaviour.

3.1. Pseudopolarograms of copper

Experimental conditions and labelling of the results are summarised in Table 1 and are valid for Figs. 2–4. Fig. 2a shows untreated pseudopolarograms obtained without added copper and with additions of 4×10^{-6} and 8×10^{-6} mol L⁻¹ of copper(II) ions at natural pH 8.3 and 4. In addition, two pseudopolarograms at pH 2 were also recorded for the two additions of copper, but they were practically the same as the pseudopolarograms obtained at pH 4 (data not shown). The three dotted lines correspond to the peak currents anticipated for reduction of only free/labile inorganic copper complexes (in DOM-free sample). These values were obtained according to the sensitivity obtained in UV-digested sample at natural pH. To get better overview and relations between pseudopolarograms, each of them was normalised to the above-mentioned projected currents in non-complexing media (i_{NC}) (Fig. 2b).

Table 1 – Additions of copper to the sample containing $(1.43 \pm 0.17) \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ copper (II) ions

Cu(II) added (mol L^{-1})	pH	Symbols	Curve labelling
–	8.3	○	1a
–	4	●	1b
4×10^{-6}	8.3	□	2a
4×10^{-6}	4	■	2b
4×10^{-6}	2	⊠	2c
8×10^{-6}	8.3	◇	3a
8×10^{-6}	4	◆	3b
8×10^{-6}	2	⬠	3c

Conditions and labelling of the curves.

The shapes of the copper pseudopolarogram without addition and for the first addition of copper (curves 1a and 2a) clearly show that the wave which corresponds to the reduction of the free/labile copper species has not appeared. Only continuous increase of the peak current starting from $E_{\text{acc}} = -0.25 \text{ V}$ was evolved. However, for second addition of copper (curve 3a) an evolution of the wave at $E_{\text{acc}} = -0.2 \text{ V}$ occurred. This indicates a marked increase in concentration of free copper ion and its labile complexes comparing to copper–organic complexes. Several interpretations could be given for the continuous increase of the peak current at the accumulation potentials more negative than -0.3 V (for all three pseudopolarograms at pH 8.3). Many authors reported that an increase of the peak current more negative than

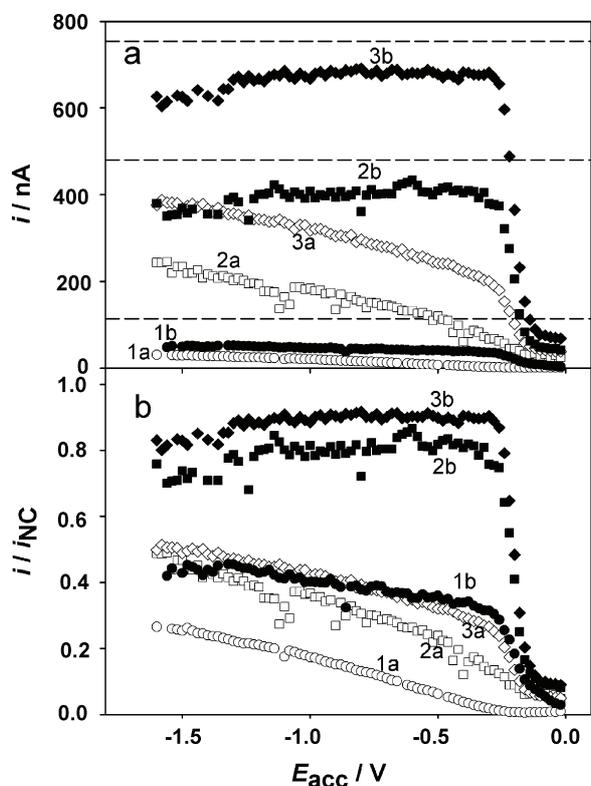


Fig. 2 – Peak current pseudopolarograms of copper (a) row data and (b) data normalised to current expected for non-complexed copper (i_{NC}). Conditions and labelling of the curves are given in Table 1.

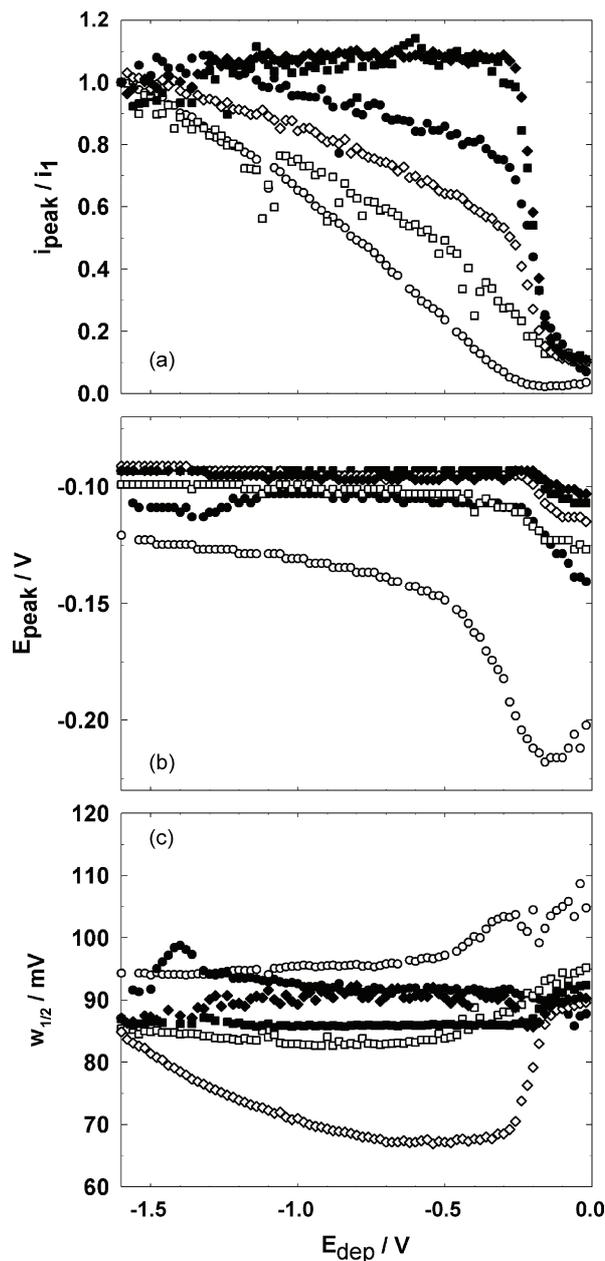


Fig. 3 – (a) Pseudopolarograms from Fig. 2 with the current normalised to the first point; (b) peak position vs. deposition potential curves of copper; (c) half-peak width vs. deposition potential curves of copper. Conditions and labelling of the curves are given in Table 1.

reduction potential of free/labile copper corresponds to the reduction of various copper organic complexes [16–22]. Two or more well separated waves could be obtained depending on metal complexes having different stability constants [16,19–22,36]. Several papers by the group of Luther III showed that thermodynamic stability constants of inert metal complexes could be estimated according to the formed “chelate scale” [19–22].

However, there are two completely distinct approaches concerning both, determination of complexing capacity and

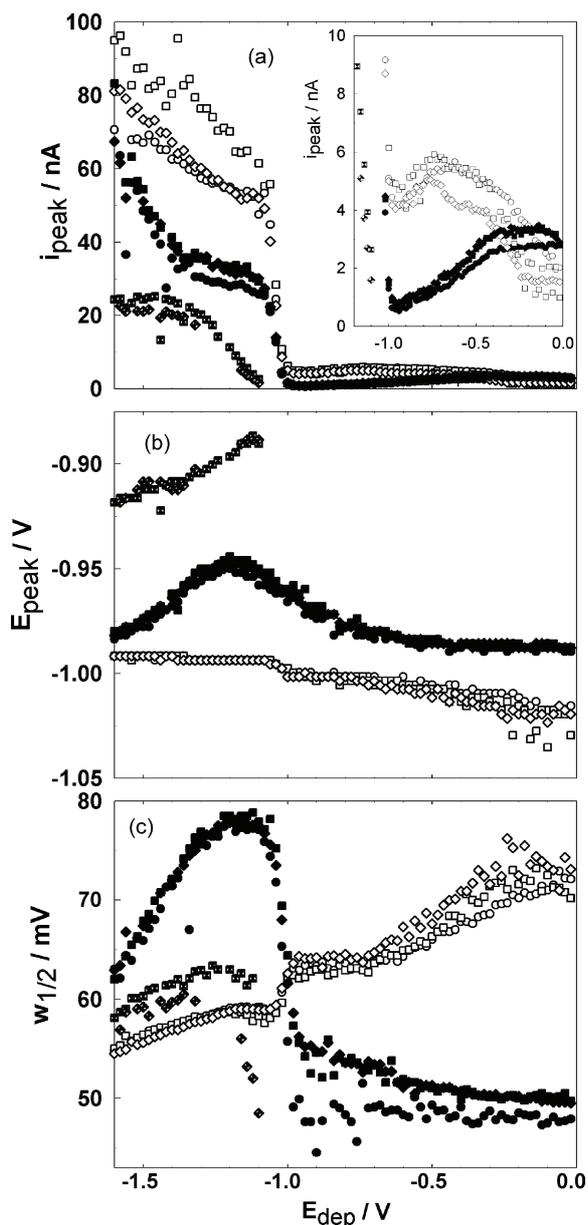


Fig. 4 – (a) Peak current pseudopolarograms of zinc. Inset: detail of Fig. 4a; (b) peak position vs. deposition potential curves of zinc; (c) half-peak width vs. deposition potential curves of zinc. Conditions and labelling of the curves are given in Table 1.

pseudopolarography. The first approach considers the difference in diffusion coefficients of labile complexes as minor, while the direct reduction of inert metal complexes takes place at potentials more negative than labile metal complexes [16,19–22,36]. In this case two or more reduction pseudopolarographic waves could be obtained. This approach is most widely used in the literature. The second approach assumes that all complexes are labile, and that there is only one pseudopolarographic wave having a flat limiting current controlled by the mean diffusion coefficient of both weak and strong metal complexes [17,28,37]. However, many authors recorded

pseudopolarograms in a relatively narrow range of deposition potentials and there was no opportunity to see possible evaluation of pseudopolarographic waves of other directly reduced inert metal complexes [17,28].

Both approaches are very strict and often do not consider other possible options. Both approaches should be respected in the interpretation of the voltammetric data obtained in natural water samples. Taking everything mentioned above into consideration, there are no severe anchorages to apply one of those two approaches to our results to be able to extract some quantitative information at natural pH. The main unknown parameter is the diffusion coefficient which cannot be determined from this set of data. However, despite the lack of quantitative data, some relations could be assigned.

The shapes of all three pseudopolarograms at pH 8.3 showed increasing peak current trend towards negative potentials, without reaching a plateau in the analytical window of the method. It is reasonable to assume that this trend would continue for more negative potential which were not scanned in our experiments.

The parameters of the plateau could only be explained by speculations, because there are two unknown terms which were discussed above (diffusion coefficients and electroactivity and (non)lability of copper complexes). Gradual increase of peak current at potentials more negative than -0.3V reflects the loss of lability of copper heterogeneous complexes [17] and could be assigned to the gradual reduction of numerous copper (inert) organic complexes having increasing stability constants [20]. In such a system the calculation of any binding parameter is precluded even for known sample composition [17]. However, as the diffusion coefficients and the electro(in)activity of all strong inert copper complexes in the sample are unknown it is not possible to declare the quantity of copper species. The absence of the wave of free/labile copper on the pseudopolarogram obtained without the copper addition implies that copper in this concentrated sample exists mainly in a form of relatively strong inert complexes. By gradual addition of copper, the distribution of copper species was changed thus forming more labile complexes, finally for the second addition of copper producing an evident wave. The position of this wave (Fig. 2, curve 3a) matched those obtained in the acidified sample (Fig. 2, curves 1b, 2b and 3b). Normalised pseudopolarograms at pH 8.3 show this evident increase of labile copper complexes with increasing concentrations of copper (Figs. 2b and 3a).

The acidification of the sample leads to the redistribution of copper complexes. The redistribution of the organic fraction of copper complexes to inorganic forms during the acidification is a consequence of competition between Cu^{2+} and H^{+} for DOM binding sites that regards a part of carboxylic-like sites. The part of phenolic-like DOM sites with strong affinities towards proton was not importantly influenced as shown by Lu and Allen on concentrated freshwater DOM [8] (presuming the general distribution of DOM binding sites onto carboxylic-like sites (average pK_a of 4.5) and the phenolic-like ones (average pK_a of 10) [38]). Three pseudopolarograms measured at pH 4 show that a large part of copper was released from its inert complexes. Limiting currents of pseudopolarograms for two copper additions approached the projected level

for non-complexed copper. The difference between expected and obtained limiting current for all three pseudopolarograms remained the same, implying that not all of strong copper inert complexes (reduced within the scanned deposition potentials) were destroyed at pH 4. The portion of these complexes became smaller with a higher copper concentration which is illustrated in the normalised plot (Fig. 2b). These relations indicate that at such relatively weak acidic conditions (pH 4) the proton is a strong competitor to copper for these active sites of DOM, implying existence of weaker copper complexes in the sample solution. Additional experiments in the same concentrated sample involving competition with proton and calcium were already done and the paper is under submission.

It is evident from this entire consideration that numerous different experiments should be performed in the same sample to be able to correctly interpret obtained data in a manner of trace metal speciation of a particular natural water sample. Such an analysis can serve operationally to characterise a sample and to compare the sample with another one. In this way, pseudopolarograms of trace metals could be considered as a "fingerprint" of the sample.

In Fig. 3a pseudopolarograms are normalised to the most negative point. This transformation graphically illustrates the ability of the sample to complex copper(II) ions by either, the addition of copper or by changing of pH. The relationships of the peak potential and the half-peak width vs. deposition potential curves could provide additional information about electrochemical reactions (Fig. 3b and c). There is a clear distinction of the peak potentials of the copper anodic peak potentials obtained in samples with and without copper additions. This might indicate the existence of a fraction of labile copper(II) complexes which were concealed with higher copper(II) additions, this resulted in a peak shift towards more positive potentials. Shift towards more negative potentials when the deposition potential approaches peak potential has already been noticed [17,26,39-42] and was ascribed to the existence of strong complexing ligands concentrated at the electrode surface. Half-peak width bears also some information. Its accurate determination is subjected to disturbances like humps affecting a baseline subtraction procedure and should be taken with attention. However, it should be considered of great interest as it could indicate, for example, the existence of two closely overlapped peaks that might come from adsorption processes, and could be a motivation for further investigation. The half-peak width of copper oxidation is about 90 mV that corresponds to one-electron charge transfer, as expected in a seawater sample [35].

3.2. Pseudopolarograms of zinc

Eight pseudopolarograms of zinc, analogous to those of copper, were drawn by tracing the peak of oxidation of zinc in the same experiments as those described for copper. Similarly shaped pseudopolarograms were obtained in natural, non-concentrated sea water sample taken in the same bay of Toulon, France (data not shown). It is a good argument for accepting the proposed concentration procedure for the DOM investigation. In Fig. 4a the zinc peak current pseudopolarograms are shown in absolute values. Fig. 4b and c show the

peak potential and the half-peak width vs. deposition potential curves of zinc. There is a strong dependence on pH that affects peak height, peak position and half-peak width, and groups the signals accordingly.

Pseudopolarograms of the samples acidified to pH 2 have a particular shape. Their amplitude is lower (indicating possible blocking of the electrode by adsorption of protonated DOM) and they shifted negatively (variation about 200 mV), with a remarkable change of slope (indicating a quasi-reversible or irreversible cathodic reaction [23,36]). At the same time, peak potentials are about 60-70 mV more positive than for other conditions (pH 8.3 and 4), which might indicate the missing of some labile complexes that would shift the peaks negatively ([43], p. 49). The half-peak widths of the single curves indicate a simple reversible two-electron reaction ([44], p. 129).

Regarding the complexation with DOM "the tails" of the pseudopolarograms representing the peaks of oxidation of zinc appeared to be of interest, while the deposition potential was more positive than the reduction potential, shown in detail in the inset of Fig. 4a. The maximum value of the tail moves from about -0.7 V for the natural pH to about -0.2 V for the pH 4. The tail does not exist at pH 2. At that pH most of the DOM is protonated and is not capable of complexing with zinc. Either adsorbed at the electrode or not, it does not help the accumulation of zinc at the electrode either during the deposition time or during the scanning time. As the tail exists at pH 4, one might conclude that the competition effect between Zn^{2+} and H^+ towards the DOM binding sites in favour of H^+ prevalently occurs at the pH below 4, in contrast to Cu (see Section 3.1). It points out the important quantity of complexing sites of carboxylic type [8,45-47]. It also reveals that Zn-DOM binding sites and Cu-DOM ones are not identical. As the strength of Cu-DOM interactions is generally larger from that of Zn-DOM ones [6] and the total Cu concentration is increased, it is probable that Zn is not bound by the Cu-specific DOM sites, which are assumed to be of phenolic-like type (see Section 3.1), but by less strong sites with acidic properties supposed to be of carboxylic-like type that cover the pK_a range of 1-7 [8,38]. This hypothesis has already been expressed to explain the weak competition effect between Cu and major divalent cations towards DOM binding sites [8].

A closer insight in the peak position and half-peak width vs. deposition potential curves (Fig. 4b and c) shows the redistribution of labile zinc species which was reflected in the peak position shift correlated with changing of pH, particularly complex shifting and width changing of the peak at pH 4. As mentioned previously, the presence of labile complexes is manifested by the shifting of the peaks in negative direction. However, the possible causes of the shifting of peaks vs. deposition potential are manifold. Taking into account the entire effects one might speculate about the adsorption of neutral organic matter: it is favoured at the potential of zero charge of the mercury drop, or the adsorption of charged species would influence the signal at the more extreme negative or positive potentials [48]. However, these effects appear to be interesting for further qualification of organic matter and for differentiation of the various dissociation constants of the numerous groups of organic ligands

that could be traced by the combination of pH titration and pseudopolarography.

4. Conclusions

The ability of DOM to complex copper has been tested on a seawater sample concentrated by nanofiltration and reverse osmosis by titration with up to $8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ copper(II) ions applying pseudopolarography. The results obtained for the analysed sample clearly evidenced a distribution of copper in three categories: (i) free or labile (deposition potential at -0.3 V), (ii) complexes that are reduced and released within the analytical window of the method (deposition potential from -0.3 to -1.6 V), and (iii) electroinactive complexes. Their ratios change with the addition of copper(II) ions and with changing pH. Such an analysis can serve operationally to characterise a sample and to compare the sample to other ones.

Zinc pseudopolarograms showed significant dependence on pH value. A large difference in pseudopolarograms of zinc between pH 4 and 2 reveals the existence of organic matter with protonation constant pK_a between 2 and 4. Those analyses also indicate the differences of DOM sites for copper and zinc complexation regarding their stability and acidity constants. Additional experiments are necessary for more detailed DOM characterisation regarding zinc and possible zinc–copper competition. Experiments with the addition of other cations are planned for they might cause different reactions and characterisation of DOM, which would be reflected in the shapes of pseudopolarograms.

The complex structure of the obtained pseudopolarograms reflects and indicates composite structure of the ligands making complexes with metals. This raises a challenge to construct the models with such behaviour, and to match the curves with the theory of pseudopolarography for retrieving quantitative information out of the signals regarding the speciation in the bulk of the solution and regarding the electrode processes.

Acknowledgements

This study was supported by the French MONALISA research project coordinated by the IFREMER (Grant No. 03/1214910/T). The grant of the University of Sud Toulon and Var for Ph.D. and researcher exchanges between France and Croatia, as well as financial support of the Ministry of Science, Education and Sports of the Republic of Croatia (through Grant No. 098-0982934-2720) are gratefully acknowledged. We thank Marta Plavšić and Damir Krznarić for their precious discussions. We also thank to the anonymous reviewers, especially to one of them.

REFERENCES

- [1] J. Buffle, *Complexation Reactions in Aquatic Systems*, Analytical Chemistry, Ellis Horwood, Chichester, 1988, p. 692.
- [2] R.H. Byrne, *Pure Appl. Chem.* 68 (1996) 1639.
- [3] J. Akkanen, J.V.K. Kukkonen, *Environ. Toxicol. Chem.* 22 (2003) 518.
- [4] E.L. Rue, K.W. Bruland, *Mar. Chem.* 50 (1995) 117.
- [5] J.W. Moffett, L.E. Brand, R.G. Zika, *Deep-Sea Res.* 37 (1990) 27.
- [6] K. Hirose, *Anal. Sci.* 22 (2006) 1055.
- [7] E. Tipping, M.A. Hurley, *Geochim. Cosmochim. Acta* 56 (1992) 3627.
- [8] Y. Lu, H.E. Allen, *Water Res.* 36 (2002) 5083.
- [9] K.W. Bruland, E.L. Rue, J.R. Donat, S.A. Skrabal, J.W. Moffett, *Anal. Chim. Acta* 405 (2000) 99.
- [10] G.E. Batley, S.C. Apte, J.L. Stauber, *Aust. J. Chem.* 57 (2004) 903.
- [11] K.H. Coale, K.W. Bruland, *Deep-Sea Res.* 37 (1990) 317.
- [12] F.L.L. Muller, *Mar. Chem.* 67 (1999) 43.
- [13] C. Garnier, S. Mounier, J.Y. Benaïm, *Environ. Technol.* 25 (2004) 589.
- [14] C. Garnier, I. Pižeta, S. Mounier, J.Y. Benaïm, M. Branica, *Anal. Chim. Acta* 505 (2004) 263.
- [15] S. Bubić, M. Branica, *Thalassia Jugoslav.* 9 (1973) 47.
- [16] G. Branica, M. Lovrić, *Electrochim. Acta* 42 (1996) 1247.
- [17] R.M. Town, M. Fillela, *J. Electroanal. Chem.* 488 (2000) 1.
- [18] D. Omanović, M. Branica, *Croat. Chem. Acta* 71 (1998) 421.
- [19] B.L. Lewis, G.W. Luther III, H. Lane, T.M. Church, *Electroanalysis* 7 (1995) 166.
- [20] P. Croot, J.W. Moffett, G.W. Luther III, *Mar. Chem.* 67 (1999) 219.
- [21] T.F. Rozan, G.W. Luther III, D. Ridge, S. Robinson, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 3845.
- [22] J.J. Tsang, T.F. Rozan, H. Hsu-Kim, K.M. Mullaugh, G.W. Luther III, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 5388.
- [23] D. Omanović, *Croat. Chem. Acta* 79 (2006) 67.
- [24] H.P. van Leeuwen, R.M. Town, *J. Electroanal. Chem.* 536 (2002) 129.
- [25] R.M. Town, H.P. van Leeuwen, *Croat. Chem. Acta* 79 (2006) 15.
- [26] I. Pižeta, G. Billon, D. Omanović, V. Cuculić, C. Garnier, J.-C. Fischer, *Anal. Chim. Acta* 551 (2005) 65.
- [27] M.P. Hurst, K.W. Bruland, *Anal. Chim. Acta* 546 (2005) 68.
- [28] P. Chakraborty, I.I. Fasfous, J. Murimboh, C.L. Chakrabarti, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 463.
- [29] M.G. Bugarin, A.M. Mota, J.P. Pinheiro, M.L.S. Gonçalves, *Anal. Chim. Acta* 294 (1994) 271.
- [30] A.E. Witter, S.A. Mabury, A.D. Jones, *Sci. Total Environ.* 212 (1998) 21.
- [31] Y. Louis, P. Cmok, D. Omanović, C. Garnier, V. Lenoble, S. Mounier, I. Pižeta, *Anal. Chim. Acta* 606 (2008) 37.
- [32] A. Huguet, C. Innocent, H. Roux De Balman, E. Parlanti, in: F.H. Frimmel, G. Abbt-Braun (Eds.), *Universität Karlsruhe, Proceedings of the 13th Meeting of the International Humic Substances Society, July 30–August 4, Karlsruhe, Germany, 2006*, p. 373.
- [33] J.A. Wise, D.A. Roston, W.R. Heineman, *Anal. Chim. Acta* 154 (1983) 95.
- [34] E. Sahlin, D. Jagner, *Electroanalysis* 10 (1998) 532.
- [35] A. Nelson, R.F.C. Mantoura, *J. Electroanal. Chem.* 164 (1984) 237.
- [36] D. Omanović, M. Branica, *J. Electroanal. Chem.* 565 (2004) 37.
- [37] T. Cheng, H.E. Allen, *J. Environ. Manage.* 80 (2006) 222.
- [38] E.M. Perdue, *Acidic functional groups of humic substances*, in: G.R. Aiken, D.M. McKnight, R.L. Wershaw, P. MacCarthy (Eds.), *Humic Substances in Soil, Sediment and Water*, 1, Wiley, New York, 1985 (Chapter 20).
- [39] J. Buffle, J.J. Vuilleumier, M.L. Tercier, N. Parthasarathy, *Sci. Total Environ.* 60 (1987) 75.
- [40] R.M. Town, H.P. van Leeuwen, *J. Electroanal. Chem.* 541 (2003) 51.
- [41] R.M. Town, H.P. van Leeuwen, *J. Electroanal. Chem.* 535 (2002) 11.
- [42] A.M.A. Mota, J. Buffle, S.P. Kounaves, M.L.S. Goncalves, *Anal. Chim. Acta* 172 (1985) 13.
- [43] D.R. Crow, *Polarography of Metal Complexes*, Academic Press, London, 1969.

- [44] J. Heyrovský, J. Kůta, Principles of Polarography, Publishing House of the Czechoslovak Academy of Science/Academic Press, Prague/New York, 1966.
- [45] J. Masini, G. Abate, E. Lima, L. Hahn, M. Nakamura, J. Lichtig, H. Nagatomo, *Anal. Chim. Acta* 364 (1998) 223.
- [46] J.D. Ritchie, J.M. Perdue, *Geochim. Cosmochim. Acta* 67 (2003) 85.
- [47] C. Garnier, S. Mounier, J.Y. Benaïm, *Water Res.* 38 (2004) 3685.
- [48] M. Plavšić, B. Čosović, *Anal. Chim. Acta* 284 (1994) 539.

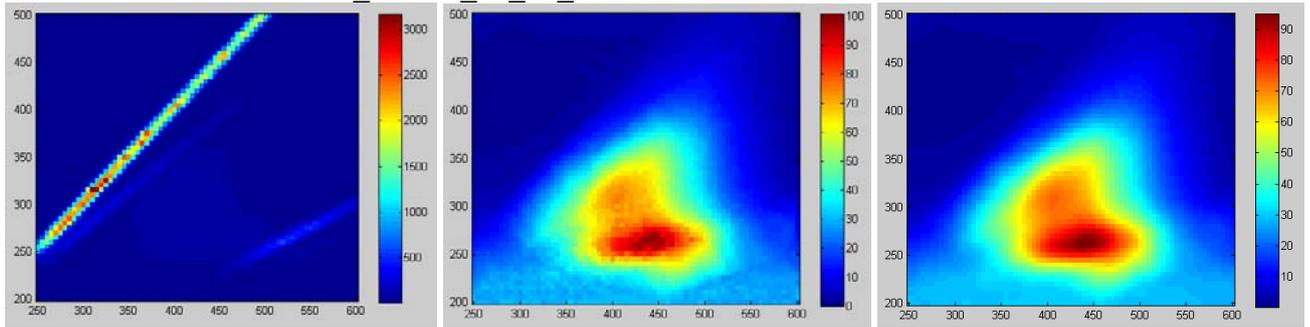
Annexe 6 :

Spectres de fluorescences obtenus sur les échantillons de la campagne de prélèvements de 2008 (Croatie, Rivière Krka)

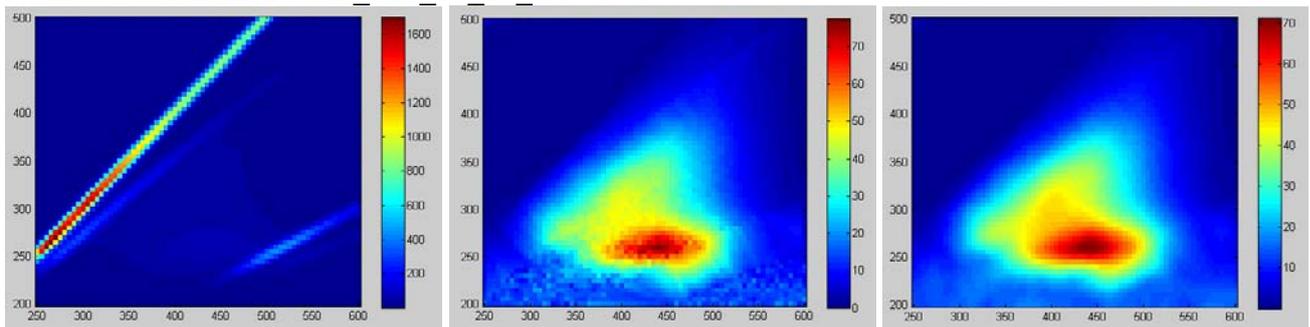
Fenêtre : 10/10

Gauche : figures brutes ; Milieu : figures traitées (Raman et Rayleigh enlevés) ; Droite : après filtrage.

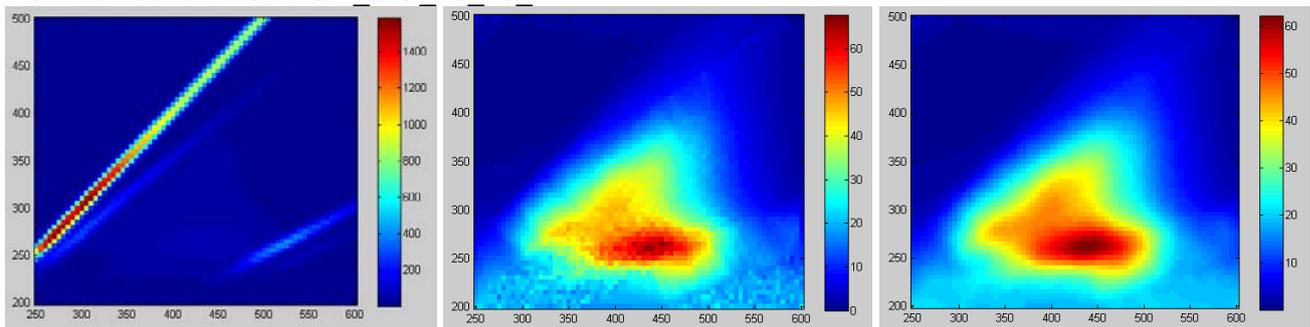
Nom de l'échantillon : '3D_KRKA_10_10_'



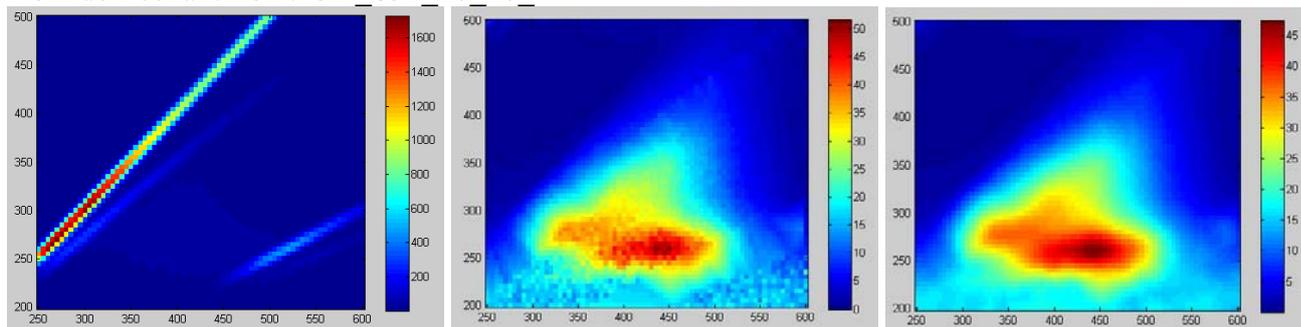
Nom de l'échantillon : '3D_S13_10_10_'



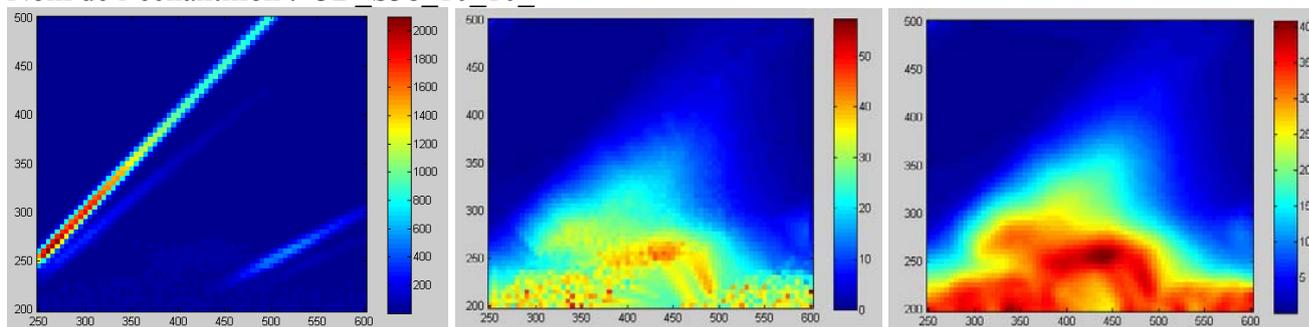
Nom de l'échantillon : '3D_S19_10_10_'



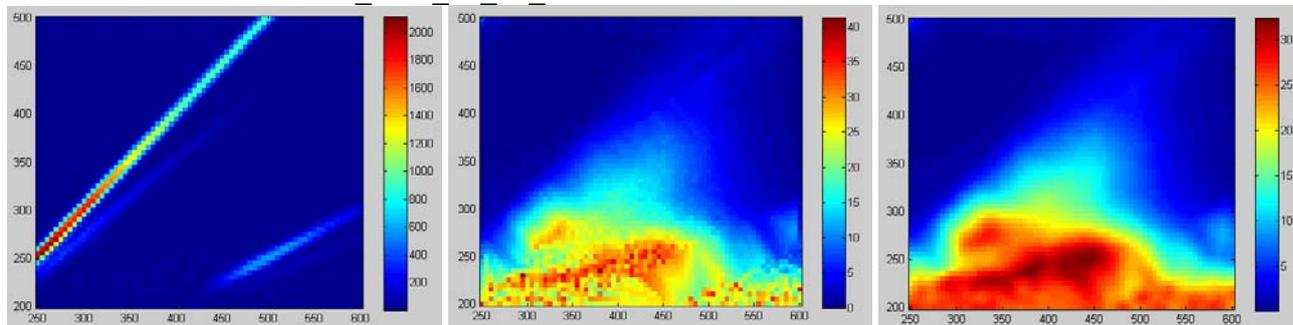
Nom de l'échantillon : '3D_S31_10_10 '



Nom de l'échantillon : '3D_S38_10_10 '



Nom de l'échantillon : '3D_SEA_10_10 '



Annexe 7 :

Code sous matlab utilisé pour intégrer les équations cinétiques

Fonction :

```
function deriv = fct_ML(t,M)
global alpha Kvar LTvar MT
deriv = -(10^Kvar(1))*M*(M+(LTvar-MT)) + (10^Kvar(2))/alpha*(MT-M);
```

Code utilisé pour résoudre l'équation cinétique pour 1 ligand :

```
clear all
clear

global t M alpha K LT M0 MT Mcalc Kvar LTvar

load('t.txt') %matrice temps t(s)
load('parametres.txt') %vecteur ligne concentrations LT (mol/L), M0
(mol/L), MT (mol/L), coefficient speciation inorganique (Mlibre=alpha*M),
log constantes k1 (L/mol/s) k-1 (s)

LT = parametres(1);
M0 = parametres(2);
MT = parametres(3);
alpha = parametres(4);
K = parametres(5:6);

LTvar=LT;
Kvar=K;

[temps,mc] = ode23s('fct_ML',t(find(t<=30000)),M0);

figure
plot(temps,mc)
grid minor

result = [temps mc];
save resMcalc.txt result -ascii -double
```

Fonction :

```
function deriv = fct_ML2(t,M)
global alpha Kvar LTvar MT
L1T=LTvar(1);
L2T=LTvar(2);
k1=10^Kvar(1);
Kth1=k1/(10^Kvar(2));
k2=10^Kvar(3);
Kth2=k2/(10^Kvar(4));
deriv = 1/alpha*(-k1*alpha*M*L1T+(k1*alpha*M+k1/Kth1-k2*alpha*M-
k2/Kth2)*(Kth1*alpha*M*L1T)/(1+Kth1*alpha*M)-k2*alpha*M*L2T+(MT-
M)*(k2*alpha*M+k2/Kth2));
```

Code utilisé pour résoudre l'équation cinétique pour 2 ligands :

```
clear all
clear

global t M alpha K LT M0 MT Mcalc Kvar LTvar

load('t.txt') %matrice temps t(s)
load('parametres.txt') %vecteur ligne concentrations L1T, L2T, M0, MT
(mol/L), coefficient speciation inorganique (Mlibre=alpha*M), log
constantes k1 (L/mol/s), k-1 (1/s), k2 (L/mol/s) et k-2 (1/s)

LT = parametres(1:2);
M0 = parametres(3);
MT = parametres(4);
alpha = parametres(5);
K = parametres(6:9);

LTvar = LT;
Kvar = K;

[temps,mc] = ode23s('fct_ML2',t(find(t<=30000)),M0);

figure
plot(temps,mc)

result = [temps mc];
save resMcalc.txt result -ascii -double
```

Annexe 8 : Liste des publications et communications réalisées

Publications parues (2)

Y. LOUIS, P. CMUK, D. OMANOVIĆ, C. GARNIER, V. LENOBLE, S. MOUNIER, I. PIŽETA, 2008. Speciation of trace metals in natural waters: The influence of an adsorbed layer of natural organic matter (NOM) on voltammetric behaviour of copper, *Analytica Chimica Acta*, 606, 37-44.

R. NICOLAU, **Y. LOUIS**, D. OMANOVIĆ, C. GARNIER, S. MOUNIER, I. PIŽETA, 2008. Characterization of dissolved organic matter interaction with copper and zinc in natural aquatic systems by pseudopolarography, *Analytica Chimica Acta*, 618, 35-42.

Publications soumises (1)

Y. LOUIS, C. GARNIER, V. LENOBLE, D. OMANOVIĆ, S. MOUNIER, I. PIŽETA. Characterisation and modelling of marine dissolved organic matter: interactions with major and trace cations, soumise.

Publications en cours de préparation (1)

Y. LOUIS, C. GARNIER, V. LENOBLE, S. MOUNIER, D. OMANOVIĆ, I. PIŽETA. Determination of copper-dissolved organic matter complexing parameters in the water column of a non-polluted estuary (Krka, Croatia) by at equilibrium and kinetic approaches.

Communications orales (3)

Y. LOUIS, C. GARNIER, V. LENOBLE, A study of organic matter-copper interactions in non-contaminated estuary waters (Šibenik, Croatia) by kinetic and equilibrium approach, *4^{èmes} Journées Franco - Italiennes de Chimie*, Développement durable et environnement, Nice, France, 17-18 avril 2008.

J.L. GONZALEZ, C. GARNIER, **Y. LOUIS**, S. MOUNIER, Evaluation du rôle de matière organique naturelle sur la spéciation des contaminants chimiques métalliques en milieu estuarien, *VIII^{ème} Colloque organisé sous l'égide du groupe français de l'IHSS*, Rôle et fonction des matières organiques dans l'environnement, Lyon, France, 27 et 28 Novembre 2007.

Y. LOUIS, R. NICOLAU, V. LENOBLE, S. MOUNIER, D. OMANOVIĆ, P. CMUK, I. PIŽETA, Pseudopolarography as a tool for complexation studies of trace metals with dissolved organic matter, *38^{ème} Congrès de la CIESM*, Istanbul, Turquie, 9-13 avril 2007.

Communication par affichage (8)

Y. LOUIS, C. GARNIER, V. LENOBLE, D. OMANOVIĆ, S. MOUNIER, I. PIŽETA, Electrochemical study of major and trace metal interactions with concentrated marine dissolved organic matter, *First Regional Symposium on Electrochemistry of South-East Europe*, Crveni Otok, Rovinj, **Istria, Croatie**, 4-8 mai 2008.

Y. LOUIS, C. GARNIER, D. OMANOVIĆ, I. PIŽETA, V. LENOBLE, J. L. GONZALEZ, S. MOUNIER, Analyse et modélisation des interactions Cation/métaux traces-Matière Organique Naturelle dissoute en milieu marin: intérêts de la pseudo-polarographie, *VIII^{ème} Colloque organisé sous l'égide du groupe français de l'IHSS*, Rôle et fonction des matières organiques dans l'environnement, **Lyon, France**, 27 et 28 Novembre 2007.

Y. LOUIS, D. OMANOVIĆ, I. PIŽETA, S. MOUNIER, Etude des interactions Matière Organique Naturelle-Métaux traces par polarographie, *séminaire Inov@Doc*, **Fréjus, France**, 24-27 Octobre 2007.

Y. LOUIS, D. OMANOVIĆ, S. MOUNIER, Utilisation de la Pseudopolarographie et de la technique d'ajouts logarithmique pour la détermination des propriétés de complexation de la matière organique naturelle dissoute, *Ecole-Chercheurs « Interactions matières organiques & micropolluants »*, **La Grande Motte, France**, 1^{er} au 4 octobre 2007.

Y. LOUIS, D. OMANOVIĆ, I. PIŽETA, S. MOUNIER, Pseudopolarography coupled with logarithmic additions for the determination of dissolved natural organic matter complexing properties toward copper, *11th International Conference on the Chemistry and Migration Behaviour of Actinides and Fission Products in the Geosphere, MIGRATION '07*, **München, Allemagne**, 26-31 Août 2007.

Y. LOUIS, P. CMUK, D. OMANOVIĆ, C. GARNIER, V. LENOBLE, I. PIŽETA, S. MOUNIER, Electrochemical behavior of copper complexes in model electrolyte solutions and natural waters, *38^{ème} Congrès de la CIESM*, **Istanbul, Turquie**, 9-13 avril 2007.

Y. LOUIS, R. NICOLAU, S. MOUNIER, D. OMANOVIĆ, I. PIŽETA, Etude de l'interaction Matière Organique Naturelle (MON) – Métaux traces par Pseudo-Polarographie, *Séminaire "Les Matières Organiques en France, Etat de l'Art et Perspectives"*, **Carqueiranne, France**, 22-24 janvier 2006.

Y. LOUIS, R. NICOLAU, S. MOUNIER, D. OMANOVIĆ, I. PIŽETA, What can we conclude about organic matter by tracing metal reduction/oxidation in natural water samples using voltammetric methods?, *1st International Workshop on Organic Matter Modeling*, **Toulon, France**, 16-18 Novembre 2005.

Mise au point d'une systématique de caractérisation des interactions Matière Organique Naturelle Dissoute (MOND) – Contaminants métalliques

L'étude des interactions métaux traces – matière organique naturelle marine est rendue difficile par leurs faibles concentrations en milieux marins et côtiers. Ce travail propose un protocole d'analyse permettant la détermination des propriétés de complexation de la matière organique naturelle dissoute (MOND), et plus spécifiquement la MOND marine, vis-à-vis de contaminants métalliques comme le cuivre. L'approche par concentration de la MOND est habituellement utilisée, mais il est possible de travailler directement sur l'échantillon naturel, sans lui faire subir d'étapes de pré-concentration ou de traitements physico-chimiques susceptibles d'altérer significativement sa structure. La mise en place de ce protocole analytique fournit des paramètres de complexation directement utilisables dans des logiciels de spéciation chimique, ou de transports de polluants, pour prédire la biodisponibilité des métaux traces. Les principaux obstacles au développement de ce protocole ont été d'adapter la manière de travailler aux très faibles concentrations de métaux et de carbone, en milieu principalement marin. La technique électrochimique de DPASV permet d'atteindre une limite de détection suffisamment basse pour étudier les échantillons directement dans les conditions naturelles. L'utilisation d'une titration métallique, en mode logarithmique, permet de balayer une gamme de concentration métallique suffisamment large pour déterminer les paramètres de complexation de la MOND pour des concentrations en carbone aussi basses que celles pouvant être rencontrées dans le milieu naturel. Des résultats identiques sont obtenus en traitant la cinétique de complexation des échantillons analysés. Ce protocole, appliqué à des MOND concentrées et non concentrées, et testé sur différents échantillons de MOND marines et estuariennes, montre qu'une approche rapide sans concentration de la MOND est possible. Toutefois, la concentration de la MOND a aussi été utilisée afin de déterminer les paramètres de complexation d'une MOND marine modèle tenant compte du calcium, du cuivre et du proton.

Mots-Clés : Matière Organique Naturelle Dissoute, Environnement Marin, Propriétés Complexantes, Spéciation, Métaux Traces, Cuivre, DPASV.

Achievement of a characterisation protocol for dissolved natural organic matter (DNOM) / metallic contaminants interactions

The study of trace metal interactions with dissolved natural organic matter (DNOM) is very difficult as in marine or coastal environment, the DNOM concentration is generally low. The goal of this study is to make an analytical protocol allowing the determination of the complexing properties of a DNOM, and especially of the marine DNOM, with metallic contaminants as copper. The challenge consists to work directly on a natural sample without using any concentration step or physico-chemical reaction which can modify the DNOM properties. This analytical protocol can give complexing parameters which can be used in chemical speciation or in contaminants transports programs, in order to predict the bioavailability of metallic cations in the environment, according to the DNOM properties. The main obstacles encountered were to work with very low, trace metal and carbon concentrations, and moreover in a marine environment. The DPASV technique used, make possible to reach the very low metal concentration needed to study the samples directly in their natural conditions. The use of a metallic titration in a logarithmic scale allow to work in a very large metal concentration range, and to determine the DNOM complexing parameters with carbon concentrations as low as those encountered in natural environment. The technique was then used on different marine and estuarine DNOM sample in order to determine their complexing properties without using any concentration step. The marine DNOM concentration is still usefull for model DNOM determination taking account of copper, proton and calcium effect on equilibrium.

Keywords: Dissolved Natural Organic Matter, Marine environment, Complexing properties, Speciation, Trace metals, Copper, DPASV.