

**Collège des Sciences et Technologies pour l'Energie et
l'Environnement – STEE**

Campus de la Côte Basque

Licence Physique-Chimie

Rapport de stage

**Etude de la matière organique dans différents types d'eau par
spectrophotométrie d'absorption et d'émission**

BOURCEREAU Quentin

Stage effectué du 03/04/2018 au 01/06/2018 à

UPPA-UFR SCIENCES ET TECHNIQUES DE LA CÔTE BASQUE

1 Allée du parc Montaury 64600 ANGLET

Sous la direction de Mr.PIGOT Thierry & Mr. Deborde Jonathan



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Mr.PIGOT Thierry pour m'avoir permis de réaliser ce stage au sein de l'établissement de l'UFR Montauray à Anglet, ainsi que pour son aide durant cette période.

J'aimerais remercier aussi Mr.DEBORDE Jonathan pour son aide ainsi que ses conseils qui m'ont permis d'avancer dans mes recherches.

Je souhaite aussi remercier mes collègues de licence Mr.BELLON Benoît, Mr.PASSICOT Baptiste et Mr.COUSIN Pierre pour ces deux mois passés dans la bonne humeur.

Et j'aimerais également remercier Mme.BLANC Sylvie pour ses conseils et son expérience apportée lors de ma journée à l'IPREM de Pau.

Table des matières

Table des figures et des tableaux.....	3
Introduction.....	4
I/ Synthèse bibliographique :	5
1/ La matière organique :	5
2/ Le rôle de la MOD	6
3/ Composition de la MOD.....	6
4/ La spectroscopie UV ou spectrophotométrie d'absorption.....	6
5/ Fluorescence de la MOD	7
6/ Indices de fluorescence.....	9
II/ Matériels et méthodes :.....	10
1/ Le spectrophotomètre UV	10
2/ Analyse avec le spectrophotomètre	11
3/ Le spectrofluorimètre	11
4/ Analyse avec le spectrofluorimètre	11
III/ Résultats et discussion.....	14
1/ Spectroscopie UV	14
a) Analyses.....	14
b) Calcul du SUV-A.....	15
2/ Spectrofluorimétrie.....	16
a) Influence de la méthode d'enregistrement	16
b) Calcul des indices de fluorescence.....	17
c) Spectres 3D	20
Conclusion	23
Bibliographie.....	24
Sommaire des annexes.....	25

Table des figures et des tableaux

Figure 1-Taille des molécules dissoutes et particulières	5
Figure 2-Représentation d'un acide humique et d'un acide fulvique	6
Figure 3-Principe de la fluorescence	8
Figure 4-Spectrophotomètre UV-1800 de la marque SHIMADZU.....	10
Figure 5-Spectrofluorimètre SHIMADZU RF-6000.....	11
Figure 6-Principe de fonctionnement d'un spectrofluorimètre	12
Figure 7-Représentation des bandes de diffusion de Rayleigh et de Raman en fonction de l'intensité	13
Figure 8-Matrice transformée via macro excel	13
Figure 9-Matrice brute 3D.....	13
Figure 10-Spectre 3D réalisé Rstudio	14
Figure 11-Coupe du spectre 3D réalisé sur Rstudio des valeurs supérieurs à 10000	14
Figure 12-Spectre UV STEP Urru	15
Figure 13-Spectre UV Gouf.....	15
Figure 14-Spectres 2D superposés de HA Aldrich à 265nm(marron) et HA Aldrich à 265nm filtré à 0.2µm.(rose)	17
Figure 15-Spectre 2D, Eau Montaury à 254nm non filtré	17
Figure 16-Spectre 2D, Eau Montaury à 254nm filtré à 345nm	17
Figure 17-Comparaison de spectre 2D de Montaury à 254 nm.	18
Figure 18- Diagramme des indices corrigés des estuaires	18
Figure 19-Diagramme des indices bruts des estuaires.....	18
Figure 20-Diagramme des indices bruts marins.....	19
Figure 21-Diagramme des indices bruts des steps.....	19
Figure 22-Diagramme des indices bruts des rivières	20
Figure 23-Spectre 3D low de la Tyrosine.....	21
Figure 24-Spectre 3D low de la Tryptophane.....	21
Figure 25-Spectre 3D low HA Aldrich (acide humique)	21
Figure 26-Spectre 3D low HA Aldrich 53 680 (Acide humique).....	21
Figure 27-Spectre 3D high Tyrosine	22
 Tableau 1-Principales bandes de fluorescence de la MOD	 8
Tableau 2- Valeurs du HIX	9
Tableau 3-Valeurs du BIX.....	9
Tableau 4-Mesures indices UV	16

Introduction

Un nombre croissant de contaminants liés aux activités anthropiques est rejeté dans l'environnement et dont les dynamiques biogéochimiques et la toxicité sont peu connues. Ces substances chimiques sont largement utilisées dans la vie courante et dans des applications industrielles, agricoles ou sanitaires.

La matière organique, notamment dissoute (MOD), influence directement le transport, la stabilité et la biodisponibilité de ces polluants organiques ou inorganiques. Il est donc essentiel d'appréhender de manière plus précise la nature des macromolécules organiques si l'on veut mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les processus de transport et de transformation de ces contaminants. L'étude de la MOD est particulièrement importante dans les milieux côtiers qui constituent des zones d'échanges entre les continents et les océans et qui vont permettre le passage dans le milieu océanique des substances provenant du milieu continental

Une partie de la MOD absorbe à la fois le rayonnement visible et le rayonnement UV. Cette MOD, dite chromophorique joue un rôle important en milieu aquatique, puisqu'elle permet notamment de protéger les organismes aquatiques des rayonnements UV, peut stimuler ou diminuer l'activité biologique et intervient dans les réactions photochimiques, notamment en milieu marin. L'absorption de lumière par la matière organique chromophorique décroît de manière exponentielle vers les plus grandes longueurs d'ondes : elle est maximale dans l'ultraviolet et proche de zéro à partir de 550 nm. Suite à l'absorption de lumière, la matière organique chromophorique peut émettre un signal de fluorescence.

L'objectif de ce stage a été en premier lieu de comprendre le fonctionnement d'un spectrophotomètre UV-visible et d'un spectrofluorimètre pour trouver les meilleures conditions analytiques pour étudier un échantillon quelconque d'eau et de mettre en place un protocole d'utilisation.

Dans un premier temps, j'ai été amené à faire des recherches bibliographiques pour comprendre au mieux mon sujet.

A l'aide de ces connaissances il a fallu ensuite mettre en place une méthode d'analyse avec des appareils adaptés à cette étude.

Et enfin dans une dernière partie est exposé les résultats obtenus ainsi que leurs interprétations.

I/ Synthèse bibliographique :

Dans cette partie seront exposées les données trouvées dans les différentes sources documentaires sur la matière organique, la fluorescence et la spectroscopie UV.

1/ La matière organique :

La matière organique (MO) désigne la matière décomposée d'origine animale, végétale et bactérienne, des composés organiques issus de déchets et débris de l'environnement. Celle-ci est omniprésente dans tous les compartiments des écosystèmes, notamment aquatiques.

On peut ainsi la retrouver sous plusieurs formes plus ou moins complexes de composés moléculaires. Selon sa taille, la MO est soit dissoute (MOD), soit particulaire (MOP). La limite entre ces deux domaines est fixée arbitrairement avec un seuil de coupure (ou de filtration, voir Figure 1). Dans ce travail, c'est sous la forme dissoute que la matière organique va nous intéresser et le seuil de filtration a été fixé à $0.45\mu\text{m}$:

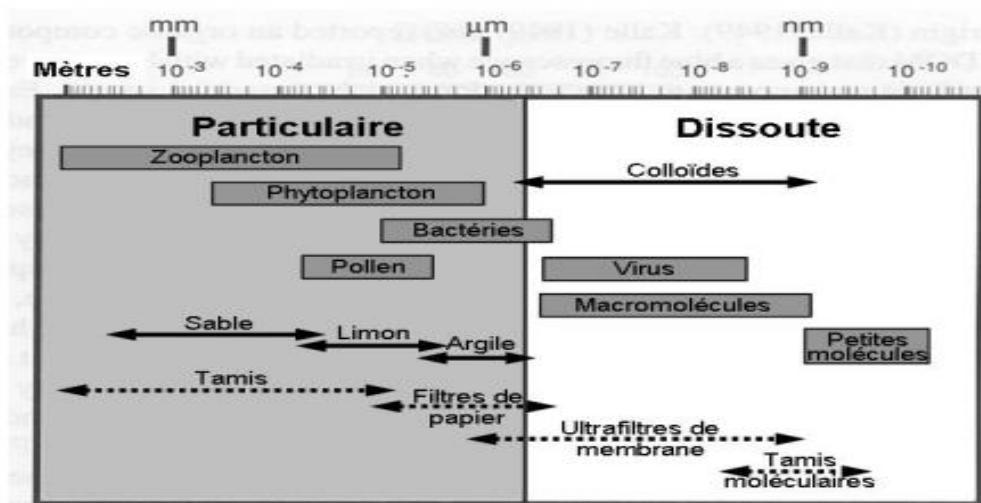


Figure 1-Taille des molécules dissoutes et particulaires

Grâce à ce tableau on sait que la MOD est principalement constituée de colloïdes (virus macromolécules, petites molécules), de substances humiques, d'acides aminés, elle peut facilement passer de l'état dissoute à particulaire et vice versa du fait de la taille des molécules qui peuvent être plus ou moins grosses grâce aux liaisons formées entre elles.

La MO peut provenir de différentes sources dites autochtones (bactérie, activité microbienne), allochtones naturelles (lessivage des sols, décomposition des végétaux) ou anthropiques (rejets industriels, agricoles, domestique...). L'abondance en MO varie donc suivant l'endroit et le temps. De plus en plus étudiée, la MO, suivant sa nature et ses propriétés physico-chimiques, influence la qualité d'une eau ainsi que sur les processus biogéochimiques en milieu aquatique. [6]

2/ Le rôle de la MOD

La MOD est aujourd'hui étudiée plus en détail du fait de son rôle important dans le milieu aquatique, et surtout dans le transport des différentes molécules contenues dans ce milieu comme les contaminants. Elle prend une part importante aussi dans les cycles biogéochimiques comme celui de l'azote ou du carbone. Celle-ci agit différemment suivant les paramètres physico-chimiques du milieu (pH, Température...) mais également suivant les caractéristiques biogéochimiques de ses composés. Cette complexité de natures et de formes rend la MOD difficilement identifiable. [1]

3/ Composition de la MOD

Or malgré un bon nombre de techniques mises en place, d'extraction et de séparation, la caractérisation d'une molécule en particulier reste compliquée à cause de la diversité des composants de la MOD.

Elle peut tout de même être classée suivant trois familles grâce à la méthode d'extraction sur résine non ionique mise en place par Thurman et Malcolm [1] : les hydrophobes, les transphiliques et les hydrophiles. On retrouve au sein de ces familles des composés simples tels que les composés du vivant qui sont facilement identifiables comme les acides aminés ou carboxyliques, mais aussi des composés plus compliqués à distinguer, les substances humiques.

Les substances humiques se distinguent elle-même en deux groupes, les acides humiques et les acides fulviques. Ils se différencient par plusieurs paramètres comme : la solubilité en fonction du pH, la taille des macromolécules, la masse molaire, l'aromaticité...

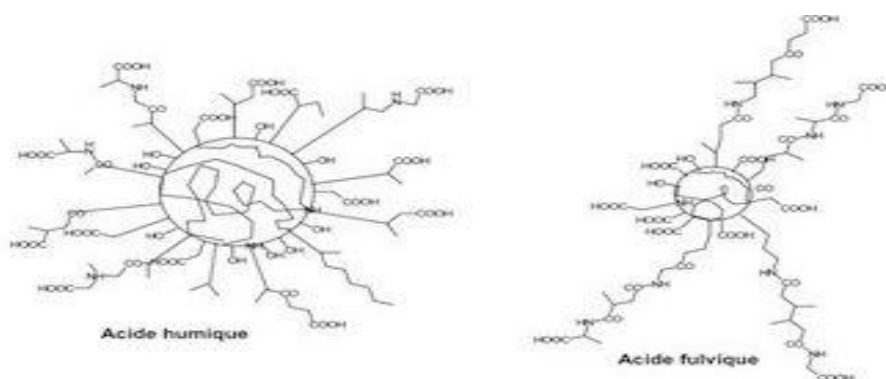


Figure 2-Représentation d'un acide humique et d'un acide fulvique

4/ La spectroscopie UV ou spectrophotométrie d'absorption

La fluorescence des molécules est liée à l'absorption de la lumière pour certaines longueurs d'ondes données. C'est pour cela que la spectroscopie UV est utilisée pour étudier

la MOD. La spectroscopie UV est une méthode très utilisée et bien connue, et est complémentaire à la fluorescence ce qui permet d'avoir plus de matière à la caractérisation d'une eau.

Dans le cas de la MOD, l'absorbance UV spécifique (SUVA) étudiée est celle à 254nm, car cette longueur d'onde est caractéristique des doubles liaisons C=C insaturées. Les mesures SUVA sont de bons prédicteurs des caractéristiques chimiques du carbone organique dissous, mais n'informent pas sur la réactivité de celui-ci [8]. Différents facteurs comme le pH, le nitrate ou bien le fer peuvent influencer l'indice SUVA. Cet indice va permettre d'avoir une idée de l'aromaticité de l'échantillon afin de déterminer le caractère plus ou moins humique d'une eau :

$$SUVA = \frac{A_{254}}{[COD]} * 100$$

L'eau est considérée comme humique pour un indice supérieur à 5, et non humique pour un indice inférieur à 2,5.

Le SUVA permet ensuite de mesurer différents indices liés à celui-ci comme le % d'aromaticité, celui-ci permet d'estimer la quantité de molécules cycliques contenues dans l'eau :

$$\%aromaticité = 6,5 * SUVA + 3,6$$

Et la pente spectrale (SR) donne une indication sur la taille, et l'origine (terrestres ou marines) des molécules. Lorsque celle-ci augmente, la taille des molécules diminue :

$$SR = \frac{S(275 - 295)}{S(350 - 400)}$$

5/ Fluorescence de la MOD

La fluorescence est un processus qui permet à certaines molécules d'émettre de la lumière lorsqu'elles sont excitées par de la lumière. Contrairement à la phosphorescence, la fluorescence va avoir une durée moins importante (de l'ordre de la nano minute). La lumière qui est réémise par la molécule peut être de la même longueur d'onde que celle absorbée (résonance), plus petite ou plus grande.

Comme cité précédemment la MOD dans l'eau absorbe la lumière dans le domaine l'UV-visible, grâce aux capacités chromophoriques de certaines molécules. Cette caractéristique est très utile car la spectroscopie par fluorescence est une méthode simple et rapide de déterminer au sens large les composés avec un faible volume de solution sans

altérer ces composés. C'est cette caractéristique qui va être étudiée ici grâce aux principaux indices de fluorescence et des cartes Excitation/Emission (EEM). [8]

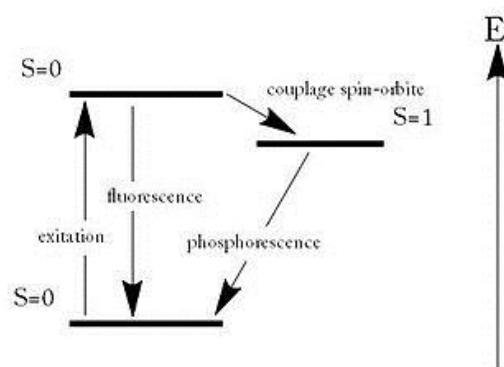


Figure 3-Principe de la fluorescence

Pour la fluorescence, les principales bandes utilisées sont celles dans le tableau ci-dessous. En effet, ce sont les principales bandes d'absorbance observées lors des études sur les acides humiques et qui vont servir de référence pour les analyses [1][2][8] :

Bande de Fluorescence	$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	$\lambda_{\text{émission}}$ (nm)	Type de composés	Nomenclature également utilisée dans la littérature Coble (1996)
α	330-370	420-480	Substances humiques	C
α'	230-260	380-480	Substances humiques	A
β	310-320	380-420	Substances humiques « marines »	M
γ	270-280	300-340	Type tyrosine, protéine	B
δ	270-280	320-350	Type tryptophane, protéine, phénol	T

Tableau 1-Principales bandes de fluorescence de la MOD

La bande α correspond donc à la présence de substances humiques confondues (acides fulviques et humiques), elle peut varier en fonction de la nature de l'échantillon. La bande α' elle est plus attribuée aux acides fulviques bien que ces deux bandes se retrouvent sur tous les spectres d'échantillons d'eaux naturelles.

La bande β elle est attribuée aux substances humiques d'origine marine uniquement, elle peut trouver son origine par une activité biologique.

Enfin les bandes δ et γ , sont liées à des composés protéiques, avec des caractéristiques proches des acides aminés comme la tyrosine ou le tryptophane. Ce type de composé est connu et est facilement caractérisable seul, or ils sont un peu plus difficiles à observer dans un échantillon d'eau naturelle. Le tryptophane correspond d'ailleurs à de la MO plus fraîchement dissoute que la tyrosine.

6/ Indices de fluorescence

Différents indices trouvés dans les différentes publications sont des outils indispensables pour l'étude de la fluo. Ici principalement 4 indices sont utilisés et exploités : HIX, BIX, FI et le ratio peakT/peakC, qui sont des outils permettant d'identifier rapidement des échantillons d'eau afin de les caractériser et de les comparer les uns aux autres.

-HIX : C'est le degré de maturation de la matière organique. Plus l'aromaticité est élevée dans l'eau plus elle absorbe dans les grandes longueurs d'ondes et donc elle voit son indice HIX augmentée. Celui-ci se calcule en mesurant l'air sous la courbe aux intervalles [435-480] nm et [300-345] nm, pour une longueur d'excitation de 254nm :

$$HIX = \frac{S_{435-480}}{S_{300-345}}$$

On trouve dans la thèse de Vacher (2004) [2] un tableau regroupant les différentes valeurs pour le HIX :

Ordre de grandeur du HIX	Caractéristique de la MOD
16-10	Caractère humique fort/apports terrigènes importants
10-6	Composante humique importante + composante autochtone récente
6-4	Caractère humique faible + composante autochtones récente importante
<4	Origine biologique ou bactérienne aquatique

Tableau 2- Valeurs du HIX

-BIX : Est l'indice de contribution autochtone (Vacher (2004)) [2]. Il est lié à la présence du fluorophore β dans les échantillons d'eaux naturelles. Il se calcule à une longueur d'excitation de 310nm sur le rapport aux longueurs d'ondes d'émissions 380nm sur 430nm :

$$BIX = \frac{I_{380}}{I_{430}}$$

Tableau de valeurs pour le BIX :

Ordre de grandeur du BIX	Caractéristique de la matière organique dissoute
0,6-0,7	Faible activité biologique
0,7-0,8	Activité moyenne
0,8-1	Forte activité biologique
>1	Origine bactérienne ou biologique

Tableau 3-Valeurs du BIX

-FI : L'indice de fluorescence indique si le matériau précurseur pour la MOD est d'une origine plus microbienne ou plus terrestre dérivé. Il est initialement calculé comme le rapport de l'intensité d'émission de 450nm sur 500nm pour une excitation à 370nm pour les instruments qui ne corrigent pas automatiquement les spectres (correction data). Et on utilise le rapport des intensités d'émissions à 470nm sur 520nm pour une excitation à 370nm pour les instruments qui corrigent les spectres :

$$FI = \frac{I_{470}}{I_{520}}$$

Ici lorsque que le FI est aux alentours de 1,8, l'eau est d'origine plus microbienne, alors que si le FI diminue l'eau est plus d'origine terrestre, donc plus humique.

-ratio peakT/peakC : Il est utilisé pour identifier l'impact des effluents d'eaux usées sur une rivière. Il indique la demande biochimique en oxygène par rapport au carbone organique dissous. Il est calculé au maximum d'intensité à l'émission 350nm, à l'excitation 275nm sur le maximum d'intensité de la région d'excitation 320-340nm et d'émission de 410-430nm.

$$\text{Ratio peakT/peakC} = \frac{I_{350}(275ex)}{I_{420}(330ex)}$$

Un rapport plus élevé indique un taux de matière biologique plus important, et réciproquement un taux plus faible indique une matière humique plus présente.

II/ Matériels et méthodes :

Pour l'étude de la MOD, principalement deux appareils ont été utilisés, à savoir un spectrofluorimètre et un spectrophotomètre UV. Dans cette partie seront exposées les méthodes de travail appliquées, ainsi que la description des appareils utilisés lors du stage.

1/ Le spectrophotomètre UV

Le spectrophotomètre, est un appareil très simple d'utilisation qui va permettre de mesurer l'absorbance. Pour plus de précisions, des cuves en quartz de 1 ou 5 cm sont utilisées. De plus plusieurs paramètres peuvent être modifier, comme la vitesse de balayage, le pas.



Figure 4-Spectrophotomètre UV-1800 de la marque SHIMADZU

2/ Analyse avec le spectrophotomètre

Pour analyser un échantillon, il est nécessaire de réaliser un blanc à l'aide du solvant utilisé dans la dilution de nos échantillons ou bien le solvant qui va affecter le moins les échantillons, ici l'eau MiliQ. Une fois le blanc réalisé, les analyses peuvent se faire. Les cuves doivent être nettoyées à plusieurs reprises et essuyées pour n'avoir aucune trace sur celles-ci afin de ne pas fausser les résultats.

Un logiciel permet de récupérer les données sous la forme de données texte et réaliser le spectre sur la machine pour une lecture instantanée. Les analyses sont rapides et souvent précises.

3/ Le spectrofluorimètre

L'appareil utilisé pour les analyses de fluorescence des échantillons au cours du stage, est un spectrofluorimètre de la marque SHIMADZU, qui va permettre à l'aide de faible volume (cuve de 1cm) d'identifier, sous la forme de spectres 2D ou de spectres 3D, différents types de molécules ou composés capables d'émettre de la lumière en particulier fluorescente dans un échantillon donné.



Figure 5-Spectrofluorimètre SHIMADZU RF-6000

L'appareil possède peu de paramètres modifiables : la vitesse de balayage, l'écart de fente ou bien la sensibilité, qui à l'aide du logiciel LabSolutionRF permet de réaliser différents spectres pour un même échantillon et donc de pouvoir comparé les résultats entre eux et de trouver la meilleure façon d'obtenir le spectre voulu ou le plus adapté aux recherches.

Acheté récemment sur le site de Montaury, l'objectif était de mettre en place les protocoles de mesure de cette machine et de jouer un maximum sur les différents paramètres afin de permettre par la suite aux chercheurs de l'utiliser dans les meilleures conditions possibles. L'analyse de composés connus est donc nécessaire afin d'étalonner la machine et par la suite lors d'analyse d'échantillons plus complexe, permettre de détecter ces différents composés plus rapidement.

4/ Analyse avec le spectrofluorimètre

Pour les analyses d'échantillons une cuve en quartz de 1 cm qui ne possède aucune face opaque est utilisée, puisque la lumière d'excitation et la lumière d'émission ne sont pas

effectuer sous le même angle. De plus la cuve doit être bien nettoyée avec de l'eau MiliQ (eau très pure), afin d'éliminer tous les potentiels contaminants qui pourraient être encore à l'intérieur et bien essuyer les traces de doigts sur les faces de la cuve.

Avant toutes analyses, il est indispensable de réaliser un blanc afin de pouvoir le comparer avec les échantillons et donc ainsi voir les différences d'intensités. Il est recommandé aussi de réaliser plusieurs blancs dans le cas où plusieurs analyses sont réalisées à la suite et aussi à chaque fois qu'un paramètre de la machine est changé, afin de s'assurer qu'il n'y a aucun problème lors du fonctionnement de l'appareil. Le blanc est toujours réalisé avec le solvant utilisé pour la dilution des échantillons. Ici ce sera toujours l'eau MiliQ.

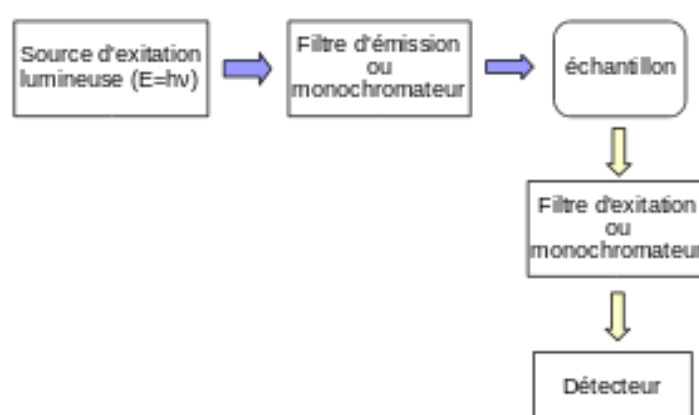


Figure 6-Principe de fonctionnement d'un spectrofluorimètre

Avant d'analyser tout échantillon d'eaux naturelles, il faut savoir identifier les échantillons « étalons » en notre possession, à savoir la tyrosine, la tryptophane, l'acide humique Aldrich et l'acide humique Aldrich 53680. Une fois identifiées sous les différentes formes de spectres (2D et 3D), il sera possible lors de l'analyse d'échantillons d'eaux de retrouver ces différents composés.

Il faut penser aussi à soustraire le spectre du blanc afin d'obtenir le spectre corrigé et ce pour toutes les analyses réalisées. Cette étape est réalisable directement sur le logiciel pour les spectres 2D (Manipulate ; data transformation). Il est préférable d'effectuer cette correction à partir des fichiers bruts via un tableur.

Des considérations liées à l'appareillage doivent également être prises en compte lors de l'enregistrement de spectres d'émission dans l'eau.

On observe systématiquement une raie de même longueur d'onde que la lumière excitatrice : c'est la diffusion Rayleigh.(1)

Ensuite une série de raies moins intense avec une fréquence plus ou moins élevée qui correspond à la différence d'énergie entre les photons absorbés et les photons réémis par le solvant : c'est la diffusion Raman.(2)

Il se peut que ces bandes interfèrent avec le spectre observé.

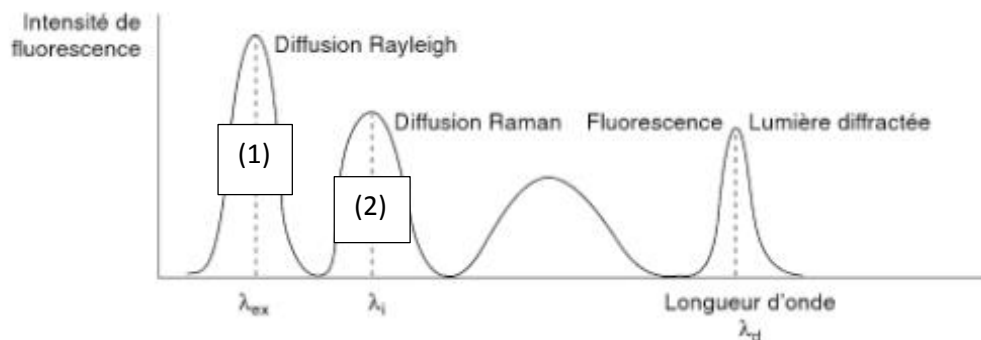


Figure 7-Représentation des bandes de diffusion de Rayleigh et de Raman en fonction de l'intensité

En ce qui concerne les spectres 3D, le logiciel ne permet pas de corriger directement les spectres du blanc. Il faut donc effectuer cette correction manuellement en récupérant les données du blanc et de l'échantillon désiré puis soustraire via Excel. Une matrice de points est donc obtenue, et est transformée en format [X, Y, Z], voir images ci-dessous :

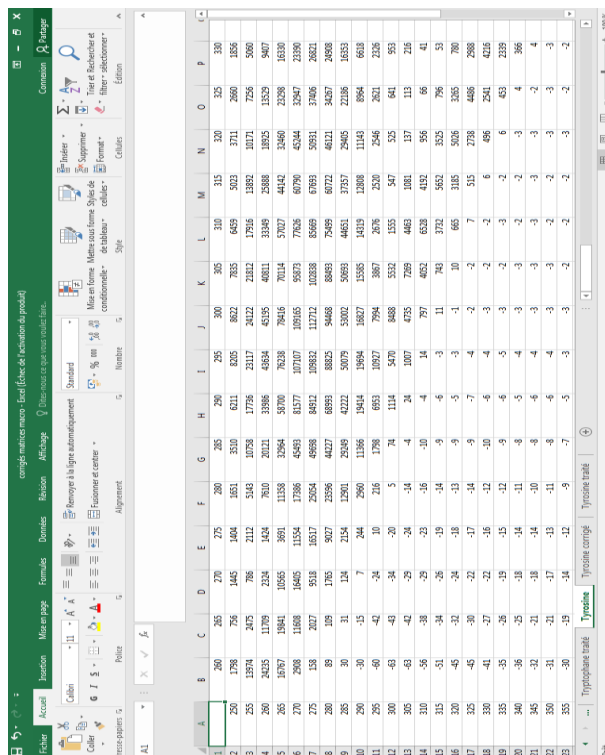


Figure 9-Matrice brute 3D

	A	B	C
1	Excitation	Emission	Intensité
2	250	260	-214
3	250	265	-142
4	250	270	-287
5	250	275	-274
6	250	280	-119
7	250	285	-3
8	250	290	64
9	250	295	272
10	250	300	861
11	250	305	2220
12	250	310	4801
13	250	315	8374
14	250	320	12855
15	250	325	17556
16	250	330	21779
17	250	335	25313
18	250	340	27572
19	250	345	28558
20	250	350	28274
21	250	355	27068
22	250	360	25181
23	250	365	22758
24	250	370	20295
25	250	375	17620
26	250	380	15177
27	250	385	13128
28	250	390	11218
29	250	395	9523
30	250	400	8055
31	250	405	6625
32	250	410	5408
33	250	415	4413

Figure 8-Matrice transformée via macro excel

Une fois la matrice transformée, on peut ensuite l'implanter dans le logiciel R qui va permettre de créer un spectre 3D plus adapté et manipulable selon les besoins. Voir images ci-dessous :

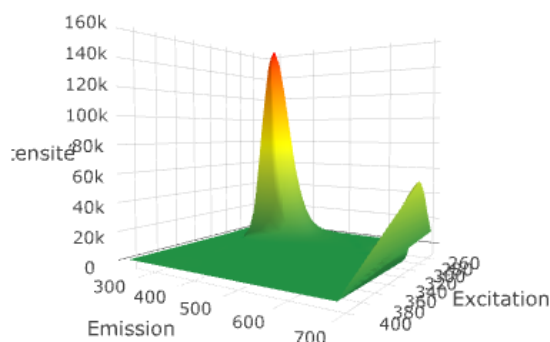


Figure 10-Spectre 3D réalisé Rstudio

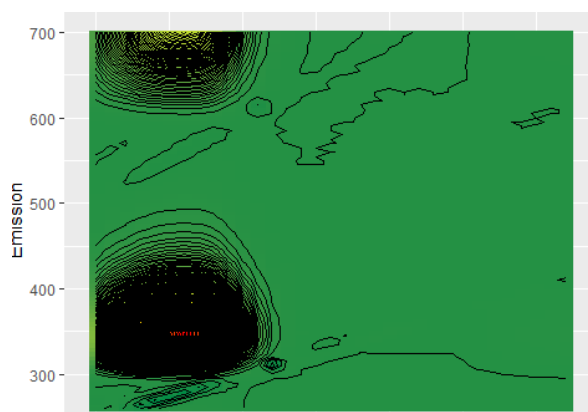


Figure 11-Coupe du spectre 3D réalisé sur Rstudio des valeurs supérieures à 10000

III/ Résultats et discussion

Dans cette partie, plusieurs échantillons d'eaux (step, marines, rivières, estuaires...) ont été analysés, et exploités grâce aux méthodes et aux connaissances décrites précédemment.

1/ Spectroscopie UV

a) Analyses

Les échantillons ont été analysés sur l'intervalle [800-200nm] car différents calculs nécessitent des valeurs comprises dans celui-ci, mais la valeur qui ici est la plus importante est celle à 254nm pour le calcul du SUV-A.

Les spectres ont été réalisés avec des cuves en quartz de 5cm et non pas avec des cuves en verres, car celles-ci bloquent les longueurs d'ondes inférieures à 270nm. De plus les cuves de 5cm permettent un trajet optique plus grand afin d'obtenir des valeurs plus précises pour des échantillons qui ont une faible absorption.

Dans ces 17 échantillons (6 de rivières, 3 d'estuaires, 5 de stations d'épuration (STEP), 3 marins), des différences d'absorbance sont observées, ceci s'explique par l'origine de l'échantillon, et de la composition de MOD de l'eau. Par exemple une eau de STEP absorbe beaucoup plus qu'une eau marine qui est moins chargée en particules et en MOD (voir spectres ci-dessous) :

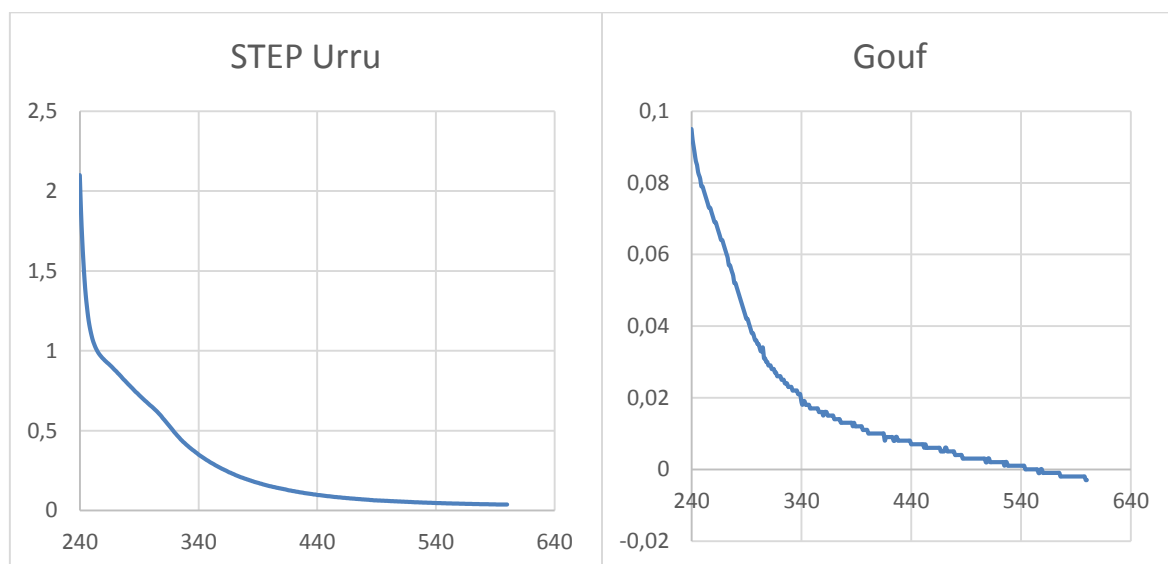


Figure 12-Spectre UV STEP Urru

Figure 13-Spectre UV Gouf

Ici l'absorbance maximum pour la STEP est supérieure à 2, alors que pour l'échantillon du gouf l'absorbance maximum se situe à 0.05 soit 40 fois inférieur.

La spectroscopie donne des résultats cohérents et précis, et très proches suivant les origines des eaux (voir spectres en annexe).

b) Calcul du SUV-A

Le calcul de cet indice va permettre de confirmer le caractère humique ou non de l'eau et de voir si les résultats corréleront avec l'origine de l'eau. De plus avec cet indice, il est possible de mesurer le pourcentage d'aromaticité, ainsi que la pente spectrale (SR) qui est représentative d'un type d'eau. Pour mesurer ces indices il est nécessaire d'avoir la concentration en carbone organique dissous, or certaines données en notre possession ne sont pas justes car la méthode d'analyse utilisée n'était pas la plus optimale pour ces échantillons, entraînant une surestimation du COD et il manque des données pour certains échantillons. Les résultats obtenus ne peuvent donc pas être comparés entre eux, ils sont regroupés dans un tableau voir ci-dessous :

Echantillon	[COD] en mg/L	SUV-A	%aromaticité	Pente spectrale SR
S3 rivière	10,2	0,98	9,97	1,58
S1 DOM rivière	7,4	4,25	31,26	2,82
AD 2 SB estuaire	2,2	15,59	104,54	1,55
AD 1 SB estuaire	5,8	3,80	27,02	1,38
AD 2 SC estuaire	1,9	19,10	127,78	1,52
AD 2 S6 step	5,8	8,44	58,51	0,93
ESS step	3,9	16,07	108,1	1,71
Guet step	2,4	46,54	306,12	0,89
Erro step	6,2	11,11	75,83	1,22
Urru step	6,7	15,05	101,48	1,00
Embouchure marin	6,9	1,04	10,38	2,66
Gouf marin	9,8	0,76	8,57	3,16
G DOM marin	10,4	0,31	5,66	3

Tableau 4-Mesures indices UV

Les valeurs de [COD] pour les steps sont bons, on remarque que les valeurs de SUVA sont très fortement supérieures à 5, on a donc bien une eau humique avec de forts pourcentages d'aromaticités et des pentes spectrales assez faibles. On peut donc dire que les résultats sont cohérents avec le fait que c'est une eau usée avec beaucoup de MOD en décomposition.

Le [COD] pour l'échantillon AD 2 SB et AD 2 SC est également juste. On observe des valeurs de SUVA inférieures à 5, avec un plus faible pourcentage d'aromaticité que pour les steps et des pentes spectrales légèrement plus basses. Ces données permettent de dire que les échantillons d'estuaires sont moins chargés en MOD que les steps, avec un caractère humique plus faible, ce qui est cohérent.

2/ Spectrofluorimétrie

a) Influence de la méthode d'enregistrement

Comme expliquer précédemment, l'appareil utilisé permet de modifier différents paramètres comme la largeur de fente, la vitesse de mesure, la longueur d'onde ou bien encore la sensibilité.

Lors des analyses, des bandes de diffusion Rayleigh sont observées. Afin de les éliminer, plusieurs paramètres comme le pH, la concentration de la solution, la filtration sont modifiés, puis plusieurs spectres sont réalisés.

On remarque donc après plusieurs essais que les meilleures conditions d'enregistrements pour le moment sont donc : des ouvertures de fentes de 3nm pour l'excitation et de 5nm pour l'émission, avec un pas de 2nm et un balayage de 60nm/min et surtout lorsque la solution est filtrée avec un filtre à 0.2µm. Car celui-ci permet de filtrer

les colloïdes contenus dans la solution qui diminue par ce fait la bande de diffusion Rayleigh :
Voir image ci-dessous :

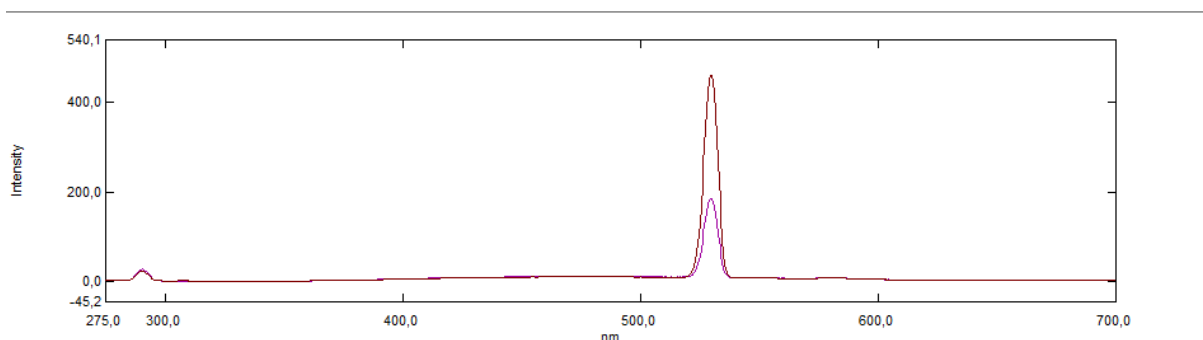


Figure 14-Spectres 2D superposés de HA Aldrich à 265nm(marron) et HA Aldrich à 265nm filtré à 0.2µm.(rose)

De plus l'utilisation de filtre optique en verre permet de supprimer certaines bandes parasites afin d'obtenir un spectre plus propre. Voir les figures ci-dessous :

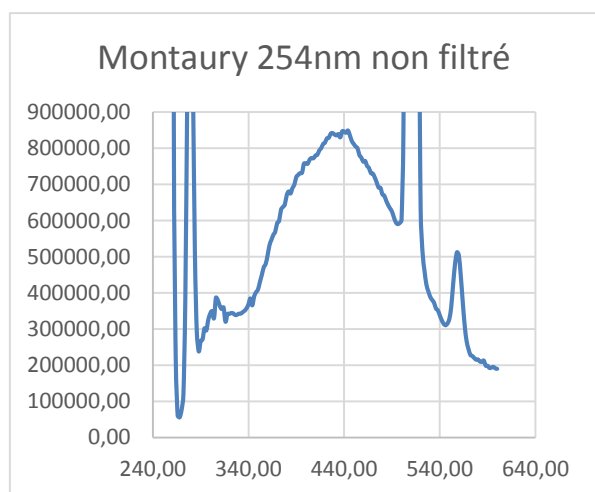


Figure 15-Spectre 2D, Eau Montauray à 254nm non filtré

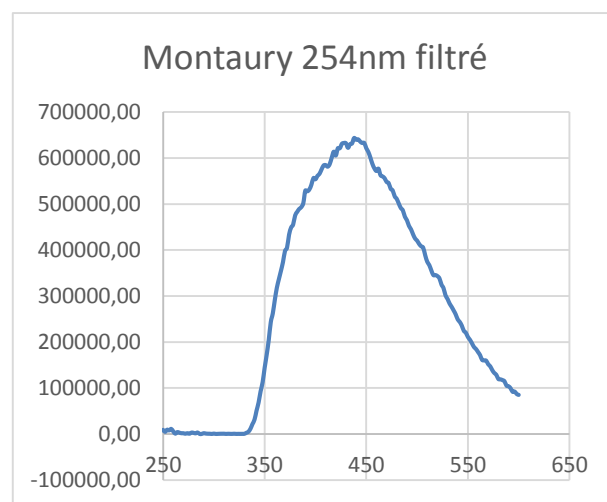


Figure 16-Spectre 2D, Eau Montauray à 254nm filtré à 345nm

Le filtre utilisé est un filtre en verre à 345nm, c'est-à-dire qu'il laisse passer uniquement les longueurs d'ondes de 345nm et supérieur. Le filtre permet donc de « couper » la bande Raman, Rayleigh, mais aussi les harmoniques. Cette expérience a été réalisée à Pau, car ces filtres ne sont pas encore disponibles à l'UFR Montauray.

b) Calcul des indices de fluorescence

Grâce aux spectres 2D réalisés (17 à Anglet et 4 à Pau), nous avons mesuré les différents indices de fluorescence afin de comparer les résultats des différents échantillons et de voir si ces résultats sont logiques à la provenance de l'eau étudiée. Seulement avec les analyses réalisées à Pau, avec un appareil plus ancien mais sûrement plus sensible (voir annexe), on se rend compte que notre méthode de correction n'est pas forcément la bonne.

De plus les spectres bruts de Pau et Anglet sont assez proches, donc pour exploiter les résultats les données brutes seront plus parlantes ici.

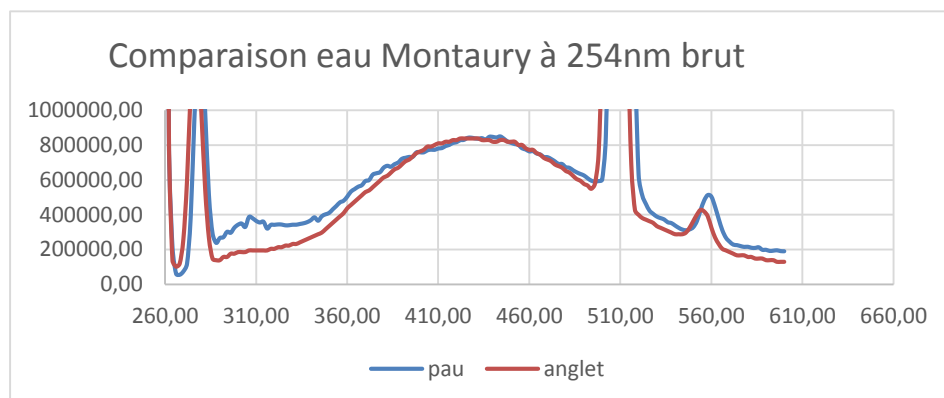


Figure 17-Comparaison de spectre 2D de Montauray à 254 nm.

Les résultats sont donc regroupés dans un tableau avec les données brutes et un tableau avec les données corrigées (voir annexes). Des différences sont surtout observées au niveau du HIX qui varie beaucoup suivant les données brutes et corrigées. La méthode de correction doit donc être affinée. Les autres données quant à elle ne varient que très peu et ne sont donc pas altérées par cette correction.

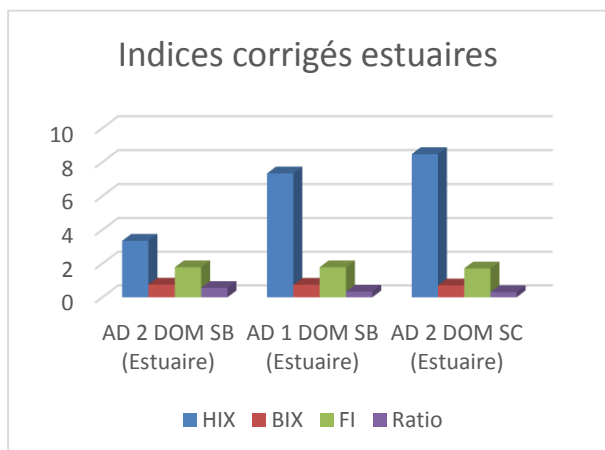


Figure 18- Diagramme des indices corrigés des estuaires

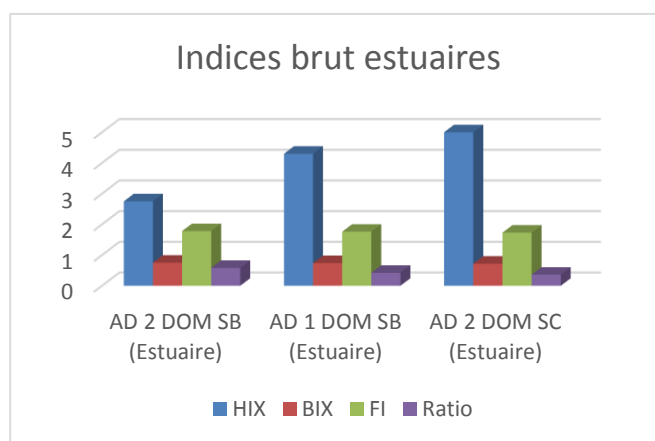


Figure 19-Diagramme des indices bruts des estuaires

Pour les estuaires par exemple, on observe bien que les valeurs brutes ne dépassent pas les 5 pour le HIX alors que sur les valeurs corrigées elles sont quasiment à 10. Au niveau des comparaisons entre les différents eaux maintenant, on observe bien des différences entre chaque type d'eau.

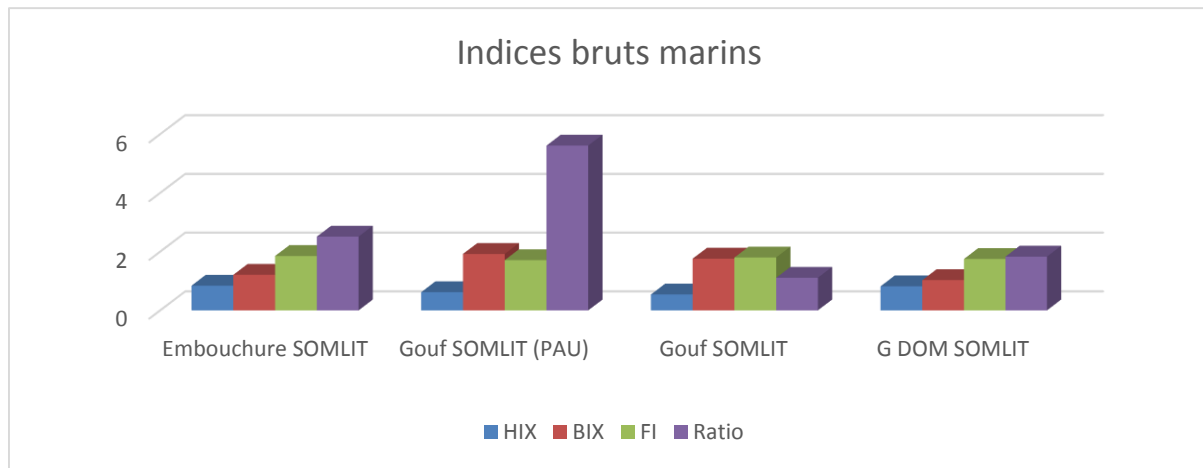


Figure 20-Diagramme des indices bruts marins

Pour les échantillons marins, les valeurs du HIX sont toutes inférieures à 1 ce qui signifie une forte activité biologique, ce qui est cohérent avec les valeurs du BIX qui sont toutes supérieures à 1 et donc prouvent encore une forte activité biologique. Le FI se situe pour tous aux alentours de 1,8 avec un ratio supérieur à 1 pour tous les échantillons ce qui prouve que ces eaux marines ne sont pas ou très peu chargées en MOD.

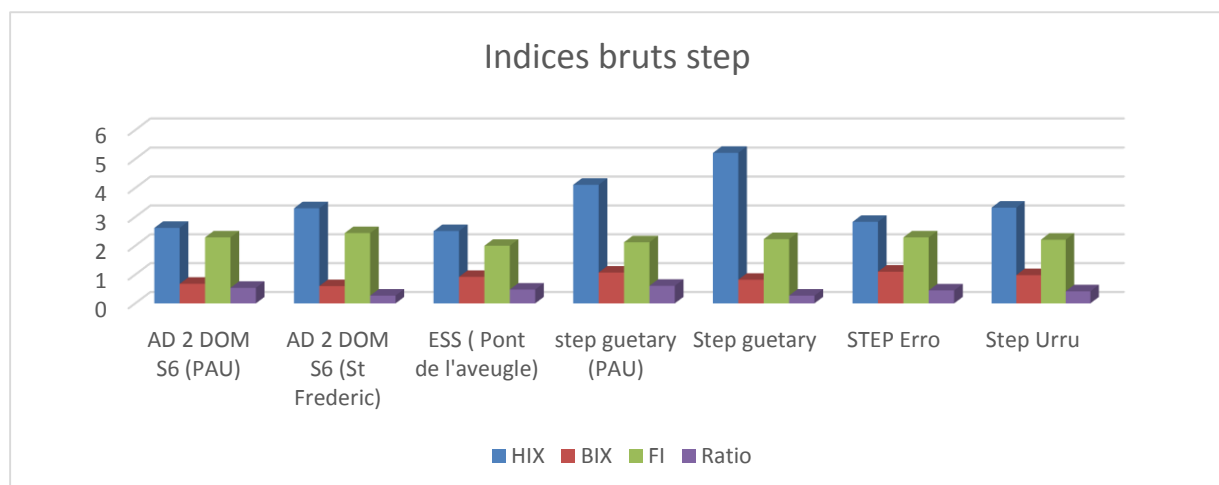


Figure 21-Diagramme des indices bruts des steps

Les eaux de steps qui sont des eaux usées, sont normalement des eaux chargées en MOD. Les valeurs le montrent puisque au niveau du HIX se sont en moyenne les plus élevées avec les estuaires, bien qu'elles restent assez faibles ce qui peut montrer que les eaux sont plutôt bien traitées. Les valeurs du BIX sont quasiment toutes inférieures à 1 ce qui montre une activité biologique plutôt moyenne. Le FI montre que la matière contenue dans l'échantillon est d'origine microbienne, mais le ratio qui est en moyenne inférieur à 0.5 pour toutes les steps montre que c'est une matière bien dégradée.

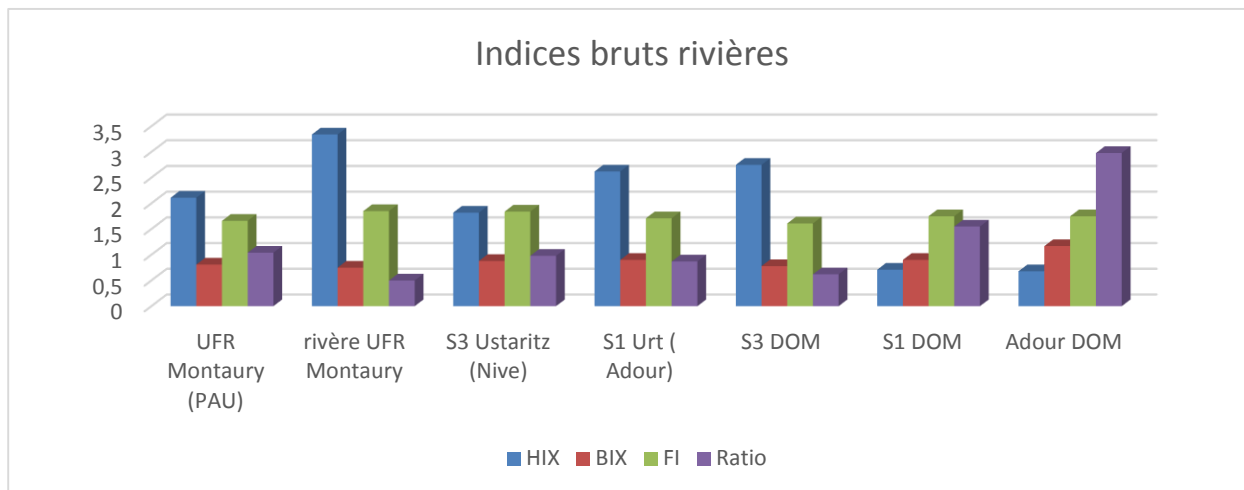


Figure 22-Diagramme des indices bruts des rivières

Les eaux de rivières ont des valeurs de HIX qui varient 0.68 à 3.34 ce qui montre une forte activité biologique. Cela peut aussi s'expliquer par les conditions lors de la récupération des échantillons qui peuvent être souillés par des impuretés au moment du prélèvement. Au niveau du BIX, les valeurs tournent autour de 0.9 en moyenne ce qui coïncide avec les valeurs de HIX, ce qui montre une forte activité biologique. Pour le FI les valeurs sont en moyenne à 1.75 et pour le ratio, les valeurs varient de 0.5 à 2.98, ce qui paraît logique.

Toutes les valeurs obtenues semblent cohérentes entre elles. Les mesures réalisées sont donc correctes. Pour confirmer ces résultats il faudrait analyser une centaine d'échantillons de chaque écosystème car il peut y avoir dans certains cas des données erronées liées à l'hétérogénéité temporelle ou spatiale propres à la dynamique de chaque site.

c) Spectres 3D

En premier lieu nous avons cherché à étudier les spectres 3D des quatre composés de référence en notre possession : la Tyrosine, le Tryptophane, l'acide humique Aldrich et l'acide humique Aldrich 53680, afin de les retrouver dans les échantillons naturels.

Pour réaliser ces analyses on s'est d'abord servi des conditions d'enregistrement trouvées dans les documents bibliographiques à savoir un intervalle d'excitation λ_{ex} = [220-500], un intervalle d'émission $\lambda_{ém}$ = [250-600], un pas p = 2nm et une vitesse v =600nm/min. On cherche aussi à garder une température ambiante constante de 20°C à l'aide d'un appareil secondaire.

Le but de cette première manipulation est de retrouver les spectres 3D observés dans les publications. Avant toute analyse de composé, on réalise un blanc dans les mêmes conditions d'enregistrement.

On remarque donc à la suite des analyses que les deux acides aminés, la Tyrosine et la Tryptophane, permettent l'obtention de spectres 3D similaires aux publications. Ils émettent dans l'intervalle de la bande γ avec une forte intensité lumineuse. Voir images ci-dessous :

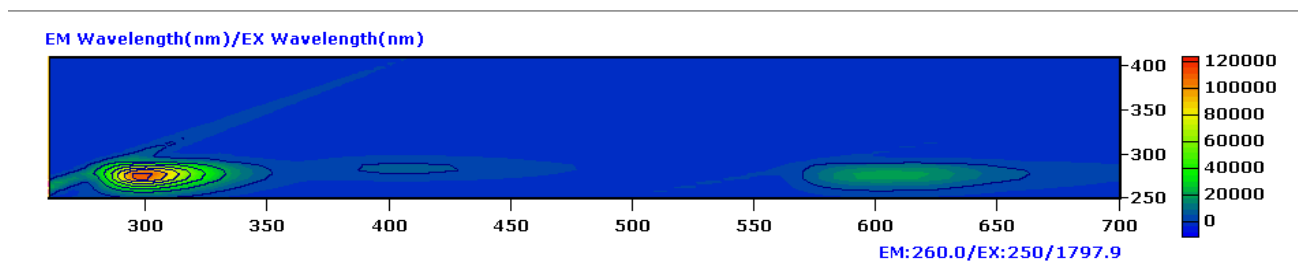


Figure 23-Spectre 3D low de la Tyrosine

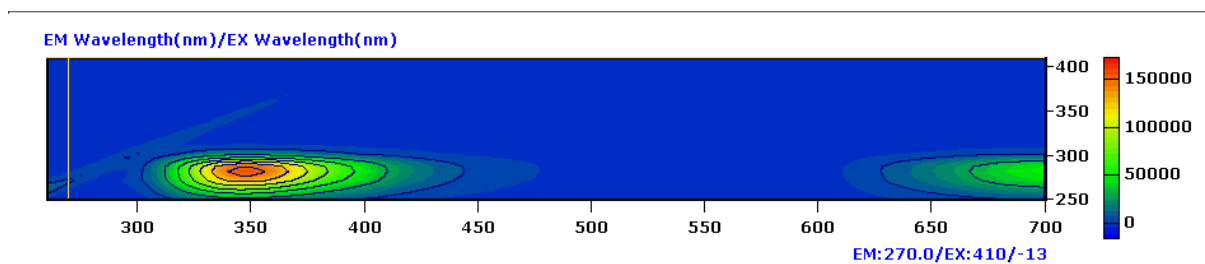


Figure 24-Spectre 3D low de la Tryptophane

Or pour les spectres des acides humiques Aldrich et Aldrich 53680, on observe des spectres similaires aux spectres 3D du blanc. C'est-à-dire que ces composés ne sont que très peu fluorescents et donc on ne possède pas encore les bonnes conditions d'enregistrement pour ces composés. Voir images ci-dessous :

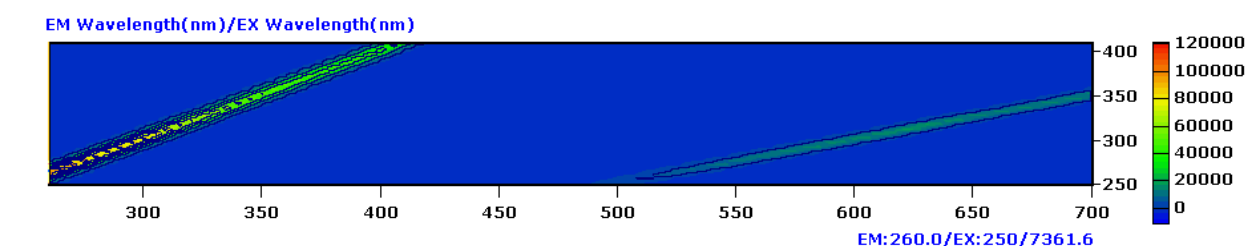


Figure 25-Spectre 3D low HA Aldrich (acide humique)

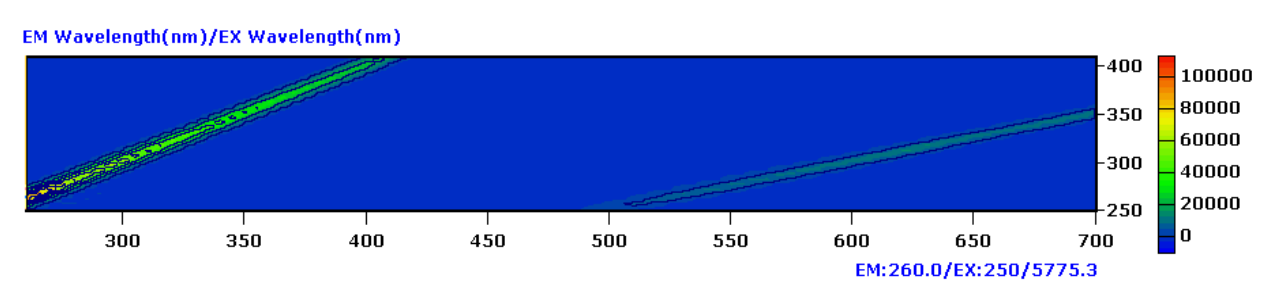


Figure 26-Spectre 3D low HA Aldrich 53 680 (Acide humique)

L'appareil permettant un choix d'analyse avec deux sensibilités différentes (Low et High), nous avons aussi testé la deuxième sensibilité dans ces conditions mais le résultat n'est pas non plus très concluant pour ces spectres 3D.

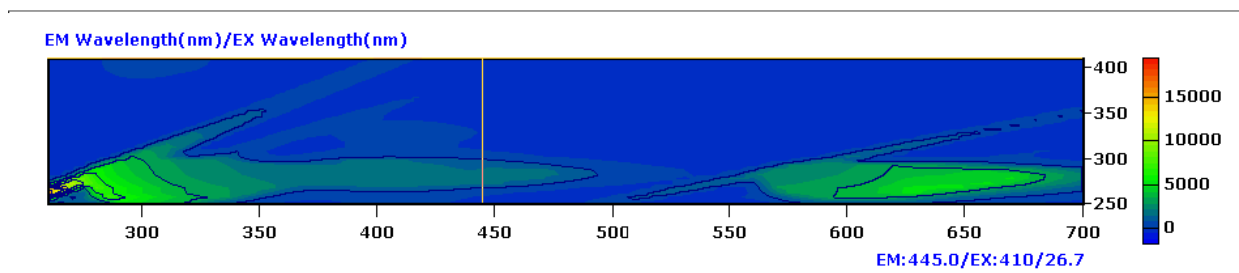


Figure 27-Spectre 3D high Tyrosine

Par la suite un spectre 3D de chaque échantillon a été réalisé en changeant pour certains la sensibilité, mais les résultats obtenus ne sont pas très convaincants. Par manque de temps, il était compliqué de trouver de meilleures conditions et de recommencer l'étude des spectres 3D.

Conclusion

Lors de ce stage, j'ai donc principalement manipulé le spectrofluorimètre afin de comprendre son fonctionnement et de trouver les meilleures conditions possibles à l'enregistrement de spectres, ainsi que les outils informatiques indispensables à leur interprétation.

Afin de vérifier la qualité des spectres obtenus, des calculs d'indices de fluorescence et d'absorption ont été réalisés afin de se rapprocher au maximum des valeurs bibliographiques.

Dans l'ensemble, ces résultats sont encourageants pour la suite des recherches puisqu'ils se rapprochent beaucoup des valeurs observées dans la littérature. De plus ces résultats sont confirmés par des analyses réalisés à l'IPREM de Pau sur un autre spectrofluorimètre.

Il reste encore des points à développer, en majorité au niveau de l'acquisition des spectres 3D.

Ces deux mois de stage ont été riches en apprentissage dans différents domaines concernant la matière organique et la lumière (fluorescence et UV), et m'ont permis de développer mes compétences sur un sujet que j'ai trouvé particulièrement intéressant et qui me conforte à l'idée de poursuivre les études dans la qualité de l'eau.

Bibliographie

[1] Mise au point de procédés membranaires pour l'étude de la matière organique dissoute en milieux côtiers ; **thèse de Arnaud HUGUET de 2007**

[2] Etude par fluorescence des propriétés de la matière organique dissoute dans les systèmes estuariens. Cas des estuaires de la Gironde et de la Seine ; **thèse de Lillian VACHER de 2004**

[3] Aquatic Organic Matter Fluorescence; **Paula G. COBLE, Jamie LEAD, Andy BAKER, Darren M. REYNOLDS, et Robert G.M. SPENCER; Edition Cambridge 2014, 408p.**

[4] Fluorescence Excitation-Emission Matrix Characterization of some sewage-impacted rivers; **Andy BAKER**, Department of Geography, University of Newcastle-upon-Tyne, Newcastle-upon-Tyne, NE1 7RU, U.K. Environ. Sci. Technol. **2001, 35, 948-953p.**

[5] Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques; **M.M.D. Sierra, M. Giovanela, E.Parlanti,E.J. Soriano-Sierra, Chemosphere 58 (2005) 715–733p.**

Sites internet :

[6] <https://www.aquaportail.com/definition-5420-matiere-organique.html>_

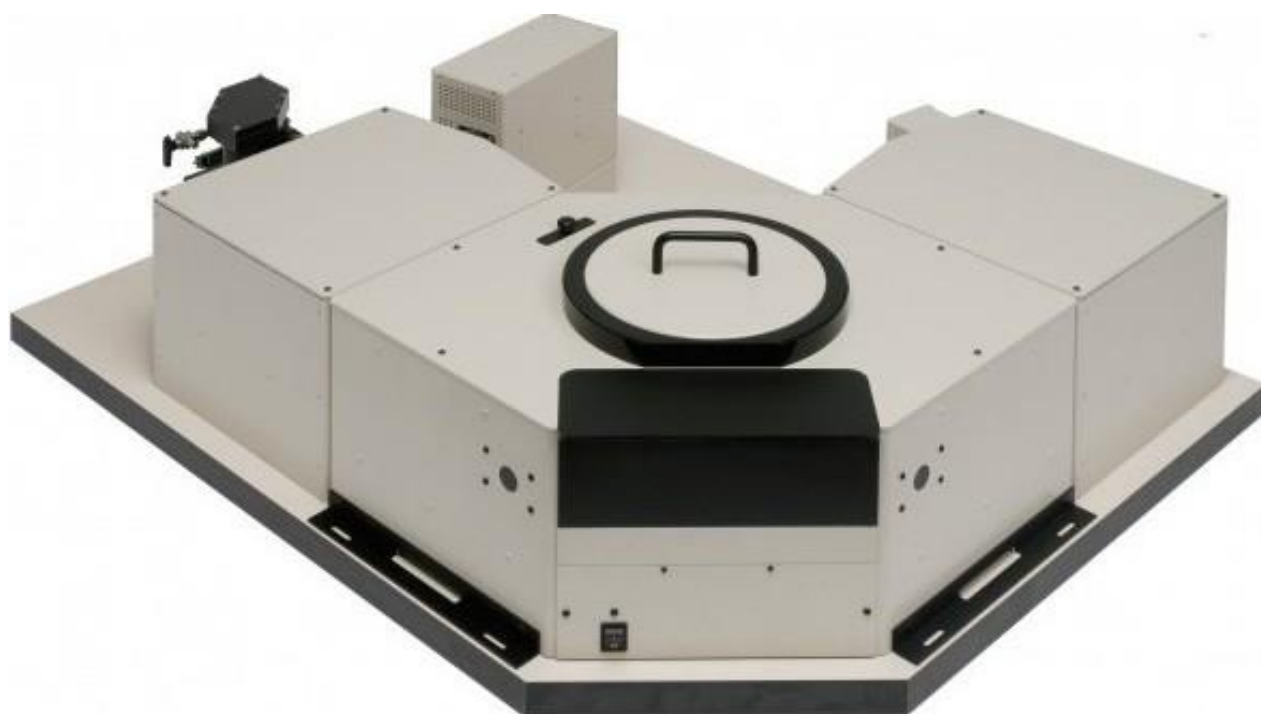
[7]https://www.pirensaine.fr/sites/default/files/PIREN_documents/phase_7/rapports_annuels/2016/a2b123_Baratelli_PIREN_2017.pdf

[8]http://www.aquaref.fr/system/files/G2a2rapport2015_AQUAREF_UVvis_MO_Masson_vfinale.pdf

Sommaire des annexes

- Annexe 1 : Spectrofluorimètre utilisé à Pau
- Annexe 2 : Tableau récapitulatif des indices bruts
- Annexe 3 : Tableau récapitulatif des indices corrigés
- Annexe 4 : Spectres UV des échantillons
- Résumé-Abstract

Annexe 1 : Spectrofluorimètre utilisé à Pau



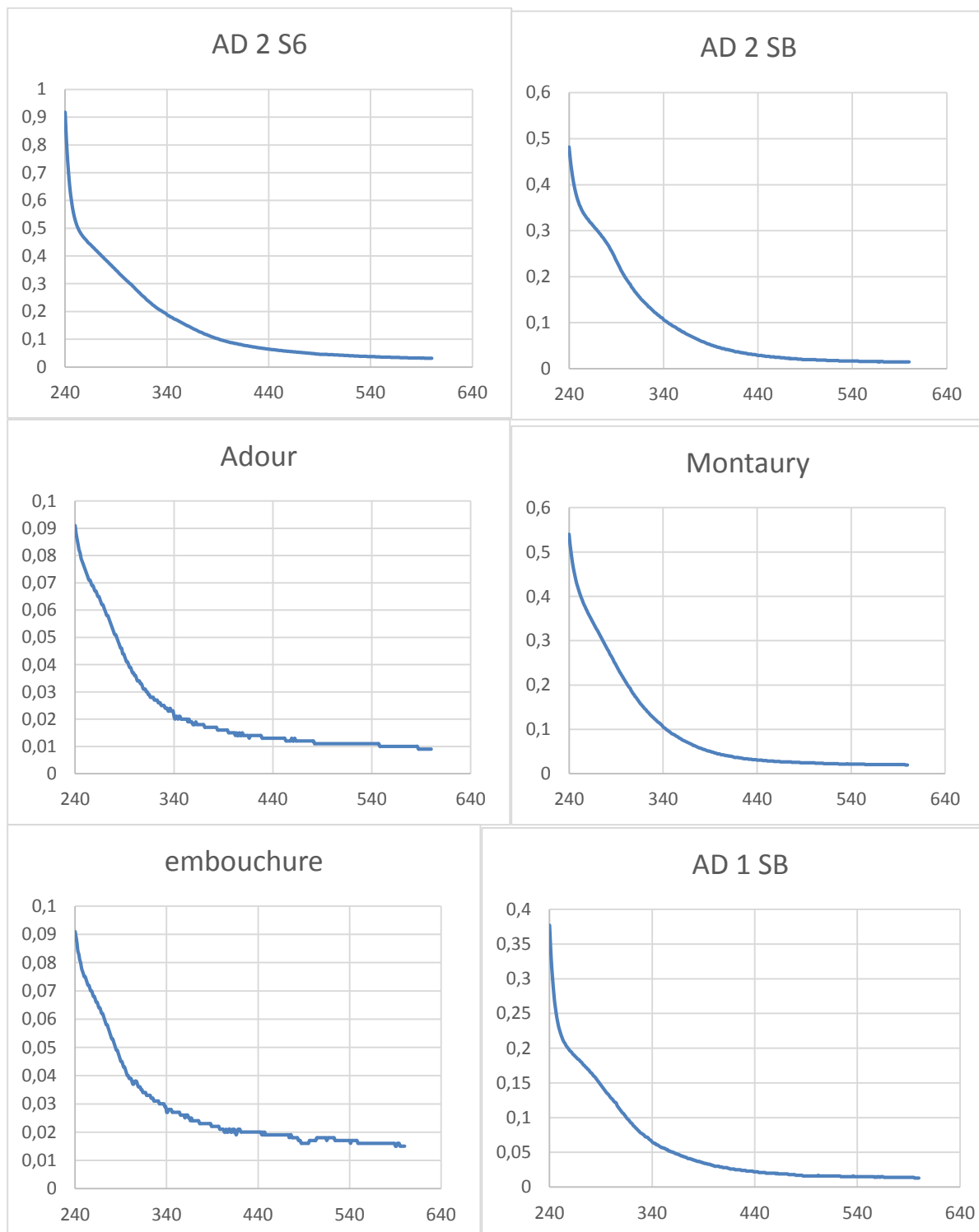
Annexe 2 : Tableau récapitulatif des indices bruts

Nom de l'eau	HIX	BIX	FI	Ratio peakT/PeakC	Type d'eau	Date	saison
UFR Montauray (PAU)		2,11	0,81	1,66	1,04 rivière	16/05/2018	printemps
rivière UFR Montauray		3,34	0,75	1,85	0,5 rivière	16/05/2018	printemps
S3 Ustaritz (Nive)		1,82	0,88	1,84	0,98 rivière	22/06/2017	début été
S1 Urt (Adour)		2,62	0,9	1,71	0,87 rivière	24/07/2017	été
S3 DOM		2,75	0,78	1,61	0,62 rivière	23/08/2017	été
S1 DOM		0,71	0,9	1,75	1,55 rivière	23/08/2017	été
Adour DOM		0,68	1,17	1,75	2,98 rivière	26/06/2017	été
AD 2 DOM SB (Estuaire)		2,75	0,75	1,78	0,58 estuaire	sept-17	fin été
AD 1 DOM SB (Estuaire)		4,3	0,74	1,76	0,42 estuaire	mai-17	printemps
AD 2 DOM SC (Estuaire)		5	0,72	1,73	0,36 estuaire	sept-17	fin été
AD 2 DOM S6 (PAU)		2,62	0,68	2,29	0,54 step	sept-17	fin été
AD 2 DOM S6 (St Frederic)		3,3	0,6	2,44	0,27 step	sept-17	fin été
ESS (Pont de l'aveugle)		2,51	0,92	2	0,48 step	mars-18	printemps(f
step guetary (PAU)		4,11	1,07	2,12	0,61 step	août-17	été
Step guetary		5,21	0,82	2,23	0,27 step	août-17	été
STEP Erro		2,83	1,1	2,29	0,45 step	août-17	été
Step Urru		3,32	0,98	2,21	0,42 step	28/08/2017	été
Embouchure SOMLIT		0,84	1,21	1,85	2,51 rivière/marine	02/06/2017	été
Gouf SOMLIT (PAU)		0,62	1,92	1,71	5,61 marine	02/06/2017	été
Gouf SOMLIT		0,54	1,76	1,8	1,11 marine	02/06/2017	été
G DOM SOMLIT		0,82	1,03	1,75	1,83 marine	16/06/2017	été

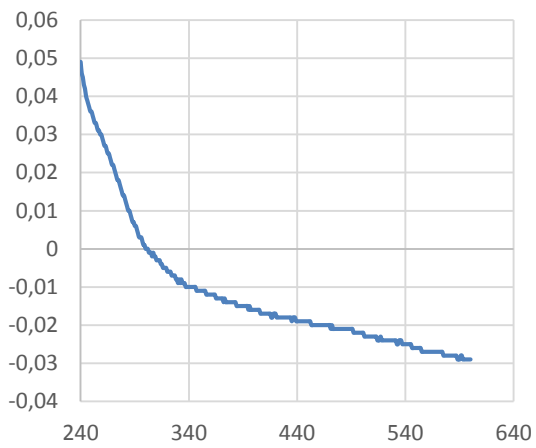
Annexe 3 : Tableau récapitulatif des indices corrigés

Nom de l'eau	HIX	BIX	FI	Ratio peakT/PeakC	Type d'eau	Date	saison
UFR Montauray (PAU)		2,11	0,81	1,66	1,04 rivière	16/05/2018	printemps
rivière UFR Montauray		3,38	0,75	1,85	0,5 rivière	16/05/2018	printemps
S3 Ustaritz (Nive)		2,7	0,87	1,87	0,84 rivière	22/06/2017	début été
S1 Urt (Adour)		3,16	0,89	1,65	0,83 rivière	24/07/2017	été
S3 DOM		5,84	0,77	1,75	0,45 rivière	23/08/2017	été
S1 DOM		0,73	0,89	1,75	1,51 rivière	23/08/2017	été
Adour DOM		0,89	1,2	2	3,2 rivière	26/06/2017	été
AD 2 DOM SB (Estuaire)		3,35	0,75	1,78	0,55 estuaire	sept-17	fin été
AD 1 DOM SB (Estuaire)		7,33	0,74	1,78	0,33 estuaire	mai-17	printemps
AD 2 DOM SC (Estuaire)		8,47	0,7	1,71	0,3 estuaire	sept-17	fin été
AD 2 DOM S6 (PAU)		2,62	0,68	2,29	0,54 step	sept-17	fin été
AD 2 DOM S6 (St Frederic)		3,86	0,6	2,47	0,27 step	sept-17	fin été
ESS (Pont de l'aveugle)		2,67	0,92	2	0,47 step	mars-18	printemps(f
step guetary (PAU)		4,11	1,07	2,12	0,61 step	août-17	été
Step guetary		5,66	0,82	2,24	0,26 step	août-17	été
STEP Erro		2,95	1,1	2,29	0,45 step	août-17	été
Step Urru		3,47	0,98	2,21	0,41 step	28/08/2017	été
Embouchure SOMLIT		1,51	1,25	1,5	2,5 rivière/marin	02/06/2017	été
Gouf SOMLIT (PAU)		0,62	1,92	1,71	5,61 marine	02/06/2017	été
Gouf SOMLIT		0,9	1,6	1,5	0,8 marine	02/06/2017	été
G DOM SOMLIT		1,67	1	1,5	1,25 marine	16/06/2017	été

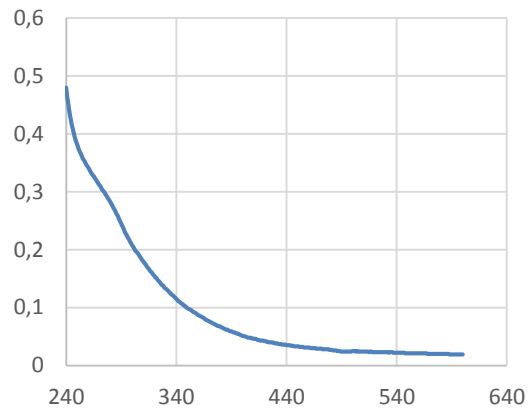
Annexe 4 : Spectres UV des échantillons



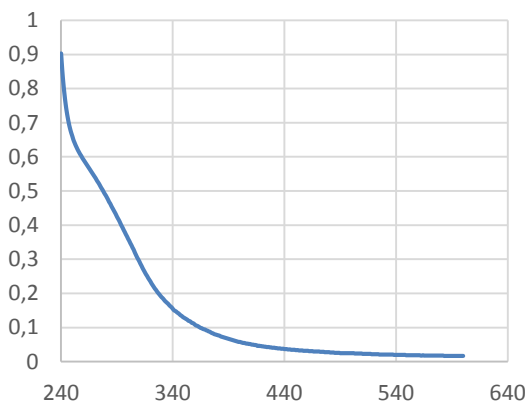
G DOM



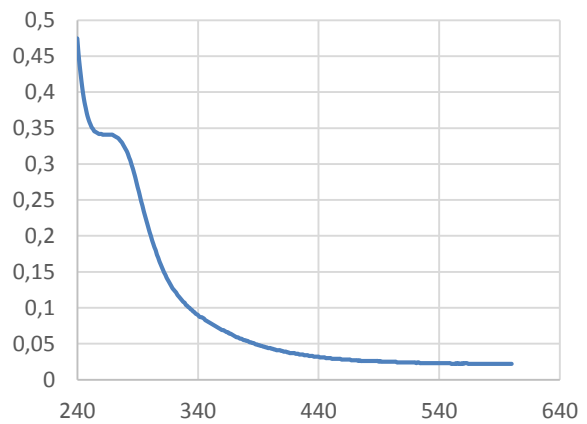
AD 2 SC



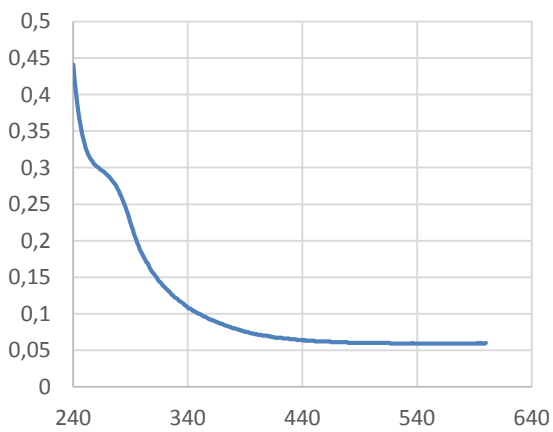
ESS



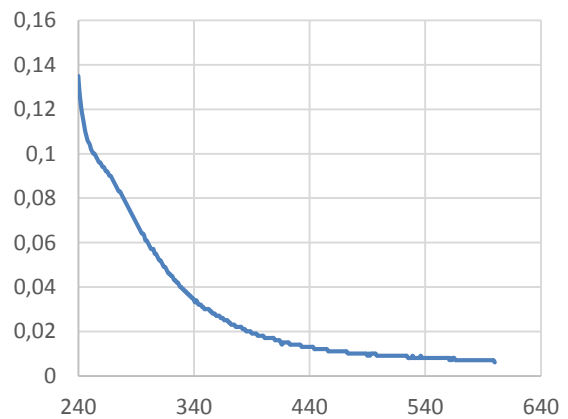
S1 Urt

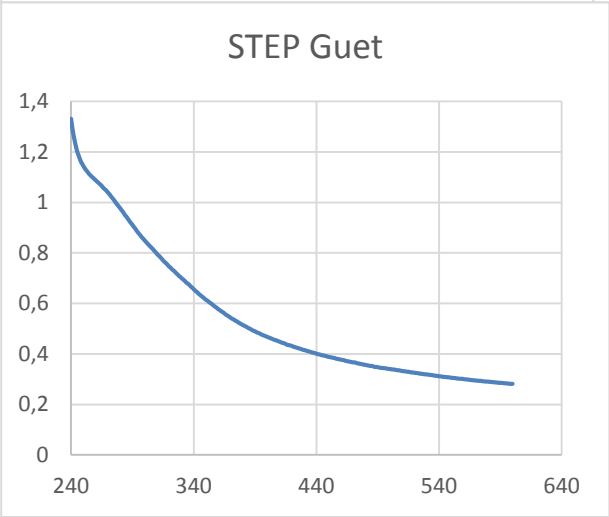
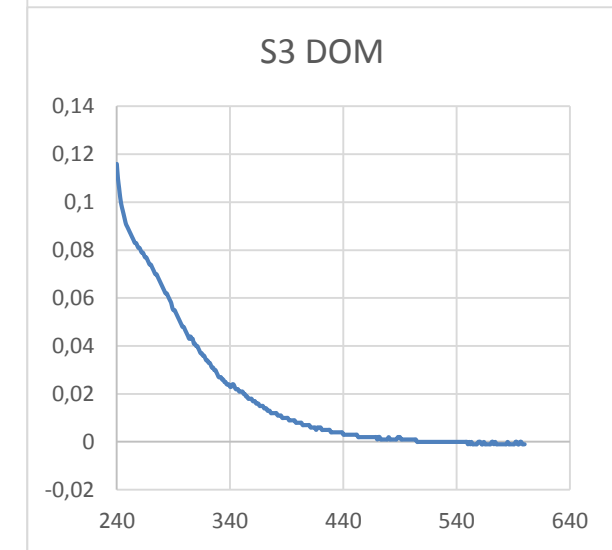
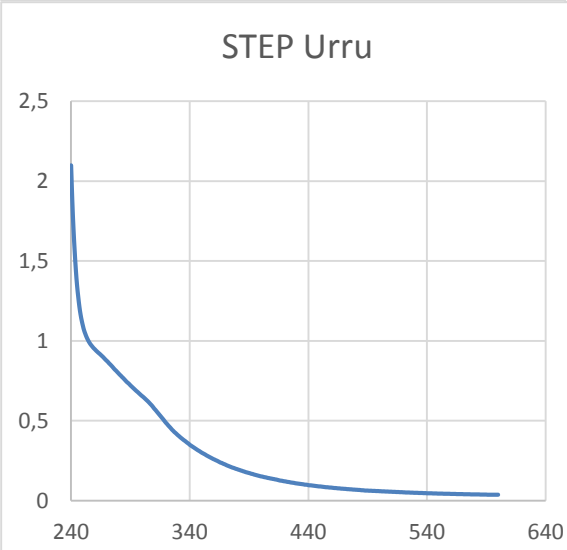
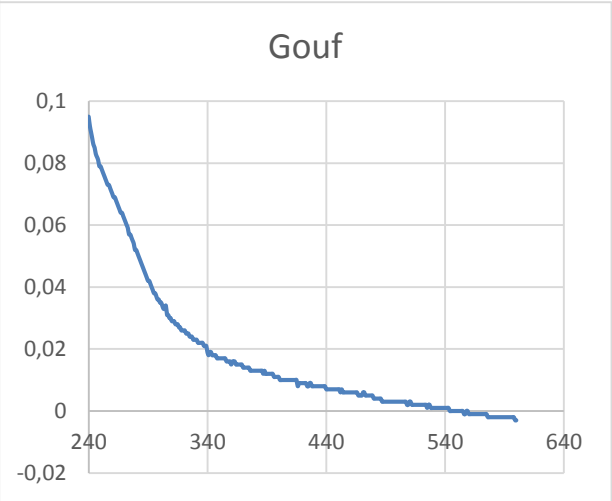
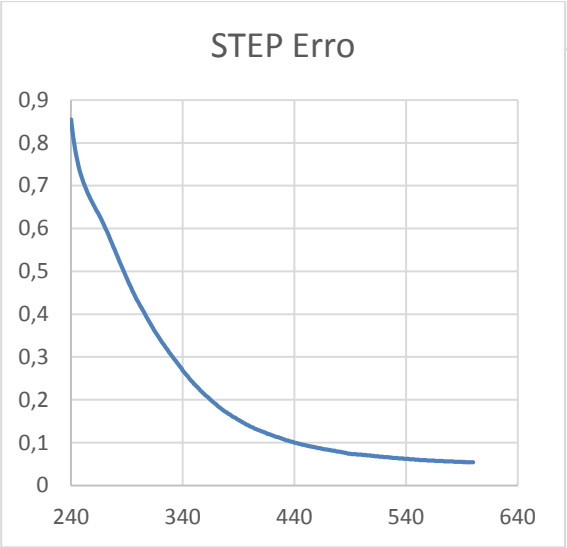


S1 DOM



S3 Usta





Résumé

Un nombre croissant de contaminants liés aux activités anthropiques est rejeté dans l'environnement et dont les dynamiques biogéochimiques sont peu connues.

La matière organique, notamment dissoute (MOD), joue un rôle prépondérant dans la diffusion de ces polluants en influençant leur transport, leur stabilité ou leur biodisponibilité dans les écosystèmes aquatiques. L'objectif de ce stage était d'utiliser les propriétés optiques (absorption et fluorescence) de certains composés de la MOD pour la caractériser et ainsi mieux comprendre les mécanismes de diffusion des contaminants. Cette approche fut permise par la mise au point de protocoles analytiques de spectrophotométrie et de spectrofluorescence sur des échantillons d'eaux de surface.

Mots-Clés : Matière organique dissoute (MOD) ; spectrophotométrie ; spectrofluorescence

An increasing number of contaminants related to anthropogenic activities are released into the environment and their biogeochemical dynamics are hardly known.

Organic matter, especially dissolved one (MOD), plays a predominant role in the diffusion of these pollutants by influencing their transport, stability or bioavailability in aquatic ecosystems. The purpose of this internship was to use the optical properties (absorption and fluorescence) of some MOD compounds to characterize them to understand better the mechanisms of diffusion of contaminants. This approach was enabled by the development of analytical protocols for spectrophotometry and spectrofluorescence on surface water samples.

Key-Words: Dissolved organic matter (DOM); spectrophotometry; spectrofluorescence