

Capteur à membrane de dialyse pour l'étude du milieu interstitiel d'un ruisseau

Quantification d'éléments traces métalliques en milieux aquatiques

¹*Dominique Huteau, Thierry Caquet*

Résumé : *Des populations sauvages de saumon et de truite diminuent dans les cours d'eau. Ce phénomène est dû en partie à la mortalité des œufs et des alevins du fait de la dégradation de leurs conditions de développement. L'augmentation de la concentration de certains éléments traces métalliques (ETM) dissous dans l'eau interstitielle des frayères est l'un des facteurs pouvant expliquer cette mortalité. Nous avons testé cette hypothèse en mesurant les différentes formes d'ETM dans le milieu interstitiel d'un ruisseau du massif Armoricaïn, l'Oir.*

Pour cela, nous avons adapté des capteurs comprenant une membrane à dialyse capable de séparer les formes dissoutes toxiques des formes colloïdales et non dissoutes des ETM.

Avec ces dispositifs nous avons quantifié les trois formes de différents ETM potentiellement toxiques pour les œufs et les alevins de Salmonidés. Les résultats obtenus indiquent que dans le cas de l'Oir, les concentrations des formes dissoutes des ETM sont inférieures aux seuils de toxicité, indiquant ainsi que les ETM ne sont vraisemblablement pas responsables des mortalités observées.

Mots clés : Eau interstitielle, frayère salmonidés, capteur, dialyse, éléments traces métalliques.

Introduction

Depuis une trentaine d'années, on observe la diminution des populations sauvages de saumon et de truite ; la communauté scientifique admet que ce phénomène est dû en partie à la mortalité des œufs et des alevins. Cette évolution est liée à la dégradation des conditions dans lesquelles les œufs et les alevins se développent. En effet, des pollutions diffuses telles que les substances nutritives, les pesticides, les éléments traces métalliques (ETM) et les matières en suspension sont de plus en plus souvent détectées dans les cours d'eau.

Le Massif Armoricaïn n'échappe pas au constat général. Massa (2000) a montré la présence de concentrations anormales d'ETM sur certains affluents frayères. Par ailleurs la toxicité de ces éléments, est plus élevée pour les formes dissoutes (Depledge et al. 1993) et une mesure globale des ETM (formes dissoutes et non dissoutes) ne reflète pas le danger réel qu'ils représentent pour la faune aquatique. C'est pourquoi nous avons voulu mesurer les concentrations des formes dissoutes de certains ETM (zinc, cuivre, cadmium et plomb) dans l'eau interstitielle de sites où la reproduction des salmonidés est perturbée.

Les méthodes de prélèvements traditionnelles par aspiration de l'eau interstitielle ne sont pas satisfaisantes, car trop ponctuelles. C'est pourquoi nous avons adapté et mis en place le dispositif décrit par Gundersen *et al.* (2001) dans les conditions d'incubation des œufs de salmonidés en milieu naturel. L'intérêt de ce procédé est que l'on intègre pendant trois semaines la quantité moyenne des différentes formes chimiques sous lesquelles les ETM sont présents dans le milieu interstitiel. On détermine également la proportion de chaque

¹ UMR INRA Agrocampus EQHC, 65 rue de Saint Briec, 35042 Rennes Cedex

☎ 02 23 48 54 42 Dominique.Huteau@rennes.inra.fr, Thierry.Caquet@rennes.inra.fr

forme chimique (particulaire, colloïdale et dissoute) en prélevant de l'eau interstitielle sans l'altérer et en mesurant directement les concentrations en ETM dissous, reflétant ainsi au mieux le milieu d'incubation des œufs de salmonidés.

Toutes les étapes, de la fabrication et de la mise en place nécessitent en amont de décontaminer le matériel par des traitements acides et de multiples rinçages ; elles sont réalisées en salle blanche dans des conditions de grande propreté.

1. Matériel et méthodes

1.1 Le capteur

Les capteurs que nous avons fabriqués (**figure 1**) sont constitués de deux éléments. Le premier, que nous appellerons protection, est un flacon de polyéthylène haute densité (HDPE) d'un volume d'un litre. Le second est un tube de dialyse fermé à chaque extrémité par des clips en polyéthylène (HDPE) et renfermant de l'eau ultra pure.

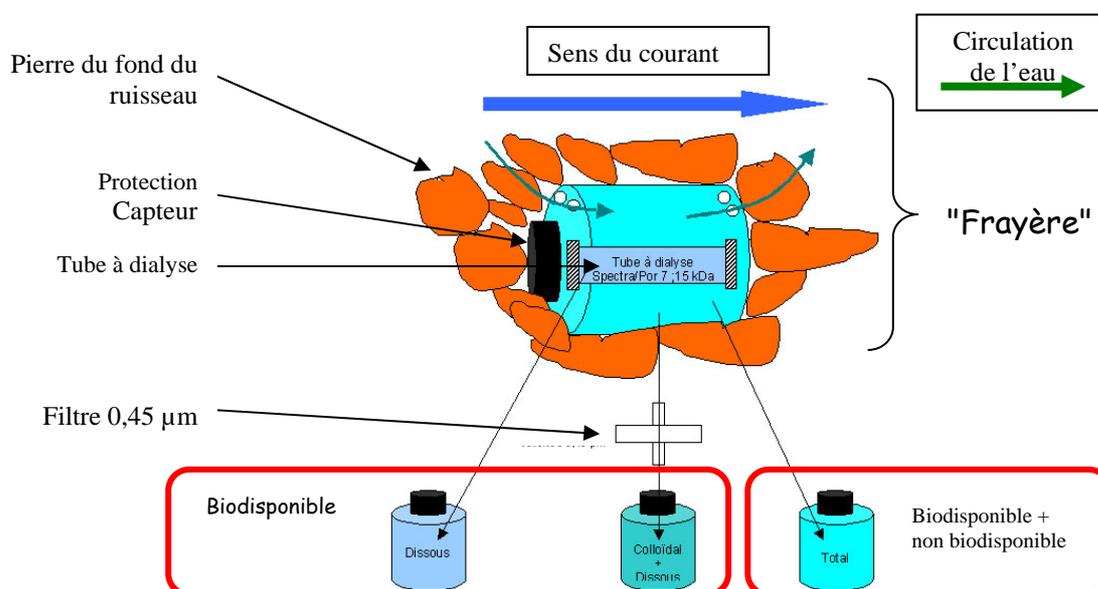


Figure 1 : Représentation schématique du dispositif d'échantillonnage utilisé pour l'évaluation des concentrations des différentes formes d'ETM dans l'eau interstitielle.

1.1.a Principe de la dialyse

C'est la migration des solutés au travers d'une membrane. Cette migration est obtenue par gradient de pression, de potentiel chimique ou de potentiel électrique. Ainsi, les impuretés (sels et solutés organiques de faible masse molaire) migrent pour égaliser le potentiel chimique de part et d'autre de la membrane.

1.1.b Le choix de la membrane de dialyse est fonction de la forme chimique et de la taille des éléments recherchés. Le but est de séparer les formes dissoutes des formes colloïdales. Nous avons tenu compte de la vitesse d'équilibre de la membrane. En milieu naturel, le risque est de voir la membrane détériorée par l'activité microbienne, par la colonisation d'invertébrés aquatiques ou, malgré la protection du flacon, par l'érosion due à la matière minérale fine.

Pour déterminer la durée de mise en place du dispositif nous considérons la vitesse d'équilibre.

En tenant compte de ces éléments et des informations contenues dans la publication de Gundersen et *al.* (2001), nous avons choisi une membrane d'un seuil de coupure de 15 KDaltons. Le conditionnement de la membrane lors de l'achat doit être garanti sans métaux lourds par traitement à l'EDTA² et la membrane doit être conservée en milieu humide avec de l'acide de sodium (antibactérien).

1.1.c Le flacon de protection doit maintenir l'intégrité de la membrane lors de son enfouissement dans le fond du cours d'eau (protection contre les pierres mais aussi contre l'érosion due aux particules les plus fines) tout en conservant son contact avec l'eau interstitielle. Il s'agit de trouver un compromis entre la protection de la membrane et le risque de colmatage du capteur par les particules fines. Nous avons favorisé une circulation de l'eau dans la partie haute du flacon (**figure 1**) grâce à des trous percés à l'aide d'un tube de verre décontaminé chauffé, utilisé comme emporte-pièce. Il est préférable d'utiliser du verre plutôt que du métal dans ce type de préparation afin d'éviter toute contamination. L'encombrement du dispositif a été déterminé afin de le mettre en place dans des conditions de profondeur et d'enfouissement similaires à celles de frayères de salmonidés de taille standard.

Le matériau doit être inerte en termes de relargage d'ETM et résistant aux traitements de décontamination.

1.1.d Matériel

Capteur	Matériel de prélèvement, et de transport
Falcon 1 litre HDPE	Seringue 50 ml
Tube de verre diamètre 7 mm	Tuyau téflon semi rigide adaptable à la seringue 25 cm
Tube dialyse 15 KD 5 mètres, 45 mm, Spectrapor 7 MWCO 15000	Bécher Nalgène PP 250 ml
Clip 45 mm HDPE	Flacon HDPE 30 ml
Bassine de transport alimentaire 30 litres	Filtre 0.45 µm
	Support flacon 1 litre
	Pissette

Tableau 1 : Récapitulatif du matériel nécessaire à la réalisation des capteurs et des prélèvements.

1.1.e Préparation et décontamination du matériel

Les ETM sont naturellement présents en très petites quantités (traces). Les résultats des dosages par ICP-MS³ sont donnés en ppb (part per billion, soit 1 µg/L). L'impact direct d'un tel seuil de détection est d'imposer des conditions de travail strictes afin de limiter la contamination accidentelle du matériel ou des échantillons, notamment en procédant à une décontamination systématique de l'ensemble du matériel utilisé.

Les conditions de travail suivantes doivent être respectées :

² éthylène diamine tétra acétique

³ Analyse par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif

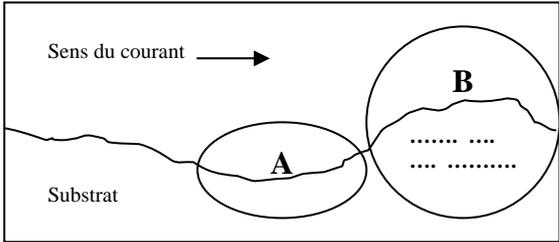
- Salle « blanche » munie d'une arrivée d'air filtrée et placée en surpression, respect de règles strictes concernant l'équipement du personnel utilisateur en blouse et chaussures, utilisation de gants non poudrés au cours des manipulations.
- Qualité de l'eau utilisée au cours des lavages, et des préparations des différentes solutions : eau ultra pure produite par un système d'eau désionisée assurant une résistivité supérieure à 18 M Ω .
- Qualité des acides (HNO₃) employés lors des lavages et de l'acidification des solutions : HNO₃ Ultra Pur produit par distillation d'acide nitrique 14N qualité "Pour Analyses" par *sub-boiling*.
- Qualité des flacons, tubes, embouts de pipettes : Utilisation de polypropylène naturel ; l'utilisation de matériaux colorés peut entraîner des contaminations par certains éléments.
- Cycle de décontamination : on effectue les prélèvements avec du matériel décontaminé : l'ensemble du matériel est lavé successivement à l'eau désionisée puis à l'acide nitrique 4N (distillé au laboratoire) avant d'être rincé à l'eau désionisée et enfin séché en étuve à 60°C. Chaque stade de décontamination dure environ 24 h sur plaque chauffante à 60°C. Les membranes à dialyse sont rincées avec de l'eau ultra pure. Douze rinçages sur sept jours à 4°C sont réalisés. Une fois les étapes terminées, les capteurs sont assemblés. Il s'agit de remplir les tubes de dialyse d'eau ultra pure et de les introduire dans les protections. Le transport des capteurs est fait dans une bassine en HDPE remplie d'eau ultra pure. Les autres matériels décontaminés sont emballés après séchage dans du film alimentaire.

1.2 Mise en place

1.2.a Choix des stations

Les survies sous gravier d'œufs de truite sont suivies expérimentalement sur l'ensemble du bassin versant de l'Oir depuis 1999. Ces résultats ont mis en évidence des mortalités différentes selon les affluents. Nous avons choisi les stations selon ces informations en privilégiant les affluents très favorables et non favorables à la survie des œufs.

Qu'est ce qu'une frayère ?



Le diagramme illustre la structure d'une frayère. À gauche, une ligne ondulée représente le 'Substrat'. Une flèche au-dessus indique le 'Sens du courant' vers la droite. Deux zones sont marquées : 'A' est une dépression creusée dans le substrat, et 'B' est un monticule de gravier et pierre situé à l'amont de la dépression. Des pointsillés sont représentés dans la zone B, symbolisant les œufs enfouis.



Une photographie sous-marine montre une truite en train de creuser une frayère dans le gravier du fond d'un cours d'eau. La truite est vue de profil, avec sa nageoire caudale immergée dans le substrat.

Une frayère est un lieu où les géniteurs fraient. Dans le cas des salmonidés, la femelle creuse dans un premier temps une dépression dans le fond du cours d'eau avec sa nageoire caudale, puis elle expulse une fraction d'ovules qui est fécondée immédiatement par un mâle. Les œufs sont déposés dans la dépression puis recouverts par le substrat que la femelle soulève juste à l'amont. Elle renouvelle plusieurs fois cette séquence. Au final, la frayère est constituée d'un trou (A) situé à l'amont d'un monticule de gravier et pierre (B) dans lequel les œufs sont enfouis.

1.2.b Mise en place des capteurs

Les capteurs placés dans un trou creusé dans le fond des cours d'eau sont recouverts d'environ 10 cm de substrat afin de reconstituer la structure d'une frayère.

Un ruban rouge et blanc qui dépasse du substrat a été accroché à l'arrière de la protection afin de faciliter sa détection le jour du retrait. La localisation de chaque capteur est aussi enregistrée grâce à un GPS.

Pendant les étapes de l'étude divers témoins ont été utilisés ; ils sont décrits dans le **tableau 2** avec les résultats de leur dosage.

1.3 Récupération

1.3.a Matériel de prélèvement et de conditionnement

Après décontamination selon le protocole décrit en **1.1.e**, chaque flacon destiné à recueillir les échantillons d'eau a été préalablement pesé à vide puis additionné d'une masse précise (au 1/100 de mg) d'acide nitrique correspondant à 450 µl afin de fixer l'échantillon. La connaissance de cette masse permettra de calculer le facteur de dilution de l'échantillon.

1.3.b Prélèvement



1a



1b

Photos 1a et 1b : Illustration du dispositif mis en place pour effectuer les prélèvements d'eau après le retrait d'un capteur

Le capteur est récupéré et posé sur un support qui maintient le dispositif à l'horizontale (**photos 1a et 1b**). Une seringue munie d'un tuyau en Teflon[®] est utilisée pour aspirer l'eau du flacon à l'extérieur du tube de dialyse. Une fraction est versée directement dans un flacon contenant de l'acide. Elle permet de déterminer la concentration totale en ETM dans l'eau interstitielle. Une seconde fraction est filtrée aussitôt avec un filtre de porosité 0,45 µm adaptable sur la seringue. L'analyse de l'eau filtrée donne la concentration en ETM dissous et associés aux petits colloïdes. La dernière étape du prélèvement consiste à récupérer l'eau contenue dans le tube à dialyse. Une autre seringue équipée avec un autre tuyau en Teflon[®] perce la membrane et aspire l'eau contenant les ETM sous forme dissoute.

Les échantillons prélevés sont placés dans une glacière à 5°C et stockés au laboratoire à 4°C en attendant d'être analysés.

1.3.c L'analyse des échantillons est effectuée par ICP-MS. Les échantillons d'eau interstitielle non filtrée subissent une minéralisation acide afin d'éliminer les particules susceptibles d'encrasser l'appareil. Les échantillons filtrés sur 0,45 µm et dialysés sont analysés directement.

2. Résultats

en ppb		Na 23	Al 27	Ca 44	Cu 65	Zn 66	Cd 111	Pb 208
Bois Tyrel	Dial	saturé	9	2450 3	1,15	4,14	0,03	0,20
	0,45	26486	22	2166 2	1,17	4,07	0,02	0,21
	Brut	30012	4939 6	2383 1	25,31	127,3 9	0,57	28,19
Arçonnaière	dial	23430	3	3108 8	0,58	10,51	0,08	0,04
	0,45	21647	24	1593 3	0,57	13,91	0,04	0,07
	brut	23524	1628 1	1791 4	6,76	64,08	0,36	6,85
Oir Av STEP	dial	20034	6	1778 0	1,91	18,57	0,02	0,04
	0,45	20617	37	1642 0	3,10	185,7 2	0,02	0,19
	brut	22383	6389	1777 1	12,80	242,0 1	0,11	2,99
Moy échantillon dialysé		21732	6	2445 7	1.22	11.07	0.04	0.09
A eau de transport début journée		65	17	0	0,11	1,96	0,02	0,03
B eau de transport fin journée		80	14	0	0,24	5,42	0,01	0,07
C eau 4°C trois sem ext		51	8	0	0,00	0,11	0,00	0,00
D eau tube dialyse transporté		73	5	0	0,72	2,53	0,00	0,03
E eau 4°C trois sem int tube dia non transporté		52	3	0	0,02	0,25	0,02	0,00

Tableau 2 : Résultats des dosages des ETM en µg/l. Les fractions dialysées (dia), filtrées (0.45), brutes (brut) sont présentés pour trois stations d'étude (couleur jaune). La moyenne de l'ensemble des dosages de l'eau dialysée est présentée dans la ligne blanche (Moy échantillon dialysé). Les résultats des témoins sont également présentés (couleur bleue).

Le **tableau 2** présente quelques exemples de résultats obtenus dans trois stations (Bois Tyrel, Arçonnaire, Oir aval STEP⁴), et pour les différents témoins. Les témoins **D** et **E** permettent d'évaluer la contamination résiduelle due au transport et au re-largage éventuel d'ETM par le dispositif. La contamination due au capteur et à ses manipulations est généralement faible.

Les résultats obtenus pour certains éléments comme le calcium, le sodium et l'aluminium illustrent bien le fonctionnement du capteur. Dans le cas du sodium, les concentrations dans les fractions sont du même ordre de grandeur. Cet élément est complètement dissous dans les conditions naturelles, d'où l'absence d'effet de la filtration et de la dialyse. Le calcium est, comme le sodium, présent majoritairement sous forme dissoute ou, s'il est combiné, la taille des complexes reste suffisamment petite pour qu'ils passent à travers la membrane.

On pourrait penser que l'aluminium, de poids moléculaire voisin de celui du sodium, n'est pas retenu par la filtration ou par la dialyse alors que ce n'est pas le cas. Dans l'eau l'aluminium est sous forme dissoute à pH acide (< 5,5) et il est très facilement complexé pour des pH neutres ou alcalins. Dans cette étude, le pH était proche de la neutralité. Ainsi, l'aluminium n'est pas dissous, mais plutôt sous la forme d'hydroxyde d'aluminium (AlOH₃) et d'autres complexes de taille importante. C'est pourquoi l'analyse de la fraction brute indique une valeur environ 5 000 fois plus forte que celle obtenue pour la fraction dialysée.

Les ETM toxiques recherchés suivent les mêmes tendances générales que l'aluminium. Les concentrations dans l'eau brute sont très nettement supérieures à celles des fractions filtrées ou dialysées. La majorité des dosages montre l'existence d'un gradient décroissant entre les concentrations mesurées dans l'eau brute, filtrée et dialysée, ce qui indique que les ETM sont majoritairement sous forme complexée. Cependant, les concentrations mesurées dans les fractions filtrées et dissoutes sont généralement équivalentes, ce qui indiquerait qu'une filtration à 0,45 µm serait suffisante.

Afin d'interpréter ces résultats par rapport au risque présenté pour les poissons, il est intéressant de les comparer avec les seuils de potentialité biologique établis par les agences de l'eau (Système d'évaluation de la qualité de l'eau des cours d'eau, 1999) dans la gamme de dureté de l'eau correspondante (**Tableau 3**).

	Très bonne	Bonne	Passable	Mauvaise	Inaptitude
Cadmium (µg/l)	0.01	0.1	0.37	2.5	
Zinc (µg/l)	2.3	23	52	190	
Plomb (µg/l)	2.1	21	100	370	
Cuivre (µg/l)	0.17	1.7	2.5	7	

Tableau 3 : Représentation des classes d'aptitude de potentialité biologique établis par le SEQ-EAU

Le **tableau 3** montre que les seuils de potentialités biologiques sont différents en fonction de l'ETM considéré et le **tableau 4** reprend les résultats obtenus pour les fractions dialysées dans chaque station et intègre la couleur correspondant à l'aptitude biologique de l'eau en fonction des valeurs mesurées.

		en ppb			
		Cu 65	Zn 66	Cd 111	Pb 208
Bois Tyrel	Dial	1,15	4,14	0,026	0,1989
Arçonnaire	Dial	0,58	10,51	0,080	0,0436
Oir Av STEP	Dial	1,91	18,57	0,020	0,0418

Tableau 4 : Correspondance des taux d'ETM par sites selon les classes d'aptitude du SEQ-EAU

⁴ STEP = Station d'EPuration

Au maximum, les concentrations mesurées indiquent une aptitude "passable" à la biologie. Cette remarque est seulement vraie pour le cuivre en aval de la STEP. Le reste des résultats indique une aptitude bonne voire très bonne, ce qui laisse à penser que les concentrations en ETM ne sont pas de nature à présenter un risque pour les œufs et les alevins de salmonidés.

Conclusion

La mise en place des capteurs a permis de collecter convenablement les fractions dissoutes des ETM dans le milieu interstitiel. De nombreux échantillons ont été perdus en raison d'une rupture de la membrane. Les conditions de conservation des membranes pendant trois semaines dans le milieu naturel ne garantissent donc pas un échantillonnage satisfaisant de l'ensemble des stations. Les analyses des témoins prouvent que les résultats des dosages ont été peu ou pas perturbés par le dispositif expérimental ou par les étapes successives de sa mise en place et de son retrait. Les résultats obtenus confirment qu'il est important, pour caractériser les ETM, de redoubler de précautions et de procéder à une décontamination systématique de l'ensemble des matériaux et ustensiles en contact avec les échantillons. Toutes ces étapes préliminaires restent très « chronophages » et nécessitent l'accès à des structures spécialisées.

Grâce à cette expérimentation nous avons caractérisé convenablement la contamination des ruisseaux frayères par les ETM dissous. La comparaison des concentrations en ETM mesurées avec les seuils définis de qualité pour ces éléments par les agences de l'eau indique que ces éléments ne sont vraisemblablement pas à l'origine des mortalités d'œufs et d'alevins de salmonidés constatées sur les sites étudiés.

Remerciements : Nous remercions nos collègues de l'UMR Géosciences et de l'UMR SAS notamment P. Petitjean et Y. Fauvel pour leurs conseils et la réalisation des analyses.

Bibliographie

- Brémond MR, Perrodon C (1979) Les paramètres de la qualité des eaux, 2^e édition, Ministère de l'environnement et du cadre de vie, Paris.
- Depledge MH, Weeks JM, Bjerregaard P (1993) Heavy metals *in* Calow P. (ed.) Handbook of Ecotoxicology, vol 2.
- Gundersen P, Olsvik P, Steinnes E (2001) Variations in heavy metal concentrations and speciation in two mining-polluted streams in central Norway. *Env Tox Chem* 20 : 978-984.
- Massa F (2000) Sédiments, physico-chimie du compartiment interstitiel et développement embryo-larvaire de la truite commune (*Salmo trutta*) : Etude en milieu naturel anthropisé et en conditions contrôlées. *Thèse de Doctorat en Sciences, Université de Rennes 1*
- Rodier J (1996) L'analyse de l'eau, 8^e édition Dunod, Paris.
- Système d'évaluation de la qualité de l'eau des cours d'eau (1999) Les Études des Agences de l'Eau n°64.