



**HAL**  
open science

# Influence de la matière organique sur la spéciation des radionucléides en contexte géochimique

L. Marang

► **To cite this version:**

L. Marang. Influence de la matière organique sur la spéciation des radionucléides en contexte géochimique. Géochimie. Université Paris-Diderot - Paris VII; Institut de physique du globe de paris - IPGP, 2007. Français. NNT: . tel-00418723

**HAL Id: tel-00418723**

**<https://theses.hal.science/tel-00418723>**

Submitted on 21 Sep 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.

Institut de Physique du Globe de Paris  
Université Paris 7 – Denis Diderot

Ecole Doctorale des Sciences de la Terre

Doctorat

*Géochimie Fondamentale et Appliquée*

**LAURA MARANG**

\*\*\*\*\*

**Influence de la matière organique naturelle sur la  
spéciation des radionucléides en contexte géochimique**

Thèse dirigée par :

Pr. BENEDETTI Marc, Dr. REILLER Pascal

Soutenance le 14 septembre 2007

Jury :

M. MONTAVON Gilles

M. PINHEIRO José Paulo Soares

M. GUYOT François

Mme MOULIN Valérie

M. REILLER Pascal

M. BENEDETTI Marc

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examinatrice

Co-directeur de thèse

Co-directeur de thèse



## Remerciements

Cette thèse s'est réalisée au sein du Laboratoire de Spéciation des Radionucléides et des Molécules (LSRM) (CEA Saclay) et du Laboratoire de Géochimie des Eaux (LGE) (IPGP-Paris VII).

Au terme de ce travail, il m'est particulièrement agréable d'exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui m'ont permis d'entreprendre ce travail de thèse, je tiens donc à remercier :

- Marc Benedetti et Pascal Reiller pour avoir dirigé cette thèse. Merci de m'avoir fait profité de votre grande culture scientifique, différente mais si complémentaire, pour votre enthousiasme et surtout pour votre patience lors de mes « crises scientifiques ».

- Christophe Moulin, directeur du LSRM, qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a ainsi permis de mener à bien ce travail dans un environnement scientifique et humain excellent.

- Les rapporteurs (José Pinheiro et Gilles Montavon) ainsi que les examinateurs (Valérie Moulin et François Guyot) d'avoir accepté de juger mon travail et pour l'intérêt que vous y avez porté.

- Aux nombreux scientifiques que j'ai rencontrés et qui m'ont aidé, en particulier:

\* Le harem de M. (LGE): (dans l'ordre chronologique) Marie, Emmanuelle, Tiphaine, Delphine, Valérie, Emilie, Lucie. Merci à toutes pour votre bonne humeur, nos pauses « goûter », vous avez été un soutien très important tout au long de ma thèse. Merci à Allasane d'avoir été la seule représentation masculine dans mon bureau au cours de cette thèse.

\* Gérard dit GG, j'ai eu l'impression de travailler à coté d'Indiana Jones, merci pour toutes tes histoires.

\* Anciens thésards, colocataires de bureau, stagiaires : Edouard, Caroline, Loïc, Amina, Sandrine.. Que de bons moments passés en votre compagnie !

\* Les enseignant chercheurs du LGE (Roselyne, Eric, Alexis, Bruno, François, Didier) : merci pour l'excellente ambiance qui règne au sein du LGE, merci pour vos conseils et vos encouragements.

\* Monique pour tout le temps que tu m'as consacré pour passer mes échantillons et de ton soutien lors de « l'explosion » de l'ICP-MS et Dominique pour m'avoir appris à utiliser toutes tes techniques analytiques.

\* Le pigeonier au CEA : Merci à tous pour vos conseils scientifiques mais également pour ces grands moments de fou rire. Petite pensée spéciale à Adeline, Thomas et Francis.

\* Les chercheurs du LSRM : Merci pour la bonne ambiance et votre soutien.

\* Michael Kumke et son équipe pour m'avoir accueilli pendant deux mois en Allemagne et en particulier merci à Sascha pour ces longues soirées passées avec moi, la SLRT et une bonne bière.

\* Merci aux correctrices d'orthographe de cette thèse : Caroline et Geneviève.

- et maintenant merci aux non-scientifiques

\* Amis du Collège-Lycée-Fac : merci de m'avoir soutenu, d'avoir fait semblant de comprendre quand je vous expliquais mes manips qui ne marchaient pas, promis c'est enfin fini !!!

\* Un grand merci à mes parents, ma grand-mère, mes sœurs : une petite question pour Anne-julie et Alban : alors ça brille de quelle couleur les déchets radioactifs ?

\* Et pour finir un immense merci à Antonin...

**Merci...**

## RESUME

### **Influence de la matière organique sur la spéciation des radionucléides en contexte géochimique**

Dans le cadre de la prévision du devenir des radionucléides (RN) dans l'environnement, l'intérêt s'est porté sur les interactions de RN tels que le cobalt (II), l'euporium (III) et l'uranium (VI) avec les substances humiques (SH). Le but de ce travail était d'aller vers une meilleure compréhension des interactions entre RN et SH ainsi que la prédiction de l'influence des SH sur la spéciation des RN. Le modèle NICA-Donnan permet de décrire ces interactions en tenant compte de l'hétérogénéité des SH, des effets électrostatiques et de la compétition entre cations. Le modèle avait été calibré avec un jeu de données extrêmement limité dans le cas des RN. En effet, parmi l'ensemble de techniques de spéciation, peu d'entre elles sont adaptées à l'étude des interactions RN-SH en particulier à la mesure de la concentration en métal libre en solution. Dans le cadre de ce travail, nous avons développé et optimisé des techniques de spéciation afin d'acquérir de nouveaux jeux de données, d'étudier l'influence de la compétition sur la spéciation des RN et enfin de tester la capacité du modèle NICA-Donnan à prédire le comportement des RN.

**Mots clés :** Substances humiques, radionucléides, spéciation, technique de spéciation dynamique

### **Influence of natural organic matter on the speciation of radionuclides in a geochemistry context**

The principal aim of this work is the study of the influence of natural organic matter, in particularly humic substances (HS), on the speciation of radionuclides (RN). The studied radionuclides are cobalt (II), europium (III) and uranium (VI). It has been shown that mobility and bioavailability of a metal are related to its speciation. The NICA-Donnan model describes metal ion binding to NOM : it accounts for NOM chemical heterogeneity, competition during binding and ionic strength effects. However the model has been calibrated with a limited number of experimental data for the RN. Indeed there is only a few speciation techniques available for the study of the interactions RN-HS. Within the framework of this study, we have developed and optimised speciation technique (Flux Donnan Membrane Technique and the use of an insolubilised humic acid) in order to acquire new experimental data, we have also studied the effect of the competition on RN speciation and finally we have tested the model capacity to predict the RN behavior in laboratory or *in situ*.

**Key words:** humic substances, radionuclides, speciation, dynamic speciation technique



# SOMMAIRE

---

**Introduction** **p. 1**

---

**Chapitre 1 :** **p. 69**

Donnan Membrane approach : from equilibrium to dynamic speciation

*Laura Marang, Pascal Reiller, Monique Pepe, Marc F. Benedetti  
Environmental Science & Technology 40(17): 5496-5501 (2006)*

---

**Chapitre 2 :** **p. 93**

U(VI) and Mg(II) Competitive Binding to Humic Substances: Implication for Groundwater Chemistry

*Laura Marang, Pascal Reiller, Delphine Jouvin, Marc F. Benedetti  
Submitted in Applied Geochemistry (2007)*

---

**Chapitre 3 :** **p. 125**

Combining spectroscopic and potentiometric approach to characterize competitive binding to Humic Substances: Part 1 and 2

*Laura Marang, Pascal Reiller, Sascha Eidner, Michael Kumke, Marc F. Benedetti  
(in preparation)*

---

**Conclusion** **p. 171**





# INTRODUCTION : INFLUENCE DES SUBSTANCES HUMIQUES SUR LA SPECIATION DES RADIONUCLEIDES

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| <b>1.</b> | <b>Avant-propos</b>   | <b>3</b>  |
| <b>2.</b> | <b>Rôle des colloïdes dans l'environnement</b>  | <b>5</b>  |
| 2.1.      | <i>Densité de charge des colloïdes</i>  | 6         |
| 2.2.      | <i>Rôle des colloïdes dans la dynamique de métaux</i>                                   | 7         |
| <b>3.</b> | <b>Influence de la matière organique naturelle sur la spéciation des radionucléides</b> | <b>8</b>  |
| 3.1.      | <i>Les substances humiques</i>  | 8         |
| 3.1.1.    | Définition des substances humiques  | 8         |
| 3.1.2.    | Propriétés des substances humiques  | 11        |
| 3.2.      | <i>Etat de l'art : interactions substances humiques et radionucléides</i>               | 13        |
| 3.2.1.    | Choix des radionucléides étudiés : Uranium (VI), cobalt (II) et europium (III)          | 14        |
| 3.2.2.    | Etudes qualitatives   | 15        |
| 3.2.3.    | Etudes quantitatives  | 17        |
| <b>4.</b> | <b>Objectifs et Démarche</b>  | <b>28</b> |
| 4.1.      | <i>Objectifs</i>  | 28        |
| 4.2.      | <i>Le modèle NICA-Donnan</i>  | 29        |
| 4.2.1.    | Description du modèle   | 29        |
| 4.2.2.    | Mise en œuvre de la modélisation  | 33        |
| 4.3.      | <i>Les techniques de spéciation</i>   | 33        |
| 4.3.1.    | Définition du terme de spéciation   | 33        |
| 4.3.2.    | Notion de spéciation dynamique  | 34        |
| 4.3.3.    | Présentation des techniques de spéciation   | 37        |
| 4.3.4.    | Analogie entre les techniques de spéciation dynamique et les organismes biologiques     | 40        |
| 4.3.5.    | La Donnan Membrane Technique  | 42        |
| 4.3.6.    | La Spectrofluorimétrie Laser à Résolution Temporelle                                    | 48        |
| 4.4.      | <i>Les substances humiques étudiées</i>   | 52        |
| 4.4.1.    | L'acide humique de Gorleben   | 52        |
| 4.4.2.    | L'acide humique insolubilisé  | 54        |
| 4.5.      | <i>Démarche</i>   | 55        |
| 4.6.      | <i>Présentation du mémoire</i>  | 58        |



## 1. Avant-propos

La pollution des sols et des milieux aquatiques est devenue un sujet de préoccupation majeur pour notre société. En effet de nombreux cas de pollution de systèmes naturels par des métaux lourds, des herbicides, des pesticides et des phosphates ont été dénoncés en Europe. Depuis l'avènement du nucléaire industriel et militaire, un nouveau type de pollution est apparu : la pollution radioactive. L'exemple le plus connu est celui de l'accident de la centrale de Tchernobyl où une augmentation très importante de la concentration des radionucléides (strontium, zirconium, césium...) a été observée dans l'environnement (Virchenko et al., 1993). L'utilisation d'éléments radioactifs dans l'industrie civile et militaire nucléaire entraîne la présence de radionucléides dans l'environnement : ainsi par exemple l'augmentation de la concentration en uranium aux alentours des sites d'extraction ou des zones de stockage d'uranium militaire appauvri (Crançon et al., 2003; Dong et al., 2006). Ces applications industrielles et médicales de sources radioactives provoquent d'autres types de pollution radioactive : le  $^{60}\text{Co}$  est par exemple utilisé comme irradiateur industriel et dans le cadre de la radiothérapie, alors que le  $^{57}\text{Co}$  et  $^{58}\text{Co}$  sont utilisés comme source d'étalonnage, de diagnostics *in vivo* et *in vitro*.

Ainsi, la connaissance et la compréhension des mécanismes de mobilité et de disponibilité des radionucléides dans la géosphère et la biosphère constituent un enjeu capital pour permettre une bonne estimation de leurs risques sanitaires et écologiques. Cette connaissance est d'autant plus nécessaire pour l'étude de la faisabilité d'un stockage de déchets nucléaires. Selon la nouvelle loi sur la gestion des déchets nucléaires de 2006, les déchets faiblement ou moyennement radioactifs sont stockés à la surface dans des centres gérés par l'ANDRA (Agence Nationale pour la gestion des déchets Radioactifs), alors qu'un site de stockage en profondeur doit être proposé par l'ANDRA pour les déchets de haute activité à vie longue avant 2015. Ces derniers représentent 0,2 % de l'ensemble des déchets radioactifs en volume mais ils représentent 96 % de l'activité totale. Les évaluations de sûreté associées à la conception du stockage visent ainsi à représenter la migration des radionucléides sur des durées atteignant le million d'années en rapport avec le contenu radiologique des déchets. Dans le cadre du stockage géologique profond envisagé par l'ANDRA, lors du relâchement des radionucléides par les colis, l'eau serait le principal vecteur de migration, et cette

migration vers la géosphère se ferait principalement sur le mode de la diffusion (ANDRA, 2005).

Les colloïdes peuvent jouer un rôle essentiel dans le transport des radionucléides par le biais de différents processus d'associations. Particules dont la masse est suffisamment faible pour que leur mouvement Brownien les maintiennent en suspension, les colloïdes possèdent des surfaces spécifiques et des propriétés de sorption/complexation importantes. Ces réactions entre radionucléides et colloïdes peuvent entraîner soit une diminution de la mobilité (filtration, sédimentation, adsorption...), soit une augmentation (Nyhan et al., 1985; Buddemeier et al., 1988; Penrose et al., 1990; Kersting et al., 1999; Moulin et al., 1996; Moulin et al., 1995).

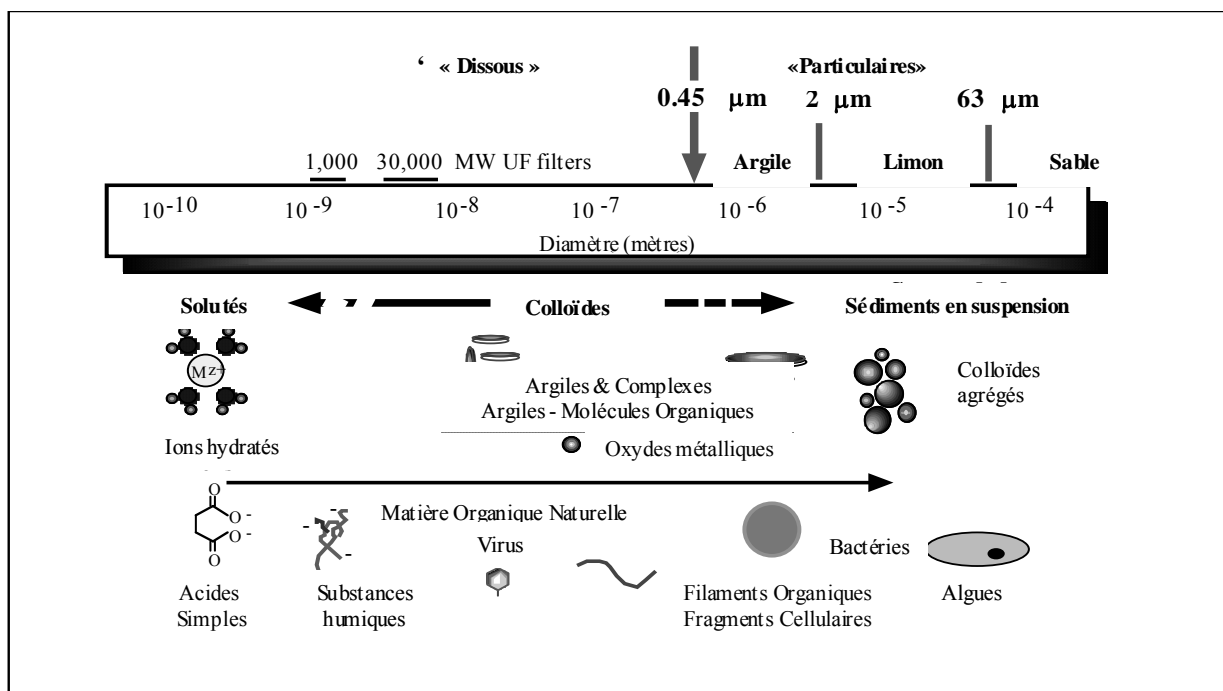
Bien que les problèmes de migration des radionucléides en présence de matière organique naturelle (MON) aient fait l'objet de nombreuses études depuis plusieurs décennies, et que de nombreux projets de recherche européens s'intéressent à cette thématique : MIRAGE (1983-1995), HUMICS (1997-1999), HUPA (2000-2003) et plus récemment FUNMIG (2005-2008), la complexité et l'hétérogénéité de ces colloïdes, ainsi que la multitude d'interactions possibles avec le milieu environnemental, empêchent toute vision claire et globale des mécanismes mis en jeu.

Le projet européen FUNMIG (Fundamental Processes of Radionuclide Migration, FP6-516514), réparti en 5 composants de recherche et développement technologique (RTDC Research and Technology Development Components), a pour objectif l'étude des interactions entre les barrières du stockage des déchets et la biosphère. Mon travail se déroule au sein du RTDC-2 qui se focalise plus particulièrement sur la compréhension des processus fondamentaux gouvernant la migration des radionucléides dans la géosphère et traite en particulier la formation, la migration et le transport des colloïdes inorganiques et organiques. L'étude de la mobilité des radionucléides dans la géosphère requiert dans un premier temps l'obtention de données fiables décrivant l'influence de la MON sur la spéciation des radionucléides afin de comprendre les mécanismes mis en jeu. Elle permet dans un second temps de calibrer des modèles qui pourront par la suite prédire la spéciation, et donc la biodisponibilité et le transport des radionucléides dans des conditions environnementales.

## 2. Rôle des colloïdes dans l'environnement

Présents dans les eaux douces de surface, les eaux souterraines, les océans et les eaux interstitielles des sols et des sédiments (Buffle, 1988), les colloïdes sont des entités organiques ou inorganiques assez grandes pour avoir une structure et des propriétés supramoléculaires, à savoir : la possibilité de changements de conformation ou l'existence d'un champ électrique de surface. Elles sont des entités assez petites pour ne pas sédimenter en l'absence d'agrégation pendant un laps de temps assez long (Buffle, 1988). La gamme de taille est fixée entre 1 nm et 1  $\mu\text{m}$  (Koopal, 2001). La **Figure 1** présente une classification en fonction de la taille des composés majoritaires dans les milieux aquatiques. Parmi eux, la classe des colloïdes contient la matière organique naturelle, les oxydes métalliques ainsi que les argiles.

Etant données, les différentes sources qui contribuent à la génération de colloïdes dans l'environnement, leur nature est très variée et dépend avant tout de leur mécanisme de formation.



**Figure 1.** Classification en fonction de la taille des composants inorganiques et organiques en milieu aqueux (adapté d'après Ranville et al., 1999).

## 2.1. Densité de charge des colloïdes

La stabilité des particules colloïdales ainsi que leurs interactions avec les métaux vont dépendre non seulement du potentiel électrique dans la double couche diffuse mais également de la densité de charge de surface des particules colloïdales (Harter et al., 2001).

La charge de surfaces des colloïdes inorganiques, c'est-à-dire les colloïdes minéraux, dépend de l'existence et de la valeur du point de charge nulle, défini comme étant le pH auquel les densités de charge positives et négatives sont égales (Sposito, 1989). Pour les colloïdes de type argile minéralogique, la charge de surface est composée pour une part de charges permanentes et d'autre part de charges variables. Les charges permanentes sont dues à des substitutions isomorphiques dans les feuillets. Ces substitutions confèrent à l'ensemble du feuillet une charge négative et créent des sites d'échange avec les cations en solution. Les charges permanentes des colloïdes argileux peuvent ainsi retenir les cations métalliques par des forces électrostatiques ou un échange ionique entre les cations métalliques et les sites de charges permanents peut être observé. Ces échanges sont rapides et réversibles. En ce qui concerne les charges variables dont est en partie constituée la charge de surface des argiles, c'est la présence de groupements hydroxyles en bordure des argiles qui en est à l'origine. Le degré de déprotonation de ces groupements est dépendent du pH du milieu. Ils sont ainsi capables de réagir de manière spécifique avec les métaux.

Les oxyhydroxydes de Fe et Al possèdent des groupes fonctionnels hydroxyles. Ces groupes amphotères qui subissent des réactions de protonation ou de déprotonation produisent des charges de surface positives ou négatives en fonction du pH (Buffle, 1988). Ces groupements fonctionnels sont impliqués le plus souvent dans des réactions spécifiques de complexation de métaux. Cependant, les métaux peuvent être également complexés de manière non spécifique à la surface des oxydes à travers des réactions d'échange d'ions ou de coprécipitation à la surface des oxydes.

Comme nous le verrons par la suite, la fonctionnalité de la matière organique naturelle est constituée de fonctions carboxyliques, phénoliques, amines... Ainsi, la charge de surface de la MON toujours négative, varie en intensité selon le pH du milieu et provient de la dissociation des groupements fonctionnels (Tipping, 2002). Les groupes acides R-COOH et R-OH contribuent en majorité à la nature acide de la MON. Le type de complexes formés et/ou la force de liaison avec laquelle les métaux vont se complexer, dépendent de l'état électronique

des sites de complexation, des chaînes aliphatiques associées, de la présence éventuelle d'un noyau aromatique, et de la géométrie du site fonctionnel.

Dans un système naturel, les particules colloïdales sont le plus souvent des particules composites. Ce sont des particules associées à d'autres composés, comme par exemple, les particules d'argile qui possèdent un revêtement d'oxyhydroxydes de Fe et/ou de matière organique. Les différents composés qui constituent ces particules colloïdales composites sont tous caractérisés par des propriétés de surface différentes : selon la nature et la densité des groupes fonctionnels, selon la charge de surface et selon les propriétés de complexation (Buffle, 1988).

## **2.2. Rôle des colloïdes dans la dynamique de métaux**

Le processus de mobilisation des colloïdes et les facteurs influençant ces processus ont surtout été étudiés en milieu poreux artificiel, sur des colonnes de sol en laboratoire ou sur des blocs de sols structurés non remaniés. Aux vues de ces études, la libération de particules à partir de la matrice du sol suite à des changements dans la chimie de la solution apparaît comme l'un des processus responsable de la mobilisation des colloïdes. Un pH élevé et une faible force ionique conduisent en effet à une augmentation de la double couche des particules colloïdales, ce qui favorise la dispersion des particules (Kaplan *et al.*, 1996). La mobilité des particules colloïdales peut alors être limitée soit par des phénomènes de piégeage physique soit par attraction physico-chimique par des surfaces. Le piégeage est contrôlé par la dimension des pores et par la taille et la morphologie des particules colloïdales. Mais les colloïdes peuvent également être immobilisés par rétention par des forces électrostatiques ou de van der Waals. Ce processus est appliqué lorsque les surfaces colloïdales sont chargées positivement car la matrice des sols et des sédiments a généralement une charge nette négative. Inversement, lorsque les particules colloïdales portent une charge négative, les interactions sont limitées avec les sols et sédiments sableux comme dans le cas de la MON (Artinger *et al.*, 2002; Bryan *et al.*, 2005).

On considère généralement que les mécanismes de liaison entre les métaux et les colloïdes sont les mêmes que ceux existants avec les autres constituants du milieu naturel (adsorption, échange d'ions, précipitation). Cependant, du fait de leur petite taille, de leurs surfaces spécifiques élevées et de leurs propriétés de charge, les colloïdes mobiles peuvent potentiellement avoir une plus grande affinité avec les métaux (par unité de masse). Par conséquent, l'association des métaux aux colloïdes peut augmenter leur mobilité au sein des



horizons et le transport des métaux en profondeur (Buddemeier et al., 1988; Kersting et al., 1999; Weng et al., 2002).

Dans un environnement dominé par de fortes concentrations de MON, le transport des métaux pourrait donc être conditionné par leurs interactions avec ces particules colloïdales. Les expérimentations en laboratoire ont effectivement montré que la complexation des radionucléides avec ces particules humiques colloïdales faciliterait leurs transport (Choppin, 1992; Artinger *et al.*, 2002; Schafer *et al.*, 2003; Maes *et al.*, 2006), ce qui a également été vérifié sur le terrain (Fujikawa et al., 1999; Crançon et al., 2003).

### **3. Influence de la matière organique naturelle sur la spéciation des radionucléides**

#### **3.1. Les substances humiques**

##### **3.1.1. Définition des substances humiques**

La plupart du carbone terrestre (99,55%) est incluse dans les roches sédimentaires qui jouent le rôle à la fois de puits et de réservoirs pour le carbone à l'échelle des temps géologiques. Le carbone restant ( $\cong 4 \cdot 10^{19}$  g) se trouve dans la biosphère ou les sous-couches superficielles : 90 % le sont sous forme de carbonates dissous dans l'eau de mer, et près de 9 % seulement le sont au sein de composés organiques. Dans les sols, les eaux naturelles et les sédiments, la majorité du carbone organique est sous forme de matière organique naturelle (Thurman, 1985; Buffle, 1988).

Stevenson (1982) considère que la MON des sols est constituée de débris organiques (matière organique à la surface des sols), dont une fraction provient des résidus de plantes, une autre de biomasse du sol, et une dernière d'humus stable. Cette dernière fraction est prédominante dans la plupart des sols (agriculture, forêt, lande). L'humus se compose de substances humiques (SH) et de substances non humiques : ces dernières contiennent des acides aminés, des résines, des petites molécules organiques.

Les eaux naturelles contiennent également des substances humiques ainsi que des solutés identifiables. Thurman (1985) a listé les principales classes des solutés identifiables (acides carboxyliques, phénols, acides aminés) mais prévient de la difficulté de définir les SH aquatiques.

Les substances humiques peuvent donc être définies comme :

- « Un ensemble de substances de poids moléculaire relativement élevé, et formé par des réactions de synthèse secondaire » (Stevenson, 1982)
- « Une catégorie de substances organiques naturelles, d'origine biologique et hétérogène, qui peut être généralement caractérisée comme étant de couleur jaune et noire, de haut poids moléculaire » (Aiken *et al.*, 1985)

L'importance des SH a d'abord été reconnue en agriculture du fait de leur effet bénéfique sur la structure des sols, de leur capacité de rétention d'eau et de leurs qualités nutritives. Ces bénéfices ont cependant un revers : les SH posent un problème dans le traitement de l'eau où l'on cherche à les éliminer pour éviter la coloration des eaux de boisson (Tipping, 2002). Mais c'est son rôle dans les environnements naturels qui suscite aujourd'hui le plus grand intérêt. Les SH interviennent en effet dans la plupart des processus biogéochimiques (**Tableau 1**) (Tipping, 2002). Il est par conséquent nécessaire de mieux comprendre leur propriété et leur rôle dans l'environnement.

**Tableau 1.** Exemples de processus environnementaux auxquels participent les substances humiques.

| Processus                               | Rôle des substances humiques  |
|---|---|
| Cycle du carbone                        | Un des compartiments majeurs du carbone : transformation, transport et accumulation |
| Pénétration de la lumière dans les eaux | Absorption de la lumière par les chromophores des SH                                |
| Nutriments                              | Réservoir (carbone, azote, phosphore) et contrôle (fer et phosphate)                |
| Altération                              | Augmentation des vitesses de dissolution des minéraux                               |
| Processus photochimiques                | Méiateur ou initiateur de processus photochimiques                                  |
| Devenir des métaux lourds               | Complexation, transport, influence sur la biodisponibilité                          |
| Stockage des déchets nucléaires         | Complexation, transport dans les eaux souterraines                                  |

Il est commode de définir les SH en termes opérationnels selon les procédures d'extraction utilisées afin de les isoler. Les procédures d'extraction de SH à partir de la MON permettent d'obtenir trois fractions :

- l'humine est la fraction insoluble quel que soit le pH
- les acides humiques (AH) représentent la fraction insoluble à pH acide ( $\text{pH} < 2$ )
- les acides fulviques (AF) représentent la fraction soluble quelle que soit la valeur du pH.

Une fois les procédures opérationnelles permettant d'extraire les fractions humiques établies, MacCarthy (2001) propose les formulations suivantes pour les définitions des substances humiques :

1. Les substances humiques consistent en un mélange extraordinairement complexe et amorphe de molécules hautement hétérogènes, réactives chimiquement mais pourtant réfractaires. Elles sont produites lors des premières étapes de la diagenèse de la biomasse, par des processus impliquant aléatoirement différentes réactions chimiques entre espèces provenant d'un fond commun de molécules diverses, et par l'intermédiaire d'altérations chimiques aléatoires de précurseurs. Elles sont omniprésentes dans l'environnement.
2. L'hétérogénéité moléculaire inhérente aux substances humiques rend le matériau humique hautement réfractaire, leurs donnant de ce fait un rôle clef dans le système écologique terrestre.

La définition des SH n'inclue donc pas une définition de la fonction des SH, comme c'est le cas pour la plupart des autres composés intervenant dans des réactions biochimiques (enzymes par exemple). Le but de la recherche sur les SH est donc de déterminer leur fonction pour différentes conditions environnementales. La proportion de AF et AH dans les SH varie considérablement et est fortement influencée par leur environnement. En général, les SH aquatiques contiennent une plus grande partie d'AF solubles tandis que les sols et les sédiments contiennent une plus grande partie d'AH. Dans les deux cas, la fraction d'humine est toujours minoritaire. A l'exception de leur procédure d'extraction, les AF et AH ont un continuum de propriétés (Milne *et al.*, 2001).

### 3.1.2. Propriétés des substances humiques

Les SH étant issus de la dégradation des molécules du vivant, les éléments majoritaires représentés sont, par ordre d'abondance, le carbone (40–60 %), l'oxygène (35–45 %), l'hydrogène (5 %), l'azote (1–5 %) et le soufre (< 2 %). Ces abondances sont représentatives de l'historique de la formation des SH. Les rapports H/C et O/C permettent suite à des corrélations, d'avoir une indication sur les origines (aquatique, marine, sédimentaire) ainsi que sur l'aromaticité (Rice et al., 1991). Un rapport H/C proche de 1 révèle un caractère aromatique alors qu'un rapport proche de 2 révèle un caractère aliphatique. Les SH sont donc chimiquement complexes et hétérogènes. Elles sont de plus polydisperses et polyfonctionnelles. Les SH ne correspondent pas à des familles chimiques définies : il est par conséquent difficile de définir leur structure moléculaire de manière claire et reproductible.

La polydispersité indique que les SH présentent une grande gamme de forme et de taille de molécule. De plus, ces caractéristiques dépendent du milieu étudié. En général les SH d'un sol ont une taille plus grande et un poids moléculaire plus élevé que les SH aquatiques (Swift, 1989). Par ailleurs, les AF aquatiques ont un poids moléculaire entre 500 – 1500 Da et les AH aquatiques entre 5000 – 10 000 Da alors que les AH des sols peuvent avoir un poids moléculaire jusqu'à 30 000 Da. Ces grandes valeurs de poids moléculaires seraient due à une agrégation de molécules plus simples (Stevenson, 1982; Wershaw, 1993). La structure en agrégats est défendue par les travaux de Piccolo *et al.* (1996) en chromatographie d'exclusion stérique à haute performance (HP-SEC). Les auteurs ont en effet constaté un déplacement de la distribution en taille relative des substances humiques vers les plus faibles tailles en présence d'acide carboxylique. Cette modification serait due à la rupture des liaisons hydrophobes de type Van der Waals ainsi qu'à la dissolution des acides organiques dans la structure des substances humiques. Conte & Piccolo (1999) ont pu observer la même influence de l'addition du méthanol sur la distribution en taille des agrégats d'humiques. Le méthanol peut effectivement former des associations de type hydrophobe avec les parties organiques et des associations hydrophiles avec les fonctions oxygénées. La structure des agrégats humiques pourrait donc être décrite comme une organisation de domaines hydrophobes stabilisés par des liaisons faibles de type Van der Waals et entourés de domaines hydrophiles stabilisés par des liaisons hydrogènes.

Il est à noter que les récents résultats obtenus en spectrométrie de masse couplée à une ionisation électrospray, montrent bien que les SH sont constituées de nombreuses molécules

dont les masses s'étagent d'une centaine de Daltons à quelques kiloDaltons (Leenheer et al., 2001; Plancque et al., 2001; Reemtsma et al., 2005). Les liaisons faibles qui maintiennent la cohésion des agrégats humiques de tailles apparentes importantes, ne résistent pas à cette technique d'ionisation pourtant réputée douce.

Quant à la polyfonctionnalité chimique, cette seconde caractéristique des SH tient au grand nombre de groupes fonctionnels présents. La teneur en groupements acides dans les SH, exprimée en mole de groupements réactifs, est généralement comprise entre 3 et 14 eq H<sup>+</sup>/ kg SH (Milne *et al.*, 2001). Si les groupements de type carboxyliques et phénoliques sont majoritaires, les SH présentent aussi des groupements fonctionnels de type alcool, amine, amide, carbonyle, soufre et quinone (Buffle, 1988). En fonction du pH du milieu, certains groupes fonctionnels des SH peuvent alors s'ioniser. Cette ionisation conduit à l'apparition de charges négatives qui donnent aux SH la capacité de complexer des cations et donc des métaux. Cette dissociation provient de la dissociation des groupements carboxyliques, phénoliques et alcooliques, mais également de certains groupements moins abondants tels que le soufre. Elle peut également provenir de la protonation des groupements azotés (Croué *et al.*, 2003). Les constantes de protonation de l'ensemble de ces fonctions couvrant l'ensemble de la gamme de pH, la charge négative des SH augmente avec le pH au fur et à mesure que les fonctions se dissocient.

La connaissance de la concentration en SH dans les sols, les eaux et les sédiments est ainsi nécessaire pour l'étude de leurs effets sur le devenir des cations. La concentration des SH est liée à la dynamique de leur production dans les différents compartiments. Le dynamisme de production de la matière organique dissoute dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux marines a été discuté par Buffle (1988) et Thurman (1985), tandis que Tipping (2002) a concentré son domaine d'étude sur les sols. La gamme de concentration observée dans différents systèmes naturels est présentée dans le **Tableau 2**. Par exemple, les concentrations de SH dans les eaux souterraines sont souvent faibles (**Tableau 2**). Ces faibles concentrations reflètent un long temps de résidence et une possible adsorption avec des matériaux présents dans ces aquifères. Cependant, certaines eaux souterraines contiennent des concentrations en SH beaucoup plus importantes. Dans le site de Gorleben, des eaux souterraines contiennent jusqu'à 100 mg.L<sup>-1</sup> de SH du au lessivage de la lignite (Buckau *et al.*, 2000; Wolf *et al.*, 2004).

Le carbone organique dissous (COD) est souvent la meilleure indication de la concentration en SH. C'est pourquoi les modèles d'interactions métal-SH et leurs jeux de données obtenus pour les substances humiques ont été utilisés pour déterminer la spéciation de métaux dans les solutions de sols ou des eaux de surface (Weng et al., 2002; Cances et al., 2003; Kalis et al., 2006). Cependant cette détermination de la spéciation des métaux est limitée : la proportion de carbone réactif, et donc la proportion d'AH et d'AF, reste la plupart du temps inconnue et varie considérablement d'un environnement à un autre.

**Tableau 2.** Gamme de concentrations caractéristiques des SH dans les eaux naturelles (Thurman, 1985, Tipping, 2002).

| Source            | Contribution des SH dans le carbone organique dissous (mg C.L <sup>-1</sup> ) |
|-------------------|---|
| Eaux souterraines | 0,2 – 15  |
| Eau de mer        | 0,5 – 1   |
| Lac               | 1,0 – 4,0   |
| Rivière           | 0.5 – 100   |

Lors de la modélisation de la spéciation de métaux, pour pallier à cette indétermination, cette proportion est soit fixée en faisant référence à des travaux antérieurs (Cances *et al.*, 2003), soit elle fait l'objet d'optimisation (Ranville et al., sous presse; Weng et al., 2002). Kalis *et al* (2006) ont étudié la spéciation de plusieurs métaux (cuivre, zinc, cadmium) dans une eau de surface, puis ils ont modélisé leur spéciation en faisant varier la proportion d'AH et de AF. Aucune proportion n'est capable de prédire correctement l'ensemble des spéciations des métaux étudiés.

### 3.2. Etat de l'art : interactions substances humiques et radionucléides

Une meilleure compréhension de la manière dont les SH contrôlent le comportement des RN est d'un intérêt considérable. Les résultats présentés dans cette partie concernent uniquement le cobalt (II), l'euporium (III) et l'uranium (VI).

### **3.2.1. Choix des radionucléides étudiés : Uranium (VI), cobalt (II) et europium (III)**

Les trois RN étudiés ont été choisis car ils ont chacun un comportement et une application environnementale différente. L'uranium, le cobalt et l'europium sont essentiellement d'origine naturelle mais l'enrichissement des deux premiers dans les sols, sédiments, eaux de surface, eaux souterraines est associé aux usages anthropiques (cycle du combustible nucléaire, utilisation militaire, combustion du charbon, recherche médicale...). L'europium n'a quant à lui pas d'application industrielle mais il peut être considéré comme un analogue des actinides (III). La connaissance du comportement chimique des actinides (III) notamment de Am(III), Cm(III) et également Pu(III) est d'un grand intérêt pour le stockage des déchets nucléaires. Une analogie entre ces cations et les lanthanides (III) peut être faite lorsque les interactions mises en jeu sont de nature essentiellement ionique. Un grand nombre d'étude est donc disponible pour les lanthanides non radioactifs, en particulier pour l'Eu(III) et Nd(III) dont les rayons ioniques sont proches de ceux de Am(III) et Cm(III). L'europium étant plus facilement manipulable (car non radioactif) et adapté à l'utilisation de technique d'analyse comme la Spectrofluorimétrie Laser à Résolution Temporelle, son utilisation se révèle d'un grand intérêt : elle offre la possibilité d'une analogie avec les actinides (III). La connaissance et la compréhension du devenir de ces éléments toxiques constituent donc un enjeu capital en chimie environnementale pour permettre une bonne estimation des risques sanitaires et écologiques des radionucléides.

L'europium et l'uranium ont également des utilités en géochimie fondamentale. Leurs propriétés chimiques ont en effet permis d'utiliser leur abondance et leur fractionnement isotopique dans les roches comme traceurs de processus cosmochimiques, géodynamiques et pétrogéniques. De plus, l'étude des terres rares, comme l'europium, a permis de mieux contraindre les processus de différenciation de l'évolution chimique de la Terre. Ce n'est cependant que depuis une vingtaine d'années, grâce à la mise au point des techniques d'ICP-MS et à l'abaissement des limites de quantification, que les terres rares, en particulier leur fractionnement sont utilisées, dans les différents réservoirs de l'hydrosphère que sont les océans et les mers. Dans ce cadre, les terres rares sont utilisées non seulement pour tracer les circulations d'eau et de matière mais aussi pour contraindre les mécanismes d'altération. L'uranium est quant à lui un traceur chimique par analogie aux isotopes stables et cinétique (datation, taux de sédimentation...). Les études cinétiques sont basées sur deux types d'approche : l'analyse d'un couple au sein d'une famille radioactive, ou d'un seul

radioisotope. Il est donc important de comprendre la spéciation de ces éléments en solution et en particulier leur complexation avec les SH qui peuvent induire des variations de propriétés.

### 3.2.2. Etudes qualitatives

Tipping (2002) a présenté une revue des aspects qualitatifs des interactions métal–substances humiques. Bien qu'il soit difficile d'établir une interprétation globale de ces interactions, quelques conclusions générales peuvent être données.

Les sites de complexation dans les SH peuvent être répartis en trois catégories :

- Les sites non spécifiques : la complexation des cations est due à leur attraction par la charge négative des SH. Les cations de charges élevées seront plus complexés. Le nombre de sites disponibles est égal à la charge des SH. Dans l'environnement, ces sites sont occupés par les cations majeurs tels que  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$  ainsi que  $\text{Al}^{3+}$ .
- Les sites de faible affinité, très abondants : ils sont formés de ligands contenant des atomes d'oxygène : groupements carboxyliques, phénoliques. Un ou plusieurs atomes peuvent participer à la complexation.
- Les sites de forte affinité, moins abondants. Ils sont formés de combinaison de O, N et S. Ces sites peuvent présenter une large gamme d'affinité et d'abondance. La participation de l'azote a été mise en évidence par des études spectroscopiques. La différenciation entre cations pour la complexation par ces sites est beaucoup plus marquée que pour les sites de faible affinité (Tipping, 2002).

Thomason *et al* (1996) ont étudié la complexation de l'euporium par les SH à l'aide de la spectrofluorimétrie laser résolue dans le temps (SLRT). Le temps de vie de la fluorescence de l'euporium dépend du nombre de molécules d'eau dans la sphère interne de coordination du métal. Il est alors possible de déterminer leur nombre en comparant le temps de vie de la fluorescence dans des solutions de  $\text{D}_2\text{O}$  et  $\text{H}_2\text{O}$ . De plus, la position des bandes d'émission de fluorescence dépend de la charge de l'euporium dans le complexe. Le résultat de l'étude montre que 4 – 5 atomes de SH interviennent dans la complexation. Les auteurs envisagent une série de sites de type mono -, bi -, tri -, tétra –dentate, essentiellement des groupements carboxyliques. La complexation de l'euporium par les groupements carboxyliques est confirmée par l'étude de Shin *et al.* (1996) qui ont comparé le spectre d'absorption de l'euporium d'un AH et d'un AF avec des spectres d'absorption de l'euporium en présence de



ligands plus simples (**Figure 2**). Les liaisons bidentates seraient prépondérantes lorsque l'euporium est complexé par un AF.

| Ligand types | Peak positions (nm)     |                          | Reference                   |
|--------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------------|
|              | EuL <sup>2+</sup> types | EuL <sub>2</sub> ' types |                             |
| Fulvic acid  | 579.04                  | 579.25                   | This work                   |
| Humic acid   | 579.05                  | 579.27                   | This work                   |
| Acetate      | 579.01                  | 579.27                   | Ke <i>et al.</i> (1992)     |
| Succinate    | 579.02                  | 579.25                   | Yoon <i>et al.</i> (1994)   |
| Benzoate     | 579.01                  | —                        | Yoon <i>et al.</i> (1994)   |
| Phthalate    | 579.04                  | 579.28                   | Yoon <i>et al.</i> (1994)   |
| Salicylate   | 579.06                  | 579.28                   | Yoon <i>et al.</i> (1994)   |
| Dipicolinate | —                       | 579.24                   | Horrock and Sudnick (1979b) |

L = carboxylate.

**Figure 2.** Positions des maximums des pics d'excitation de l'euporium complexé par des acides fulviques et humiques, et avec des ligands organiques contenant des groupements carboxyliques (Shin *et al.*, 1996).

Les études qualitatives des interactions entre RN et SH sont présentées ci-dessous:

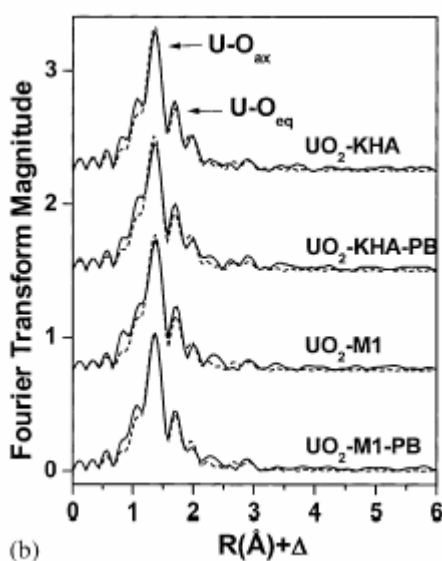
Les études par EXAFS (Extended X-Ray absorption fine structure), ont quant à elles permis d'avoir des informations sur la structure de l'uranium dans le complexe Uranium(VI)-SH. En effet les interférences entre les électrons émis directement d'un métal et ceux de ses voisins proches permettent d'obtenir des informations sur leurs identités et leurs positions.

La présence de O dans la première sphère et de C dans la deuxième est en accord avec une structure du type C-O-M. La coordination par des atomes de O est la seule observée jusqu'à présent (Denecke *et al.*, 1997). Une étude de Schmeide *et al.* (2003) a montré que le fait de bloquer les fonctions phénoliques d'un HA n'influence pas la structure des voisins de l'uranium (VI) (**Figure 3**).

Ainsi, seules les fonctions carboxyliques interviendraient dans la complexation. Cette étude réalisée à pH 2 n'est pas en désaccord avec le résultat à pH 4 de Pompe *et al.* (2000), qui,

après avoir également bloqué les fonctions phénoliques, montre qu'elles interviennent dans la complexation. En effet plus le pH augmente plus les protons des groupements phénoliques se dissocient et plus les groupements phénoliques peuvent intervenir dans la complexation.

Cabaniss (1992) a quant à lui montré que l'inhibition de la fluorescence d'un FA est similaire en présence de cobalt, nickel et cuivre ainsi que le plomb à pH 5 et 7,5, alors qu'il est différent en présence de magnésium. Le cobalt, le nickel et le cuivre auraient ainsi un mode de complexation similaire.



**Figure 3.** Spectres EXAFS après transformation de fourrier de l'uranium complexé à un KHA (acide humique original), KHA-PB (acide humique avec les fonctions phénoliques bloquées), M1 (acide humique synthétique), M1-PB (acide humique synthétique avec les fonctions phénoliques bloquées) (Schmeide *et al.*, 2003).

En conclusion, l'ensemble de ces études a montré que ce sont les groupements de faible affinité (groupements carboxyliques, phénoliques) définis ci-dessus qui interviennent dans la complexation des RN.

### 3.2.3. Etudes quantitatives

La complexation des RN avec des complexes inorganiques est relativement bien connue et il existe de nombreux logiciels de spéciation disponibles :

- ECOSAT (Keizer *et al.*, 1994) ;
- PHREEQC (Parkhurst *et al.*, 1999) ;

- JChess (Ecole des mines de Paris).

Afin de tenir compte également des interactions avec les SH, il est nécessaire de les quantifier. Etant donnée la complexité de la structure des SH, cette quantification ne peut néanmoins reposer sur une structure ou une stœchiométrie de complexes. De plus, si la thermodynamique implique les définitions d'un état standard et de propriétés intensives, le terme de « données thermodynamiques » ne peut donc pas s'appliquer aux paramètres d'interactions métal – SH. Leur structure intime n'étant pas encore connue de manière claire, ni la notion d'état standard, ni celle des propriétés intensives, ne peuvent être appliquées au cas particulier des SH.

### 3.2.3.1. *Modèle discret*

De nombreux auteurs ont dans un premier temps tenté de décrire les interactions SH-RN à l'aide de relations utilisant une adaptation de la loi d'action de masse mais en ne faisant pas d'hypothèse sur la charge du complexe formé. La variété des groupements fonctionnels rend donc difficile l'interprétation univoque des titrages acido – basiques ainsi que l'obtention de constantes prenant en compte l'ionisation de ces fonctions acides. Ceci fut à l'origine de la détermination de constantes de complexation pouvant varier en fonction des conditions physico-chimiques (Bidoglio et al., 1991; Norden et al., 1993; Glaus et al., 1997).

Ne plus considérer les SH comme un ligand mais comme un ensemble de sites disponibles pour complexer les cations est une première voie d'amélioration de la description de ces interactions. Les SH sont donc considérés comme un ensemble d'une même famille de sites indépendants les uns des autres. La concentration de ces sites est alors déterminée par un tirage potentiométrique. L'ionisation progressive des sites acides entraînant la variation de la concentration effective en sites, celle-ci est prise en compte dans la constante apparente. Mais ce type de modèle ne peut être ajusté que pour une gamme de concentration du métal M et de pH réduit car il ne tient pas compte de l'hétérogénéité des SH (Laszak, 1997). La constante d'interaction, que nous noterons  ${}^{AH}\beta$  décrit l'équilibre suivant avec chaque AH correspondant à un site et où les charges sont négligées:



Différentes constantes sont présentées dans le **Tableau 3**. Ce tableau présente que les études qui portent sur les radionucléides étudiés pendant cette thèse (Cobalt, Europium et Uranium (VI)). De nombreuses autres études existent sur d'autres radioéléments tels que l'américium et le curium, comme par exemple les travaux de Moulin et al. (1991,1992).

**Tableau 3.** Constantes de complexation avec les substances humiques d'après des modèles discrets: SLRT (spectrofluorimétrie laser résolue dans le temps), UF (ultrafiltration), MDS (méthode de Schubert).

| Type de SH             | I           | pH                 | log K                                    | [M] <sub>Total</sub> | Technique          | Référence                               |
|------------------------|-------------|--------------------|--|----------------------|--------------------|---|
| AH<br>(europium)       | 0,1<br>1    | 2,7 ; 5,55 ; 6     | 6,2<br>5,5<br>6<br>6,6<br>6,40           | 20 µM                | SLRT               | Bidoglio <i>et al.</i> (1991)           |
| AF<br>(europium)       | 0,01        | 5                  | 6,4<br>6,7                               | -                    | Syn. Fluo.<br>SLRT | Chung <i>et al.</i> (2005)              |
| AF<br>(europium)       | 0,1<br>0,01 | 3 – 6,5<br>3,5 - 5 | 7,17<br>6,88                             | 0,01 nM              | UF<br>MDS          | Norden <i>et al.</i> (1993)             |
| AH<br>AF<br>(europium) | 0,1<br>0,02 | 5 - 10             | 6,1 (pH 5)<br>6,2 (pH 5)                 | 3,5 nM               | Dialyse            | Glaus <i>et al.</i> (1997)              |
| AH<br>(europium)       | 0.1         | 5<br>6.2           | 5.2<br>5.3                               | 1 ppm                | SLRT               | Thèse CEA<br>G. Plancque                |
| AH<br>(cobalt)         | 0,1         | 5, 6, 7            | 4,31<br>3,76<br>7,32<br>7,67<br>(4 sites | 1 - 1,6 µ M          | Fluo de<br>AH      | Monteil-<br>Rivera <i>et al.</i> (2002) |

| Type de SH      | I   | pH        | log K   | [M] <sub>Total</sub> | Technique | Référence                     |
|-----------------|-----|-----------|---|----------------------|-----------|-------------------------------|
|                 |     |           | d'AH)   |                      |           |                               |
| AH<br>(cobalt)  | 0,1 | 5         | 4,28  | 0,1 nM – 0,1 μM      | Dialyse   | Chang <i>et al.</i><br>(2006) |
| AF<br>(cobalt)  | 0,1 | 5         | 3,95  | 0,1 nM - 10 μM       | Dialyse   | Glaus <i>et al.</i><br>(1997) |
| AH<br>(uranium) | 0,1 | 1 - 10    | 6,8 (pH 5)  | 0,1 μM               | Dialyse   | Glaus <i>et al.</i><br>(1997) |
| AH<br>(uranium) | 0,1 | 4<br>10,5 | 5,4<br>6,8<br>(UO <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub><br>HA) | 4 μM                 | SLRT      | Laszak<br>(1997)              |

### 3.2.3.2. Le modèle de neutralisation de charge

Ce type de modélisation a été utilisé au début des années 90 à l'Institut für Nukleare Entsorgungstechnik, au Forschungszentrum Karlsruhe (INE-FZK) (Czerwinski *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1996).

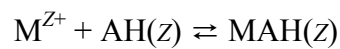
Ce modèle a permis l'interprétation des données expérimentales de complexation des actinides par les SH :

- Europium, américium et curium (III) (Kim *et al.*, 1993; Czerwinski *et al.*, 1996; Panak *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1997; Morgenstern *et al.*, 2000; Monsallier *et al.*, 2001; Kolokassidou *et al.*, 2006);
- Uranium (VI) (Czerwinski *et al.*, 1994; Zeh *et al.*, 1997; Montavon *et al.*, 2000; Sachs *et al.*, 2007);
- Neptunium(V) (Kim *et al.*, 1991; Marquardt *et al.*, 1996; Marquardt *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999; Seibert *et al.*, 2001) ;

- Thorium (IV) (Reiller, 2005).

Ce modèle est fondé sur le principe de la neutralisation de la charge  $Z$  du cation par  $Z$  fonction des SH. La concentration en ligand disponible dépend d'un degré d'activation des sites (augmentation du nombre de site en fonction du pH).

L'équilibre de complexation entre un cation  $M^{Z+}$  et les sites disponibles des SH, suppose la consommation maximale de  $Z$  sites afin de compenser la charge apportée par le cation complexé. L'équilibre s'écrit alors :



La constante d'équilibre décrivant cet équilibre s'écrit donc:

$$\beta = \frac{[MHA(z)]}{[M^{Z+}] \times [AH(z)]_{\text{libre}}}$$

où  $[MHA(z)]$  est la concentration en complexe humique du cation M,  $[AH(z)]_{\text{libre}}$  la concentration en sites d'AH libres et  $[M^{Z+}]$  la concentration en M libre en solution.

La concentration totale en site peut être estimée à partir de la capacité d'échange de protons (CEP en équivalents par gramme d'AH), accessible par titrages potentiométriques des AH. La concentration totale en sites d'AH est définie comme :

$$[AH(z)]_{\text{total}}(eq/L) = \frac{[AH](g/L) \times CEP(eq/g)}{z}$$

où  $[AH]$  est la concentration en AH en g/L,  $[AH(z)]_{\text{total}}$  peut être vue comme la concentration de M de charge  $z$  qui peut être neutralisée par la quantité d'AH introduit.

Cette concentration maximale n'est jamais atteinte. Le facteur de « Loading Capacity » (LC) est défini comme la fraction de sites d'AH disponibles qui peut être effectivement engagée dans la complexation.

$$LC = \frac{[MAH(z)]}{[AH(z)]_{Total}} = \frac{z[M^{Z+}]^*}{CEP \times [AH]}$$

où  $[MAH(z)] = z[M^{Z+}]^*$  représente la concentration maximale en cation  $M^{Z+}$  qui peut être engagée dans la réaction de complexation. Le facteur LC varie en fonction du pH, de la force ionique et de la charge  $z$  du cation.

La concentration en sites d'AH libres peut être donc définie comme :

$$[AH(z)]_{libre} = LC[AH(z)]_{Total} - [MHA(z)]$$

Les déterminations de  $[MAH(z)]$  et de  $[M^{Z+}]_{libre}$  s'effectuent par une mesure et  $[AH(z)]_{Total}$  est connue. Il devient alors possible de déterminer  $\beta$  et LC.

Le modèle de neutralisation de charge est donc un modèle opérationnel efficace mais qui peut être critiqué sur plusieurs points (Tipping (2002)) :

- Il ne décrit pas l'hétérogénéité des SH car il est basé sur une même classe de ligand. Le modèle ne peut être appliqué qu'à une gamme limitée de concentration en métal. Les paramètres obtenus à ce jour à partir de données où le métal est fortement complexé ne peuvent être extrapolés à des cas où le métal est à l'état de trace, c'est-à-dire à des cas environnementaux.
- L'hypothèse selon laquelle un cation trivalent ne se complexerait que de manière tridentate est irréaliste. Il est difficile de s'imaginer que la dissociation des protons s'organiserait d'elle-même en de nombreux sites tridentates.
- Le développement du modèle ne suit pas la loi d'action de masse : l'effet du pH sur la complexation d'un métal par un ligand modifie la constante apparente d'équilibre mais pas la capacité maximum de complexation. Si la concentration en métal est élevée, la loi d'action de masse prédit que des protons pourront être déplacés de leurs sites de complexation. Ainsi  $\beta$  dépend du pH mais pas LC. Dans le cadre de ce modèle, les

auteurs proposent qu'un métal, ajouté à une solution de SH, ne puisse pas déplacer les protons de leurs sites de complexation. Le métal se complexe qu'aux sites déjà déprotonés. Le modèle n'est pas applicable lorsque deux cations sont en compétition pour un même type de site.

**Tableau 4.** Constantes de complexation avec les substances humiques d'après le modèle de neutralisation de charge (constantes globales apparentes) : SLRT (spectrofluorimétrie laser résolue dans le temps), UF (ultrafiltration), MDS (méthode de Schubert), AE (anion exchange).

| Type de SH       | I            | pH        | log K                            | [M] <sub>Total</sub> | Technique         | Référence                        |
|------------------|--------------|-----------|----------------------------------|----------------------|-------------------|----------------------------------|
| AH<br>(europium) | 0,1          | 6         | 6,2                              | 10 nM                | Compétition       | Kolokassidou & Pashalidis (2006) |
| AH<br>(uranium)  | 0,1          | 4         | 6,4 ;6,2 ;6,1                    | 0,1 –1 µM            | SLRT ;<br>MDS ;UF | Czerwinski <i>et al.</i> (1994)  |
| AH<br>(uranium)  | 0,1          | 1 -<br>10 | 14,7 UO <sub>2</sub> OH<br>HA(I) | 0,1 µM               | UF                | Zeh <i>et al.</i> (1997)         |
| AH<br>(uranium)  | 0,1<br>0,004 | 4-5       | 6,08                             | 10 nM - 5 µM         | AE                | Montavon <i>et al.</i> (2000)    |
| AH<br>(uranium)  | 0,1          | -         | 14,89<br>UO <sub>2</sub> OHAH(I) | -                    | SLRT              | Sachs <i>et al.</i> (2007)       |

Pour pouvoir représenter le fait que la complexation humique de ces cations soit plus importante que prévue lorsque le pH augmente, la formation de complexes mixtes hydroxo ou carbonato a aussi été proposée, tels que UO<sub>2</sub>OHAH(I) pour l'uranium (VI) (Zeh *et al.*, 1997). Il nous faut cependant noter que ces complexes sont assignés *a priori*, à partir de modifications des spectres de fluorescence, d'absorption ou de résultats expérimentaux d'ultrafiltration, et ne sont par conséquent pas formellement identifiés. Ces espèces représentent la complexation des SH avec les espèces de charges positives majoritaires en solution : à savoir, dans le cas des lanthanides et actinides +III, les espèces MOH<sup>2+</sup>, M(OH)<sub>2</sub><sup>+</sup>



et  $\text{MCO}_3^+$ , et dans le cas de l'uranium (VI), l'espèce  $\text{UO}_2\text{OH}^+$ . Différentes constantes sont présentées dans le **Tableau 4**.

### 3.2.3.3. Modèle polyélectrolyte

La difficulté des modèles fondés sur une description des SH à l'aide d'un type de sites à décrire des données expérimentales couvrant une grande gamme de pH a conduit à développer des modèles considérant différents types de sites. Choppin & Allard (1985) ont développé une approche considérant deux types de sites différents. La constante de complexation de M avec chacun de ces sites est fonction de leur degré d'ionisation. Ce modèle a été appliqué à l'étude des interactions actinides-SH dans le contexte du stockage des déchets nucléaires (Nash et al., 1980; Torres et al., 1984; Choppin et al., 1985).

Les auteurs considèrent que  $\beta$  est une fonction du degré d'ionisation  $\alpha$  des fonctions acides. Cette approche permet de rendre compte de la variation du pKa des SH en fonction du degré d'ionisation  $\alpha$  des sites acides.

$$\text{pK}_{\text{app}} = \text{pH} - \log\left(\frac{\alpha}{1-\alpha}\right)$$

La complexation des métaux par les SH est décrite par deux complexes. Ceux-ci sont représentés par deux constantes d'interactions et de leurs variations en fonction de  $\alpha$ .



$$\text{avec } \log \beta_1 = a_1\alpha + b_1$$



$$\text{avec } \log \beta_2 = a_2\alpha + b_2$$

Différentes constantes sont présentées dans le

**Tableau 5**.

Notons ici que les valeurs proposées par Choppin & Allard (1985) sont en fait issues de l'interprétation des données de Li *et al.* (1980), dont le contrôle de la chimie de l'uranium, et notamment de la solubilité de la schœpélite n'est pas optimum.

**Tableau 5.** Constantes de complexation avec les substances humiques d'après le modèle polyelectrolytique avec  $\alpha$  le degré d'ionisation

| Type de SH       | I   | pH | log K   | [M] <sub>Total</sub> | Technique                         | Référence                      |
|------------------|-----|----|---|----------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| AH<br>(uranium)  | 0,1 | -  | Log $\beta = 4,8 \alpha + 5$<br>Log $\beta = 4,55\alpha + 8,5$      | -                    | Radiotraçeurs<br>+ centrifugation | Choppin<br>& Allard<br>(1985)  |
| AH<br>(europium) | 0,1 | -  | Log $\beta = 8,86\alpha + 4,39$<br>Log $\beta = 3,55\alpha + 11,06$ | -                    | Radiotraçeurs<br>+ centrifugation | Torres &<br>Choppin.<br>(1984) |

#### 3.2.3.4. Compétition

La compétition entre cations peut fortement influencer leur spéciation, en particulier, lorsqu'ils sont complexés par des sites de faible affinité (essentiellement des groupements de types carboxyliques ou phénoliques) (Pinheiro *et al.*, 1999; Pinheiro *et al.*, 2000). Or l'influence des cations sur la spéciation des RN qui nous intéresse (europium, uranium et cobalt) n'a été que faiblement étudiée.

Kerndorff & Schnitzer (1980), ont montré des phénomènes de compétition entre les groupes de métaux Fe-Cr, Al-Pb-Cu et Cd-Ni-Zn-Co-Mn. De plus, l'effet de Mg sur différents radionucléides a également été mis en évidence à l'aide de la dialyse : son influence est la plus grande sur la spéciation de Co (Chang *et al.*, 2006).

Maes *et al.* (1988) n'observent pas de compétition entre Eu et le Pb pour un rapport de concentration  $[Pb]/[Eu] = 10^3$ . Ca et Mg, ont quant à eux, un effet sur les constantes de complexation de Eu avec un AH dans des concentrations proches des eaux de surface tandis que dans des conditions proches d'eau de mer, ces cations n'ont plus d'influence car Eu est sous forme de complexe avec les carbonates (Takahashi *et al.*, 2004). Par une étude de compétition entre Eu et Cu, Kolokassidou & Pashalidis (2006) ont obtenu les constantes de complexation de Eu avec un AH.

Ces auteurs ont donc mis en évidence des effets de compétition entre cations mais aucun n'a obtenu d'informations sur les mécanismes de cette compétition. Or pour prédire l'influence d'autres cations, il est essentiel de comprendre dans quel cas un cation a une influence sur la spéciation des RN. Il serait dès lors particulièrement intéressant d'obtenir des données de compétition en suivant deux cations, en même temps, afin de proposer un mécanisme de compétition.

### 3.2.3.5. Conclusion

La complexité des propriétés de complexation des SH a amené des auteurs à développer une description opérationnelle à partir d'hypothèses peu satisfaisantes. Les paramètres obtenus sont dépendants des conditions expérimentales couvrant de faible gamme de pH et de concentration totale en métal. De plus, ces paramètres étant fondés sur des approches différentes des interactions avec les SH, elles sont difficilement comparables (Choppin et al., 1997; Marquardt et al., 1998). Dans plusieurs études (Bidoglio et al., 1991; Norden et al., 1993), les auteurs n'observent pas de dépendance entre la constante de complexation et le pH. Enfin, afin de décrire correctement les données expérimentales à des pH élevés, des auteurs (Laszak, 1997; Zeh *et al.*, 1997) ont du supposer la formation de complexes mixtes uranium-hydroxo-SH alors que la formation de ces complexes n'est pas vérifiée expérimentalement.

Pour être capable de prédire le comportement d'un métal dans des conditions environnementales, un modèle doit être capable de décrire correctement l'hétérogénéité des SH, la compétition entre cations et les effets électrostatiques.

Deux types de modèles ont été développés afin de tenir compte de l'ensemble de ces effets :

- Le « model VI » développé par Tipping (1998) fondé sur une description discrète de la distribution des sites des SH avec des paramètres incluant l'effet d'hétérogénéité ;
- Le modèle NICA-Donnan (Kinniburgh *et al.*, 1999), fondé sur une description continue de la distribution des sites des SH.

Si l'approche de ces deux modèles tient désormais compte de l'hétérogénéité des SH, de la compétition et des effets électrostatiques, elle ne simplifie pour autant pas la complexité du système qu'il cherche à décrire et garde un nombre de paramètres ajustables restreint.

Le modèle NICA–Donnan a été largement utilisé pour prédire la spéciation de métaux dans l’environnement (Benedetti et al., 1996; Weng et al., 2002; Cances et al., 2003; Weng et al., 2003). Etudier les RN à partir de cette approche permettrait d’obtenir des constantes de complexation pour l’ensemble des métaux, parmi lesquels, les cations majeurs dans l’environnement. L’approche du modèle NICA-Donnan permet de connaître l’influence de la MON pour tous les cations et donc de prédire les effets de compétition et les effets électrostatiques. La concentration en métal libre en solution est une donnée essentielle à la calibration de ces modèles. Or celle-ci n’a été effectuée que récemment par Milne *et al.* (2003) à partir de données expérimentales pour les cations d’intérêt (Higgo et al., 1993; Czerwinski et al., 1994; Glaus et al., 1997; Lead et al., 1998; Saito et al., 2004).

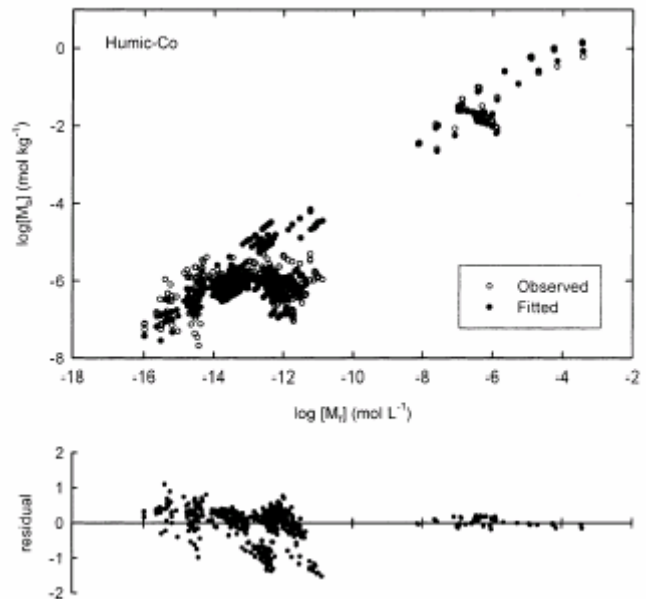
Les techniques utilisées (dialyse, ultrafiltration, méthode de Schubert) pour obtenir les données ne sont pas toujours adaptées pour l’étude des SH. En effet les techniques de dialyse et d’ultrafiltration sont fondées sur une séparation du métal libre ( $M_{\text{libre}}$ ) et du métal complexé ( $M_{\text{complexé}}$ ). Or, il est connu que les SH peuvent diffuser pour partie à travers une membrane, et ce, même à un faible seuil de coupure (Buffle, 1988; Chang *et al.*, 2006). Dans certaines études, les auteurs pré-dialysent avant l’expérience les SH afin de s’affranchir de ce problème (Westall *et al.*, 1995; Lead *et al.*, 1998). Mais les SH pré-dialysés sont difficiles à caractériser et il est difficile de connaître l’influence de ce procédé sur leur pouvoir de complexation.

Les données obtenues à partir de la méthode de Schubert ne sont pas dépendantes du pH (Norden *et al.*, 1993) et l’erreur expérimentale est généralement trop élevée (Higgo *et al.*, 1993) pour que des paramètres fiables de complexation puissent être obtenus.

La SLRT est quant à elle très utilisée pour obtenir des informations lorsque le cation n’est ni hydrolysé ni sous forme de complexe avec les carbonates comme dans le cas de l’euprium. Mais dans le cas de cations plus fortement hydrolysables et de chimie plus complexe comme  $UO_2^{2+}$ , il est difficile d’identifier les différentes espèces de façon univoque. Il est également connu que les SH éteignent le signal de fluorescence de  $UO_2^{2+}$  (Czerwinski *et al.*, 1994; Laszak, 1997), nécessitant ainsi l’utilisation de lasers à très courte durée d’impulsion (Sachs *et al.*, 2007).

La **Figure 4** présente l’ensemble des données expérimentales utilisées pour obtenir les paramètres NICA-Donnan pour le cobalt. Mais l’ajustement du modèle à partir de ces données expérimentales ayant conduit à l’estimation de paramètres peu réalistes (constante d’affinité très élevée et largeur de distribution très faible), il a donc été nécessaire de fixer

certaines d'entre eux. Cela est principalement dû à la disparité des données expérimentales, à la fois non seulement vis-à-vis du pH et de la force ionique mais aussi par rapport à l'incertitude sur la concentration en métal libre déterminée. Il est donc nécessaire d'acquérir des données expérimentales couvrant une large gamme de pH et de concentration à l'aide de techniques adaptées à l'étude des interactions RN-SH et, surtout, donnant accès à la concentration en métal libre en solution.



**Figure 4.**  $\log [Co]_{\text{free}}$  (mol/l) versus  $\log [Co]_{\text{complexé}}$  (mol/kg SH) observé et ajusté par le modèle NICA-Donnan (Milne *et al.*, 2003) ainsi que les résidus entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées.

## 4. Objectifs et Démarche

### 4.1. Objectifs

L'objectif général est d'améliorer la compréhension de l'influence des SH sur la spéciation des radionucléides.

- Le premier objectif est de développer **une technique de spéciation** adaptée à l'étude des interactions radionucléides – substances humiques (mesure de la concentration en ion libre).

- Le deuxième objectif est **l'acquisition de données expérimentales** pour différents radionucléides (uranium, cobalt, europium) pour une grande gamme de concentration et de pH ainsi que la **calibration du modèle NICA-Donnan**.
- Le troisième objectif est d'étudier la **compétition** entre radionucléides et d'autres cations afin de comprendre les différents mécanismes de compétition entre cations et valider ainsi l'approche théorique du modèle NICA-Donnan.
- Le quatrième objectif est de comparer **la prédiction du modèle NICA-Donnan** calibrée à la spéciation mesurée dans des études de laboratoire ou sur le terrain.

## 4.2. Le modèle NICA-Donnan

### 4.2.1. Description du modèle

Le modèle NICA-Donnan a été développé afin de décrire les interactions MON-métal. Il combine un modèle d'adsorption compétitive non idéale NICA (Non Ideal Competitive Adsorption) par des distributions continues de sites, avec un modèle Donnan pour rendre compte des interactions électrostatiques. Le modèle tient compte de l'hétérogénéité des MON, des effets électrostatiques et de la compétition entre métaux (Kinniburgh *et al.*, 1999).

Pour décrire l'adsorption locale (L) de l'espèce  $i$ , Koopal *et al* (1994) ont proposé l'utilisation de l'équation de Hill, une version étendue de l'équation de Langmuir permettant de tenir compte de la stœchiométrie spécifique de chaque ion (appelée coopérativité).

$$\theta_{i,L} = \frac{(K_i c_i)^{n_i}}{1 + (K_i c_i)^{n_i}}$$

avec  $\theta_{i,L}$  la proportion de sites occupés par l'espèce  $i$ ,  $K_i$  l'affinité de l'espèce  $i$  pour les sites L,  $c_i$  la concentration ou l'activité de l'espèce  $i$  en solution, et  $n_i$  le paramètre de non idéalité de l'espèce  $i$ .

Le paramètre de non idéalité  $n_i$  est spécifique à chaque ion et est lié aux effets stœchiométriques ( $n = 1$  dans le cas idéal, inférieur sinon).

Koopal *et al* (1994) ont ensuite étendu ce modèle pour tenir compte de plus de l'adsorption compétitive des différentes espèces  $i$  pour un groupe de sites et de l'hétérogénéité intrinsèque de chaque adsorbant.

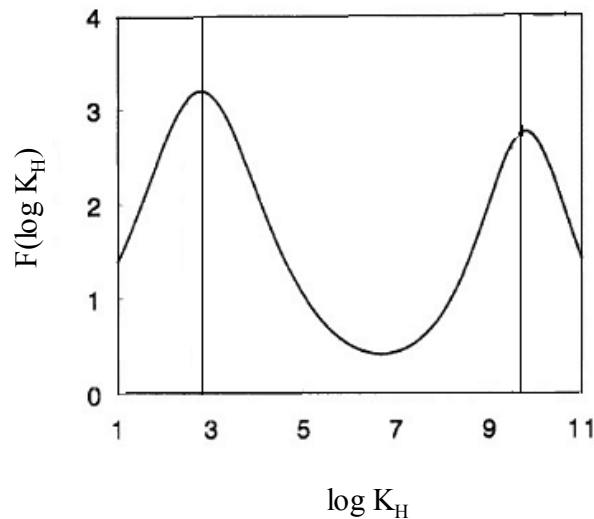
$$\theta_{i,L} = \frac{(\tilde{K}_i c_i)^{n_i}}{\sum_i (\tilde{K}_i c_i)^{n_i}} \times \frac{\left[ \sum_i (\tilde{K}_i c_i)^{n_i} \right]^p}{1 + \left[ \sum_i (\tilde{K}_i c_i)^{n_i} \right]^p}$$

Le seul paramètre ajouté par rapport à l'équation précédente est le paramètre  $p$  représentant la largeur de la distribution pour décrire le site complexant, les  $\tilde{K}_i$  remplaçant les constantes d'affinité correspondant à la position de cette distribution.

La quantité d'ions  $Q_i$  adsorbé sur la MON est décrite par :

$$Q_i = \frac{n_{i,1}}{n_{H,1}} Q_{\max,1} \frac{(\tilde{K}_{i,1} c_i)^{n_{i,1}}}{\sum_i (\tilde{K}_{i,1} c_i)^{n_{i,1}}} \times \frac{\left[ \sum_i (\tilde{K}_{i,1} c_i)^{n_{i,1}} \right]^{p_1}}{1 + \left[ \sum_i (\tilde{K}_{i,1} c_i)^{n_{i,1}} \right]^{p_1}} + \frac{n_{i,2}}{n_{H,2}} Q_{\max,2} \frac{(\tilde{K}_{i,2} c_i)^{n_{i,2}}}{\sum_i (\tilde{K}_{i,2} c_i)^{n_{i,2}}} \times \frac{\left[ \sum_i (\tilde{K}_{i,2} c_i)^{n_{i,2}} \right]^{p_2}}{1 + \left[ \sum_i (\tilde{K}_{i,2} c_i)^{n_{i,2}} \right]^{p_2}}$$

Où  $Q_{\max,i}$  représente la densité de sites ou capacité maximale d'adsorption d'un site de la MON.

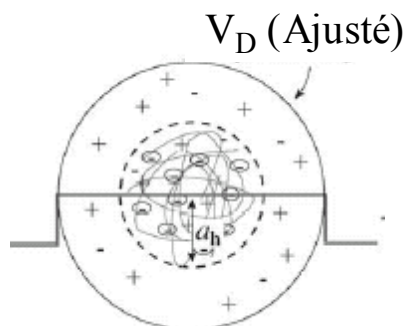


**Figure 5** : Représentation théorique selon Nederlof et al. (1993) de la répartition des constantes d'acidité d'un acide humique

De manière générale, cette modélisation considère deux types de sites réactionnels dits de haute et de basse affinité pour les protons. Ces deux types de sites correspondent à des groupes dits de type « carboxylique » ( $Q_{\max,1}$ ) et de type « phénolique » ( $Q_{\max,2}$ ) selon la

valeur des  $\log \tilde{K}_H$  (**Figure 5**). Ces distributions sont suffisamment larges pour inclure également tout type de groupement complexant susceptible d'exister au sein de la MON, notamment les groupes aminés (Croué *et al.*, 2003).

Les effets électrostatiques sont pris en compte à l'aide d'un modèle Donnan (Benedetti *et al.*, 1996; Saito *et al.*, 2005). La macromolécule organique est assimilée à un gel de volume  $V_D$ , variable en fonction de la force ionique de la solution (**Figure 6**). La charge est distribuée de manière homogène dans la particule. L'eau et les contre-ions peuvent entrer à l'intérieur de la structure tridimensionnelle de la MON qui se comporte donc comme un gel polyélectrolytique.



**Figure 6.** Structure schématique du modèle de Donnan. La ligne noire représente le profil de potentiel électrique (Saito *et al.*, 2005).

Ce modèle considère que toute la charge de la particule est neutralisée par les contre-ions à l'intérieur du volume de Donnan.

$$\frac{Q_{tot}}{V_D} = \sum z_i (c_i - c_{Di})$$

Où  $Q_{tot}$  est la charge totale de la MON,  $c_i$  la concentration de l'espèce  $i$  dans la solution,  $c_{D,i}$  la concentration de l'espèce  $i$  dans le gel de Donnan, et  $z_i$  sa charge.

Le modèle de Donnan décrit les interactions électrostatiques à partir d'une relation empirique entre le volume de Donnan et la force ionique. Cette relation permet de décrire l'effet de la force ionique sur la charge et l'encombrement stérique des molécules.

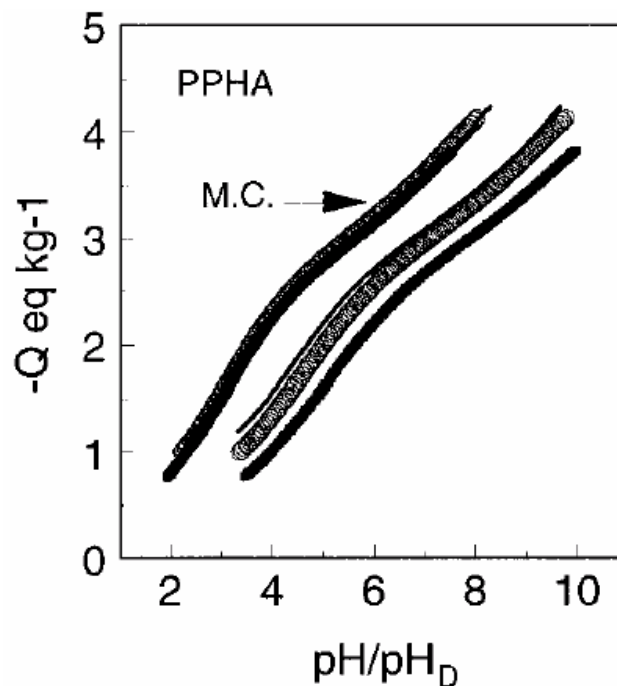
$$\log V_D = b(1 - \log I) - 1$$



avec  $I$  la force ionique,  $b$  un paramètre propre au ligand, variant entre  $-0,3$  à  $-0,5$  pour les AH et entre  $-0,7$  et  $-0,9$  pour les AF.

La première étape de la détermination des différents paramètres de ces équations consiste à obtenir de façon expérimentale la variation de la charge  $Q$  de la MON en fonction du pH et de la force ionique. Ces données sont obtenues à partir des titrages potentiométriques. Le paramètre  $b$  est obtenu quant à lui en corrigeant les courbes de la variation de  $Q$  en fonction du pH des effets électrostatiques par le modèle Donnan (**Figure 7**). Les courbes de titrages obtenues pour différentes force ionique se confondent en une « master curve » libérée de ces effet électrostatique.

Enfin, les paramètres propres à la MON sont obtenus en ajustant l'équation de NICA à ces données expérimentales.



**Figure 7.** “Master Curve” obtenue à l’aide du modèle Donnan (symboles ouverts) en corrigeant les données expérimentales ( $I = 0,01$ ;  $I = 0,1$  et  $I = 0,33$ ) des effets électrostatiques (MC) en fonction du pH (Benedetti et al., 1996).

La deuxième étape consiste à obtenir les paramètres spécifiques à chaque métal étudié. Le modèle est ajusté à partir d’isothermes de complexation obtenues à partir d’une grande gamme de concentration totale en métal et pH. La concentration en  $[M]_{\text{libre}}$  est une donnée d’entrée du modèle, il est donc essentiel d’utiliser une technique de spéciation qui donne accès à cette donnée.

Récemment *Milne et al.* ont proposé des paramètres génériques pour les protons (*Milne et al.*, 2001) et les métaux (*Milne et al.*, 2003) en considérant deux analogues de la MON : les AH et les AF. Ces paramètres génériques sont très utiles pour prédire l'influence de la MON sur la spéciation des métaux, mais la base de données qui leur est associée est encore incomplète, en particulier pour les radionucléides.

#### **4.2.2. Mise en œuvre de la modélisation**

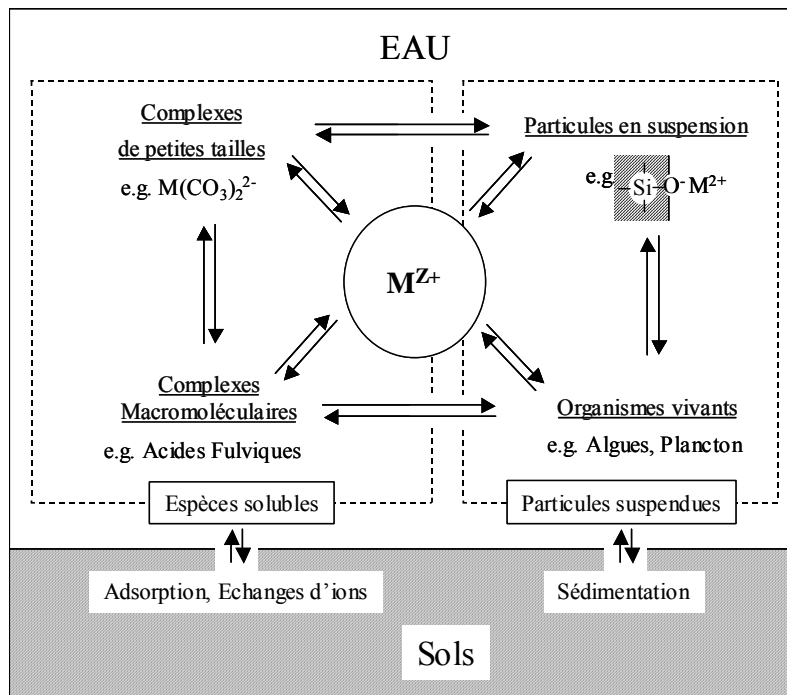
Le logiciel ECOSAT version 4.7 (Equilibrium Calculation Of Speciation And Transport) a été développé dans le département de qualité des sols de l'Université de Wageningen aux Pays-Bas (*Keizer et al.*, 1994). Il permet de calculer la spéciation d'un élément, c'est-à-dire la distribution d'un élément entre les différentes phases (solide, solution...) et espèces chimiques (ion libre, complexes organiques et inorganiques). La complexation des métaux par la MON est également prise en compte dans ce logiciel par l'intermédiaire du modèle NICA-Donnan.

### **4.3. Les techniques de spéciation**

#### **4.3.1. Définition du terme de spéciation**

Il est actuellement reconnu que les différentes formes chimiques d'un élément peuvent jouer des rôles distincts dans l'environnement et que leur comportement peut être prédit en les distinguant expérimentalement (*Buffle*, 1988). Par exemple la **Figure 8** présente les différentes formes sous lesquelles un ion métallique (M) peut être trouvé dans un système aquatique : libre, complexé avec des simples molécules organiques ou inorganiques, complexé avec des macromolécules ou des ligands colloïdaux, absorbé ou incorporé à des particules organiques en suspension ou assimilé par des organismes vivants.

La répartition quantifiée de M entre l'ensemble de ces différentes formes physico-chimiques définit sa spéciation (*Templeton et al.*, 2000). La spéciation conditionne le devenir et le transfert de M dans le milieu, ainsi que sa biodisponibilité et sa toxicité dans l'environnement.



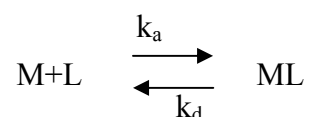
**Figure 8 .** Répartition schématique des phénomènes influant la spéciation des métaux dans les milieux naturels (Buffle, 1988).

#### 4.3.2. Notion de spéciation dynamique

Une interprétation correcte du devenir et de l'impact environnemental de M doit considérer l'importance des flux des éléments et de leur échange entre les différents compartiments naturels (Buffle, 1988). La diffusion est un facteur clef pour la compréhension du devenir de M et son étude nécessite la prise en compte du concept de labilité.

La labilité décrit la capacité d'un complexe à maintenir l'équilibre avec le métal libre M dans un contexte où M est consommé par un processus au niveau d'une interface (van Leeuwen *et al.*, 2005).

En considérant le cas simple d'un ion métallique M formant un complexe avec un ligand L

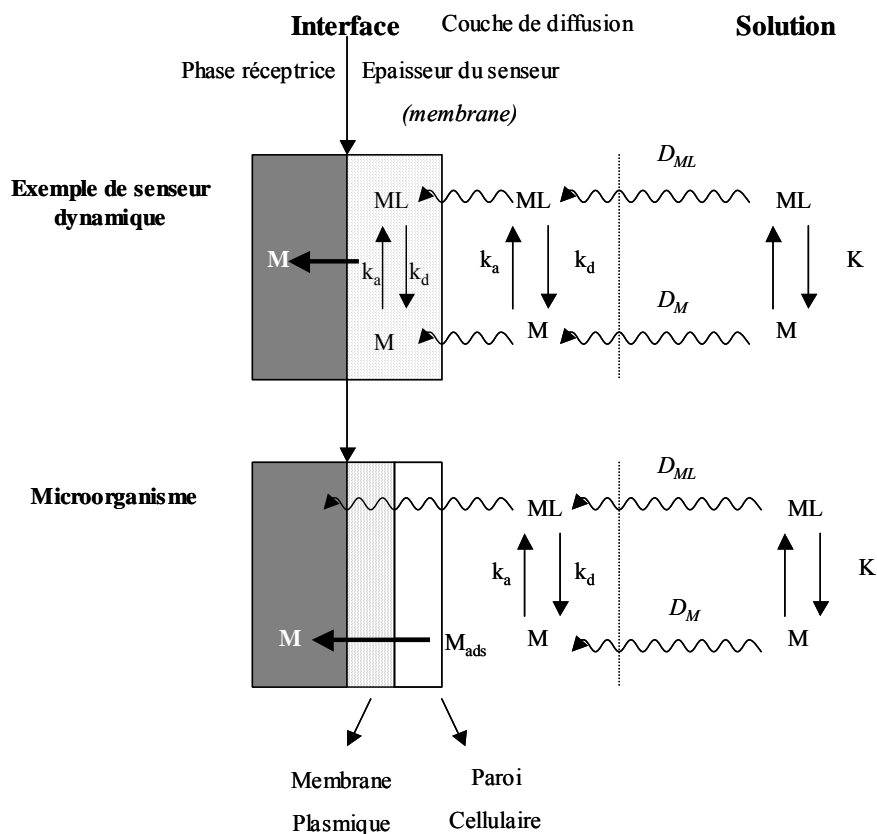


où  $k_a$  et  $k_d$  sont les constantes cinétiques d'association et de dissociation, la constante thermodynamique d'équilibre K est égale à  $K = \frac{k_a}{k_d}$ . Dans des conditions d'excès de ligand (C la concentration de ligand), la réaction d'association est quasi mono - moléculaire avec une constante  $k_a = k_a C$ .

La **Figure 9** représente les processus chimiques et dynamiques se déroulant au niveau d'un senseur dynamique et d'un microorganisme. D'une manière générale, un senseur dynamique et un microorganisme sont composés d'une interface (membrane, gel ou paroi cellulaire) en contact avec une solution où M et ML sont à l'équilibre. Au niveau de l'interface, il y a une consommation de M.

*Temps d'équilibre en solution :*

Considérons dans un premier temps les processus au niveau de la solution. Pour un temps  $t$ , le système est dit dynamique si  $t$  est supérieur au temps de vie caractéristique de M  $\tau_a = 1/k'_a$  (i.e.  $k'_a \gg 1$ ) et de ML  $\tau_d = 1/k_d$  (i.e.  $k_d \gg 1$ ). L'ion M s'échange fréquemment entre M et ML. Dans le cas opposé où le système est inerte, les temps de vie de M et de ML sont supérieurs au temps  $t$  considéré et  $k'_a \cdot t, k'_d \cdot t \ll 1$ . L'échange entre M et ML est donc lent.



**Figure 9.** Représentation schématique des processus chimiques et dynamiques au niveau d'un senseur dynamique et d'un microorganisme avec  $k_a$  la constante d'association,  $k_d$  la constante de dissociation,  $D_M$  le coefficient de diffusion du métal,  $D_{ML}$  le coefficient de diffusion du complexe ML.

*Concept de labilité à une interface :*

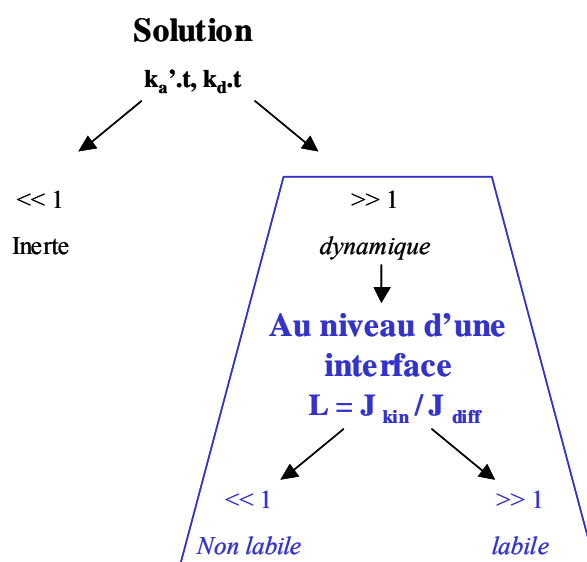
Considérons une interface en contact avec une solution homogène contenant M et ML, par laquelle il y a une consommation de M. Dans ce contexte, le cas d'un complexe inerte représente le cas le plus simple : ML se dissocie si lentement qu'il ne peut contribuer de manière significative au flux de M à travers l'interface. Le signal analytique mesuré ne correspond qu'à M. Un complexe est labile s'il y a un échange fréquent entre ML et M pendant le transport jusqu'à l'interface. Dans ce cas, le signal analytique mesuré correspond à M ainsi qu'à une fraction de ML. La labilité est exprimée par le rapport des flux :

$$L = J_{\text{kin}} / J_{\text{diff}}$$

où  $J_{\text{diff}}$  est le flux limité par la diffusion de M et de ML, et  $J_{\text{kin}}$  est le flux cinétique limité par la dissociation de ML en M.

Le système est labile lorsque  $J_{\text{kin}} \gg J_{\text{diff}}$ . Il est non labile lorsque  $J_{\text{kin}} \ll J_{\text{diff}}$ . Le ratio  $J_{\text{kin}}/J_{\text{diff}}$  définit le paramètre de labilité L. Il existe plusieurs expressions du paramètre de labilité selon le système et l'hétérogénéité du ligand étudiés (Pinheiro et al., 1999; van Leeuwen et al., 2005).

La **Figure 10** schématise le concept de labilité en solution ainsi qu'au niveau d'une interface.



**Figure 10.** Représentation schématique définissant les caractéristiques d'un complexe ML en solution ou au niveau d'une interface avec  $t$  le temps de l'expérience,  $k_a$  la constante d'association  $k_a$  multiplié par la concentration en ligand,  $k_d$  la constante de dissociation,  $J_{\text{kin}}$  et  $J_{\text{diff}}$  la contribution au flux et L le paramètre de labilité.

Un système est donc labile lorsqu'il est caractérisé par un flux contrôlé par la diffusion de M dont le coefficient de diffusion effectif est une moyenne des coefficients de diffusion des nombreuses espèces de M ainsi que de leurs différentes mobilités.

#### 4.3.3. Présentation des techniques de spéciation

L'étude de la spéciation de M nécessite la mesure de la concentration du métal libre et du métal complexé par un ligand pour des conditions expérimentales différentes (pH, force ionique, concentration totale en ligand et en métal). Les techniques de spéciation les plus couramment utilisées (ultrafiltration, dialyse, méthode de Schubert...) peuvent détecter les espèces à partir de leurs propriétés physico-chimiques : taille, mobilité, stabilité. De plus il existe de nombreuses techniques de spéciation permettant à la fois d'avoir des informations sur la spéciation mais également sur la nature du complexe (Spectrofluorimétrie Laser Résolue dans le Temps, Spectrométrie de masse couplée à une ionisation électrospray...). L'ensemble des techniques de spéciation a été présenté et discuté par Buffle (1988) et Tipping (2002). Ce paragraphe a comme objectif de présenter uniquement le développement des techniques de spéciation dites « dynamiques ».

En effet, récemment de nouvelles techniques de spéciation ont été développées afin de diminuer la limite de détection, d'être adaptées à des mesures *in situ*, de ne mesurer que la concentration en métal libre et enfin afin d'obtenir des informations sur la labilité des complexes étudiés. Van Leeuwen *et al.* (2005) ont proposé une revue de l'ensemble de ces nouvelles techniques de spéciation. Certaines ont un signal fondé sur un processus dynamique et d'autres sur des caractéristiques d'un équilibre (**Tableau 6**). Les techniques de spéciation dynamique sont fondées sur la détection soit du flux du métal, soit de l'accumulation du métal pendant un certain temps, soit les deux.

La plupart de ces techniques impliquent une séparation physique entre le métal libre et le métal complexé :

- La DGT (Diffusive gradients in thin film) (Zhang et al., 1999) est une méthode de spéciation *in situ* qui peut être utilisée dans les eaux mais également dans les sols et les sédiments. Cette méthode permet d'évaluer la quantité de métal libre/labile en solution en les immobilisant dans une résine échangeuse d'ions après diffusion à travers un gel. Le transport du métal à l'intérieur du gel se fait par diffusion et le choix

de l'épaisseur de ce gel détermine la vitesse de transport quelque soit l'hydrodynamique de la solution externe. La détermination de la concentration en métal est basée sur la première loi de Fick.

- La PLM (Permeation liquid membrane) (Parthasarathy *et al.*, 2003) est basée sur une séparation liquide-liquide. Un solvant organique contenant un ligand sélectif au métal étudié est placé dans une membrane poreuse hydrophobe. Cette membrane sépare deux phases aqueuses. La première contient la solution à étudier et la deuxième la solution receveuse. Un flux du métal apparaît lorsque la force de complexation augmente entre la solution à étudier, la membrane et enfin la solution receveuse. Le flux du métal peut être contrôlé soit par la diffusion en solution, alors le métal libre ainsi que le métal complexe sont mesurés, soit par la diffusion dans la membrane, dans ce cas seul le métal libre est mesuré.
- La GIME (Gel-Integrated Microelectrode) (Buffle *et al.*, 2000) est un senseur composé de microélectrodes ou un ensemble de macroélectrodes séparées de la solution à étudier par un hydrogel d'agarose. Lorsque la GIME est en équilibre avec la solution, la réduction du métal est observée à l'intérieur du gel. L'intérêt du gel dans la GIME par rapport à une technique de voltamétrie classique est d'exclure les colloïdes dont le rayon est supérieur à 30 nm interférant lors de la mesure par les électrodes. De plus, il permet d'obtenir des conditions de pure diffusion moléculaire qui rend l'interprétation physico-chimique du flux du métal plus rigoureuse.
- La DMT (Donnan membrane technique) (Temminghoff *et al.*, 2000). Elle est fondée sur le principe de l'effet Donnan : une membrane chargée négativement est utilisée afin de séparer par leurs charges les cations et les complexes de charge négative.

Le **Tableau 6** résume les bases physico-chimiques, la caractéristique de la couche de diffusion ainsi que les espèces mesurées des différentes techniques de spéciation.

**Tableau 6.** Présentation des techniques de spéciation: GIME (Gel integrated microelectrode), DGT (Diffusive gradients in thin film), PLM (Permeation liquid membrane), ISE ( Ion selective electrode), DET (Diffusive equilibration in thin films), DMT (Donnan membrane technique).

| Méthode                                       | Bases physico-chimiques                        | Caractéristique de la couche de diffusion   | Espèces mesurées               |
|---|--|---|--------------------------------|
| <b>Techniques de spéciation dynamique</b>     |  |   |                                |
| Voltamétries                                  | Diffusion dans le milieu                       | Macroélectrode (rayon)  | M libre + complexes dynamiques |
|   |  | Microélectrode (rayon)  |                                |
| GIME  | Diffusion dans un gel                          | Microélectrode (rayon)  | M libre + complexes dynamiques |
| DGT   | Diffusion dans un gel                          | Couche de diffusion du gel  | M libre + complexes dynamiques |
| PLM   | Diffusion dans l'échantillon et la membrane    | Couche de diffusion de la solution (diffusion contrôlée par la diffusion en solution) | M libre + complexes dynamiques |
|   |  | Epaisseur de la membrane (diffusion contrôlée par la diffusion en solution)           | M libre                        |
| <b>Techniques de spéciation à l'équilibre</b> |  |   |                                |
| ISE   | Equilibre du potentiel de la membrane          | -   | M libre                        |
| PLM   | Equilibre source / solution « accepteur »      | -   | M libre                        |
| DMT   | Equilibre échantillon / solution « accepteur » | -   | M libre                        |



Les techniques de spéciation présentées ci-dessus ont été utilisées pour mesurer la spéciation du cuivre, du zinc, du cadmium, du plomb et du nickel dans différentes eaux de surface (Sigg *et al.*, 2006). Les concentrations en Cu, Cd et Pb mesurées diminuent dans l'ordre suivant : DGT > GIME > PLM en flux > PLM à l'équilibre  $\cong$  DMT alors que pour le zinc DGT > GIME et pour le nickel DGT > DMT. Chaque technique a son propre critère de labilité, défini à partir de son échelle de temps de diffusion, qui détermine la fraction de métal sous la forme de complexes dynamiques qui sera mesurée. L'échelle de temps étant inférieure pour la GIME, la fraction de métal total mesurée est inférieure à la DGT. La PLM et la DMT donnent des résultats similaires qui correspondent à la concentration en métal libre. Les techniques qui permettent de pré-concentrer le métal en l'accumulant soit dans l'électrode soit dans un milieu accepteur comme la DGT ou la PLM, ont un avantage clair pour mesurer de très faibles concentrations en métal. Par contre, seules la DMT et la DGT sont multi-élémentaires, c'est-à-dire qu'elles permettent de mesurer la concentration en métal libre pour tous les cations alors que les techniques présentées ci-dessus sont utilisables que pour un nombre limité de métaux : la PLM ne peut être à ce jour que utilisée pour mesurer la spéciation du cadmium et du plomb. Il serait donc très intéressant dans le cadre de cette étude de développer une approche dynamique de la DMT afin de développer une technique adaptée à l'étude des RN, de diminuer le temps de mesure ainsi que la limite de détection.

#### **4.3.4. Analogie entre les techniques de spéciation dynamique et les organismes biologiques**

La biodisponibilité est la fraction de la concentration en métal qui peut être assimilée par un organisme (Morel, 1983). La description des phénomènes se déroulant au niveau de l'interface biologique doit tenir compte de la notion de spéciation dynamique définie plus haut. Le concept de biodisponibilité nécessite l'étude de deux cas limites : les complexes inertes et labiles :

- Cas d'un complexe inerte : si le taux d'échange entre M et L est petit par rapport au temps de l'expérience, alors le complexe ne contribue pas de manière significative au flux de M dans l'organisme. Buffle (1988) a rapporté l'étude de l'effet sur la croissance d'une bactérie d'une même concentration en cuivre dans des eaux contenant différentes concentrations de matière organique naturelle. La concentration totale en cuivre dans les eaux est la même ; pourtant leur effet est différent. En effet, plus la concentration en matière organique naturelle est haute, moins la toxicité du

cuiivre est importante. En présentant les courbes de croissance en fonction du cuiivre libre, les courbes se superposent. Dans le cas d'un complexe inerte, seul Cu libre est biodisponible.

- Cas d'un complexe labile : lorsque le taux d'association et de dissociation est très rapide, l'équilibre entre ML et M est respecté quel que soit le point du temps et de l'espace. Le complexe ML est biodisponible ou bioinactif selon que le flux provenant de la diffusion de ML est plus important que le flux provenant de la dissociation de ML. Ces caractéristiques sont dépendantes des processus de l'interface donc de l'organisme étudié (Morel, 1983).

Par ailleurs, deux situations extrêmes doivent également être prises en compte :

- La demande de M par l'organisme est beaucoup moins importante que le flux limité par la diffusion de M, l'organisme n'a donc pas besoin d'une contribution supplémentaire du complexe ML.
- La demande de M est très importante et une contribution totale de ML est demandée afin de satisfaire entièrement l'organisme.

Chaque organisme a donc une influence très importante sur la biodisponibilité de M ainsi que sur la contribution des complexes labiles de M. Le concept de labilité discuté ci-dessus doit donc impérativement être pris en compte lors de l'étude de la biodisponibilité d'un métal.

Les techniques de spéciation dynamique peuvent également prédire la biodisponibilité. En effet une analogie peut être faite entre la membrane des organismes et les interfaces des différentes techniques de spéciation :

- surface de l'électrode pour la GIME ;
- surface de la résine pour la DGT ;
- interface membrane/solution pour la PLM et la DMT.

La bioaccumulation dépend du flux des espèces dynamiques et peut être décrite à partir des mêmes équations que celles utilisées pour décrire le flux de M dans les techniques de spéciation dynamique.

Les microorganismes ont néanmoins leur propre échelle de temps de diffusion définie par leur géométrie. Bayen *et al.* (2006) ont comparé le flux du cadmium dans une mesure de PLM avec le flux d'internalisation d'une algue. Il a ainsi été mis en évidence que la PLM est un outil efficace pour prédire la biodisponibilité. Cette étude est confirmée par celle de Slaveykova *et al.* (2004) qui montre que le flux de plomb dans la solution accepteur de la PLM, en présence de différents ligands synthétiques, peut être mis en relation avec le flux d'internalisation par une algue. Cependant, en présence de matière organique naturelle, le flux d'internalisation observé est beaucoup plus important que celui prédit par la PLM. En revanche, la comparaison du flux d'uranium internalisé par des plantes avec des mesures de DGT n'ont pas permis d'établir une corrélation entre les deux (Vandenhove *et al.*, 2007).

La reproduction des mécanismes mise en jeu dans l'internalisation d'un métal par des organismes n'est pas aisée. Le développement d'une technique de spéciation permettant de prédire la biodisponibilité d'un métal par tous les organismes apparaît difficile à mettre en place. La meilleure option serait de mesurer les flux de M à l'aide de différentes techniques de spéciation dynamique et de comprendre de quelle manière ils peuvent être mis en relation avec différents types d'organismes (bactérie, algues, plantes...). La DMT étant multi-élémentaire, le développement d'une approche dynamique permettrait de mesurer la biodisponibilité des RN en présence de SH.

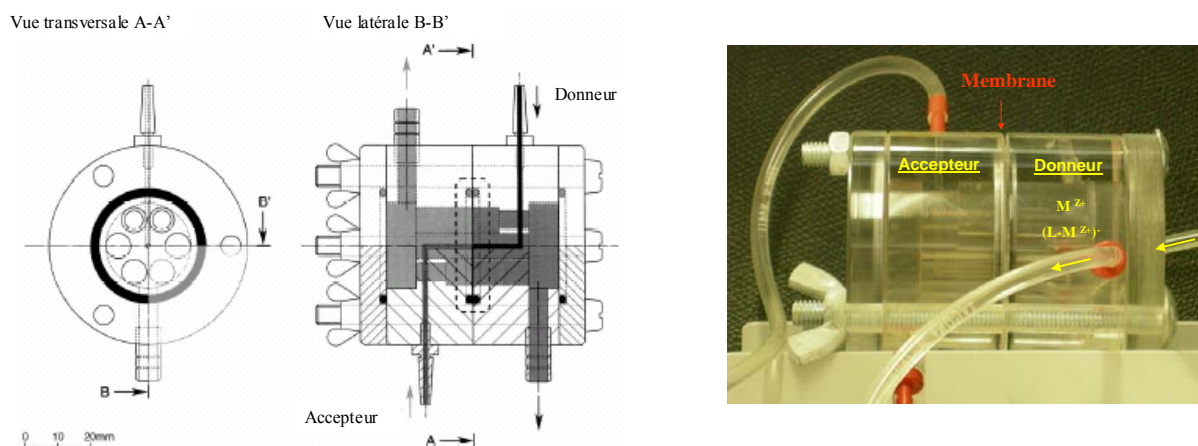
#### **4.3.5. La Donnan Membrane Technique**

La Donnan Membrane Technique (DMT) permet de mesurer la concentration en métal libre en solution. Elle est fondée sur le principe de l'effet Donnan : une membrane chargée négativement est utilisée afin de séparer par leurs charges les cations et les complexes de charge négative. La DMT a l'avantage de permettre la mesure de la concentration en métal libre de tous cations à partir d'une procédure simple. De plus, les interférences dues aux autres espèces en solution sont faibles comparées aux autres techniques de spéciation.

#### 4.3.5.1. Approche à l'équilibre de la DMT

##### Principe général :

Dans une analyse par DMT (**Figure 11**), la solution de l'échantillon (appelée donneur) est séparée d'un compartiment accepteur par une membrane échangeuse de cations (BDH, UK). Le compartiment accepteur contient une solution dont la force ionique est égale à celle de la solution du compartiment donneur. La membrane possède une matrice de divinylbenzène et de polystyrène avec des groupements acides sulfoniques déprotonés lorsque la valeur du pH est supérieure à 2. La charge négative de la membrane permet le passage des cations libres avec un flux beaucoup plus important que les anions.



**Figure 11.** Vue schématique et photo de la cellule de la DMT

Si la force ionique est la même dans la solution des deux compartiments, alors, à l'équilibre, la concentration en métal libre sera la même des deux cotés de la membrane. L'équilibre est appelé « *équilibre de Donnan* ». Le temps pour atteindre cet équilibre est d'environ 2-3 jours pour un cation divalent. Lorsqu'il est atteint, la concentration en métal libre de l'échantillon peut être calculée à partir du principe de l'équilibre de Donnan (Donnan, 1925; Helleferich, 1962) : les rapports d'activité cationique des ions en solution corrigés de la charge sont égaux de chaque côté de la membrane.

$$(a_{i,\text{donneur}}/a_{i,\text{accepteur}})^{1/z_i} = (a_{j,\text{donneur}}/a_{j,\text{accepteur}})^{1/z_j}$$

où  $a_{i,\text{donneur}}$  et  $a_{i,\text{accepteur}}$  sont les activités du cation  $i$  dans les solutions de l'accepteur et du donneur et  $z_i$  sa charge,  $a_{j,\text{donneur}}$  et  $a_{j,\text{accepteur}}$  sont les activités du cation  $j$  dans les solutions de l'accepteur et du donneur et  $z_j$  sa charge.

Le cation  $j$  est supposé ne pas être en interaction avec le ligand étudié, ainsi la concentration totale du cation  $j$  est égale à la concentration en cation  $j$  libre. Les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  peuvent, par exemple, être utilisés pour corriger la concentration mesurée dans le compartiment accepteur et ainsi obtenir la concentration en métal libre dans le compartiment donneur (Temminghoff et al., 2000). En effet, les interactions entre le  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  et les SH peuvent être considérées comme négligeables.

*Concentration du métal dans la membrane :*

La membrane est assimilée à un gel de Donnan, c'est-à-dire à une charge distribuée de manière homogène dans une matrice placée dans une solution d'électrolyte. Le potentiel de Donnan ( $\Psi_D$ ) dépend de la densité de charge de la membrane ( $q$ ), du volume de Donnan de la membrane et de la force ionique.

La concentration des ions dans la phase de Donnan  $C_{i,m}$  peut être calculée à partir de l'équation suivante :

$$C_{i,m} = C_i B^{z_i} \text{ avec } B = \exp\left(-\frac{F\Psi_D}{RT}\right)$$

Avec  $B$  le facteur de Boltzmann et  $C_i$  la concentration en solution.

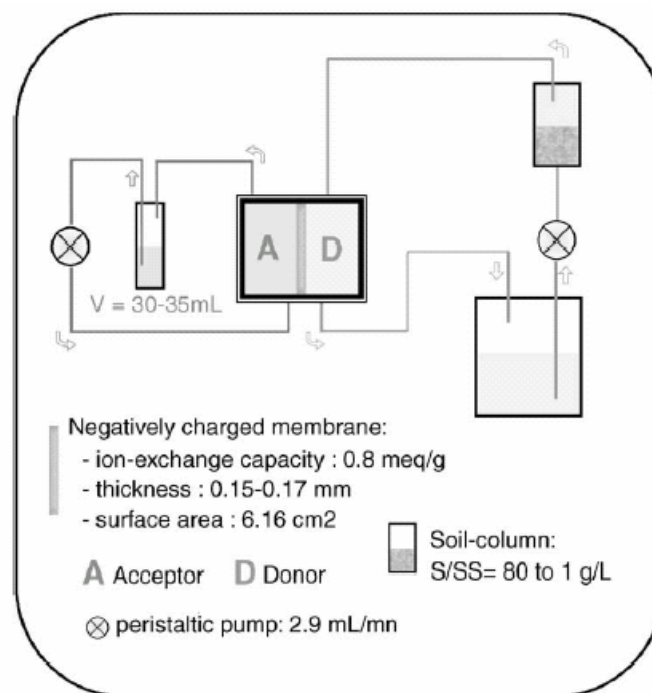
Dans la phase de Donnan de la membrane, la charge portée par les sites est neutralisée par les ions dans la membrane:

$$q + \sum Z_i C_i B^{Z_i} = 0$$

La valeur de la force ionique influence la quantité de cations complexés par la membrane. Plus la charge d'un cation est élevée, plus la concentration du cation dans la membrane est élevée. La force ionique des solutions de l'accepteur et du donneur est souvent fixée à partir d'un cation divalent. Celui-ci joue le rôle de compétiteur, en réduisant la quantité de métal étudié complexé dans la membrane. En revanche l'utilisation d'un cation divalent augmente la complexité d'une mesure par DMT car il est également en compétition avec le métal complexé par le ligand étudié, les SH.

*Utilisation :*

La DMT a été utilisée pour la première fois par Fitch et Helmke (1989), puis a été adaptée par Temminghoff *et al.* (2000) afin de pouvoir la coupler avec l'ICP-MS et l'ICP-AES. Les applications de la DMT vont de la mesure de concentration en métal libre dans des solutions synthétiques (Oste *et al.*, 2002; Weng *et al.*, 2002) à la mesure de la concentration en métal libre dans des eaux de sols (Weng *et al.*, 2001; Cances *et al.*, 2003). La **Figure 12** présente le schéma du développement de la DMT utilisé pour mesurer la concentration en zinc, cadmium et plomb libre dans des solutions de sols à différents pH (Cances *et al.*, 2003). La DMT et la DGT ont également été utilisées par Kalis *et al.* (2006) afin d'étudier la relation entre la spéciation et la consommation du métal par des plantes. Une modification de la DMT (Kalis *et al.*, 2006) a permis de mesurer la concentration en métal libre *in situ* dans des eaux de surface.



**Figure 12.** Schéma de la colonne de sol connecté au système DMT développé par Cances *et al.* (2003)

#### 4.3.5.2. Approche dynamique de la Donnan Membrane Technique

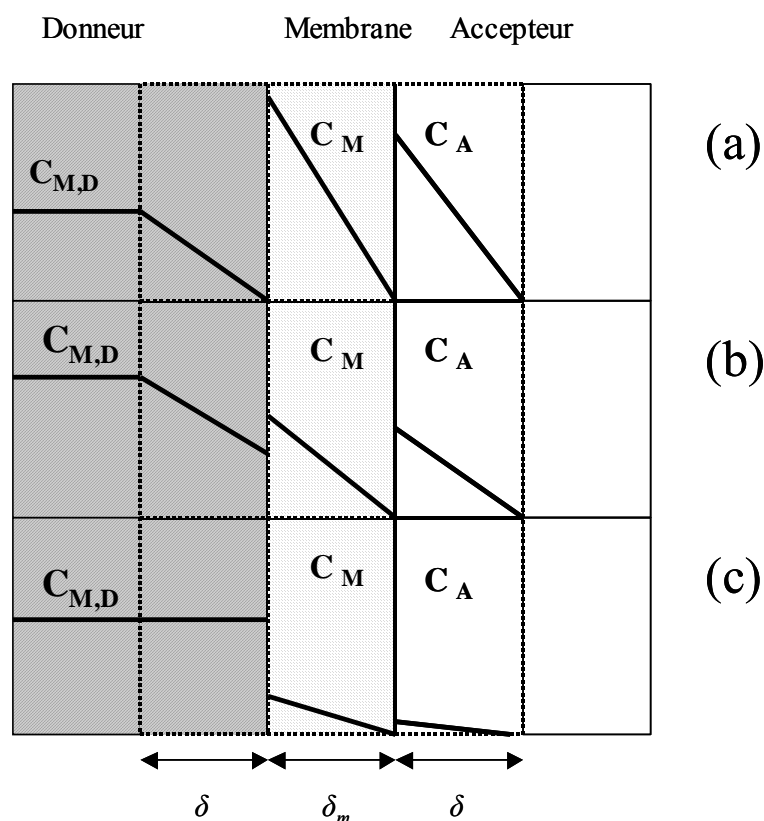
##### *Principe général :*

L'addition d'un ligand dans la solution du compartiment accepteur permet d'augmenter la concentration totale en métal et de diminuer ainsi la limite de détection (Weng *et al.*, 2005).

La concentration du métal libre dans le compartiment donneur peut être calculée à partir de la concentration totale en métal mesurée dans la solution de l'accepteur et en utilisant les solutions analytiques développées par Weng *et al.* (2005).

*Solutions analytiques décrivant le transport des cations dans le système DMT :*

Weng *et al.* (2005) ont montré que le transport des cations dans la cellule de la DMT peut être limité par la diffusion dans la membrane ou par la diffusion dans la couche de diffusion à l'interface membrane-solution. La **Figure 13** donne la représentation schématique des profils de concentration entre les compartiments donneur et accepteur. Le système passe d'un flux contrôlé par la diffusion en solution à un flux contrôlé par la diffusion dans la membrane, en augmentant la force ionique et en diminuant la concentration en métal libre ainsi que la charge du cation étudiée.



**Figure 13.** Profil des concentrations de M dans les différents compartiments de la DMT avec  $C_D$  la concentration de M dans le compartiment donneur,  $C_M$  la concentration de M dans la membrane et  $C_A$  la concentration de M dans le compartiment accepteur: (a) le flux est contrôlé par la diffusion en solution, (b) le flux de M est contrôlé à la fois par la diffusion en solution et dans la membrane, (c) le flux de M est contrôlé par la diffusion dans la membrane.

Si la concentration du métal libre dans la solution du compartiment accepteur est beaucoup plus faible que la concentration du métal libre dans le compartiment donneur, c'est-à-dire si on est loin de l'équilibre de Donnan, alors la relation entre la concentration du métal dans le compartiment donneur et accepteur est linéaire en fonction du temps.

Dans le cas où le transport est contrôlé par la diffusion dans la solution, le rapport entre la concentration totale du métal dans l'accepteur et la concentration totale dans le donneur peut être calculé par :

$$\frac{C_{i,tot,acc}}{C_{i,tot,donor}} = A_1 \cdot t \text{ avec } A_1 = \frac{A_e \cdot D_i}{V_{acc} \cdot \delta}$$

avec  $A_e$  la surface effective de la membrane ( $m^2$ ),  $D_i$  le coefficient de diffusion de l'ion  $i$  ( $m^2 s^{-1}$ ),  $V_{acc}$  le volume de l'accepteur ( $m^3$ ), et  $\delta$  l'épaisseur de la couche de diffusion ( $m$ ).

Dans le cas où le transport est contrôlé par la diffusion dans la membrane, le rapport entre la concentration totale du métal dans l'accepteur et la concentration du métal libre dans le donneur peut être calculé par :

$$\frac{C_{i,tot,acc}}{C_{i,donor}} = A_2 \cdot t \text{ avec } A_2 = \frac{A_e \cdot D_i \cdot B^{z_i}}{V_{acc} \cdot \delta_m \cdot \lambda}$$

avec  $B$  le facteur de Boltzmann,  $z_i$  la charge de l'ion  $i$ ,  $\delta_m$  l'épaisseur de la membrane ( $m$ ),  $\lambda$  la porosité de la membrane.

#### *Utilisations et limitations :*

Weng *et al.* (2005) ont montré qu'il était possible de diminuer la limite de détection en accumulant le métal dans le compartiment accepteur pendant plusieurs jours. Il a donc été possible de mesurer de très faibles concentrations de Cu ( $10^{-10}$  M) en présence de NTA. Kalis *et al.* (2006) ont également mesuré des concentrations faibles de métaux dans des eaux de surface en présence de SH dans le compartiment accepteur. Néanmoins l'utilisation des équations développées par Weng *et al.* (2005) nécessite de connaître la totalité des paramètres des équations. Or, la surface effective de la membrane  $A_e$ , ainsi que sa porosité  $\lambda$  sont des paramètres difficiles à déterminer. De plus dans les techniques de spéciation dynamique, il est essentiel de tenir compte de la labilité des complexes étudiés. Or, la labilité n'a jusqu'à présent pas été encore discutée dans l'approche dynamique de la DMT.



La « Flux Donnan Membrane technique » (FDM) a été développée afin d'obtenir des informations sur la complexation des radionucléides par les SH en un temps relativement court (de l'ordre de l'heure) et afin de diminuer la limite de détection. La FDM est également une approche dynamique de la DMT mais elle est fondée sur une calibration expérimentale du système (Marang *et al.*, 2006) ce qui permet de s'affranchir des paramètres théoriques des solutions analytiques du transport des cations. La FDM permet également d'obtenir des informations sur la labilité du complexé étudié.

#### **4.3.6. La Spectrofluorimétrie Laser à Résolution Temporelle**

La spectrofluorimétrie laser à résolution temporelle (SLRT) est fondée sur l'analyse de l'émission lumineuse d'un composé suite à son excitation par absorption de lumière cohérente pulsée. Elle a été initialement développée au CEA dans les années 1980 pour l'analyse de trace d'uranium (VI) et de curium compte tenu des très basses limites de détection accessible (Berthoud *et al.*, 1988; Berthoud *et al.*, 1989; Decambox *et al.*, 1989; Moulin *et al.*, 1990; 1991). Par la suite, cette technique a été plus largement utilisée pour sa haute sensibilité à l'environnement chimique des éléments fluorescents dans des milieux très divers tels que les complexants inorganiques (Wimmer *et al.*, 1992; Wimmer *et al.*, 1992; Meinrath, 1997; Vercoüter *et al.*, 2005), organiques simples (Klenze *et al.*, 1998; Plancque *et al.*, 2005), les milieux biologiques (Scapolan *et al.*, 1998; Le Clainche *et al.*, 2003), les interactions avec les polymères (Montavon *et al.*, 2002; Montavon *et al.*, 2004; Montavon *et al.*, 2007), pour décrire les phénomènes de sorption (Chung *et al.*, 1998; Stumpf *et al.*, 2001; Kowal-Fouchard *et al.*, 2004), ou les milieux micellaires (Moulin *et al.*, 1993; Moulin *et al.*, 1993).

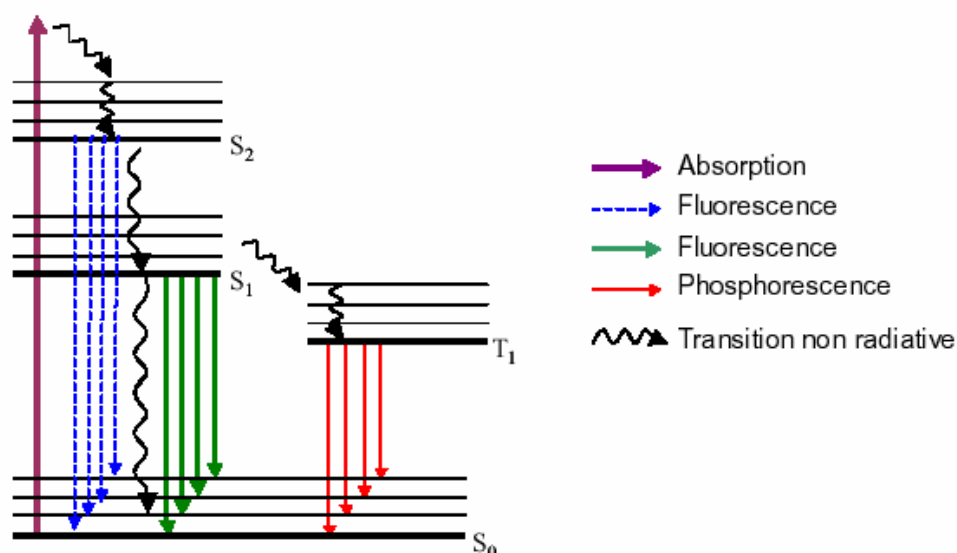
La SLRT est aussi très employée pour décrire l'association entre les métaux fluorescents et les SH (Berthoud *et al.*, 1989; Bidoglio *et al.*, 1991; Bidoglio *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1991; Moulin *et al.*, 1991; Moulin *et al.*, 1992; Moulin *et al.*, 1999; Plancque *et al.*, 2003; Claret *et al.*, 2005; Kumke *et al.*, 2005; Sachs *et al.*, 2007).

##### **4.3.6.1. Rappel interactions matière – rayonnement**

La spectrophotométrie est fondée sur les phénomènes d'absorption et d'émission de lumière. Le diagramme d'énergie représenté sur la **Figure 14** correspond à un cas général, où l'état fondamental  $S_0$  et les états excités  $S_1$  et  $S_2$  sont de multiplicité de spin 1 (états singulets), alors qu'un état excité  $T_1$  de multiplicité de spin 3 (états triplets) est également accessible.

L'étape d'absorption se caractérise par le passage du composé de l'état fondamental  $S_0$  vers un état excité dont la différence d'énergie avec  $S_0$ ,  $\Delta E$ , vérifie la relation  $\Delta E = h\nu$ , où  $h$  est la constante de Planck, et  $\nu$  la fréquence de la lumière incidente. S'ensuit la désexcitation du composé vers un niveau vibronique de  $S_0$  soit par un processus radiatif avec émission de lumière (fluorescence) soit par un processus non radiatif.

Une autre désexcitation, plus lente, est parfois permise par croisement intersystème : le composé dans son état excité  $S_1$  passe dans un autre état excité  $T_1$  : la transition radiative de l'état triplet  $T_1$  vers l'état singulet de l'état fondamental  $S_0$  est interdite par les règles de sélection. La probabilité de désexcitation est alors faible. Le rayonnement, qui porte le nom de phosphorescence, est de très faible intensité, de durée de vie longue et se manifeste en milieu rigide ou à basse température.



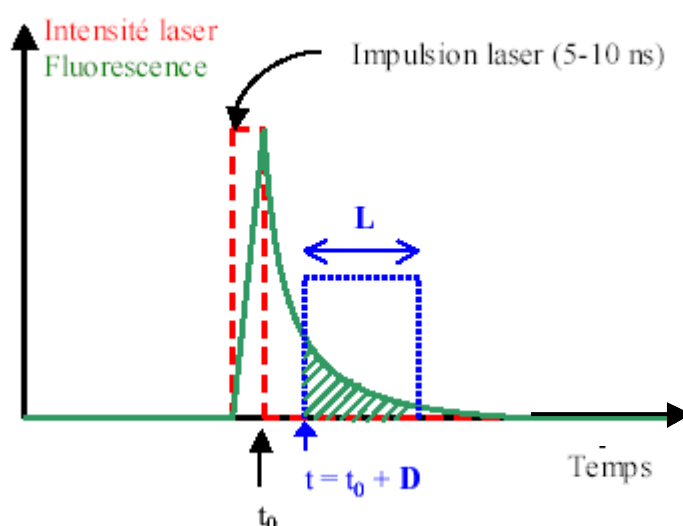
**Figure 14.** Diagramme des niveaux d'énergie d'une molécule et des transitions électroniques

Les émissions radiatives d'un composé peuvent, dans certains cas, être inhibées par échange d'énergie avec une autre molécule. Ces processus se divisent en deux catégories : le transfert d'énergie vers une molécule acceptrice, et les échanges par mouvements vibrationnels conduisant à une inhibition statique (interaction avec l'état fondamental) ou dynamique (interaction avec l'état excité).

#### 4.3.6.2. Principe de la SLRT

La SLRT est fondée sur l'analyse de l'émission lumineuse d'un composé suite à son excitation par absorption de lumière pulsée. Les lanthanides au degré d'oxydation +3, Ce, Sm, Gd, Eu, Tb, Dy et Tm ainsi que les actinides  $\text{UO}_2^{2+}$ ,  $\text{Am}^{3+}$ ,  $\text{Cm}^{3+}$ ,  $\text{Cf}^{3+}$ ,  $\text{Es}^{3+}$  et  $\text{Bk}^{3+}$  présentent des rendements quantiques d'émission suffisamment élevés pour que leur fluorescence soit observée. Néanmoins, parmi les actinides seuls  $\text{UO}_2^{2+}$  et  $\text{Cm}^{3+}$  possèdent un rendement quantique suffisant pour être détectable en solution aqueuse dans les conditions expérimentales que nous allons utiliser. Les autres nécessitent soit l'utilisation de laser de durée d'impulsion plus courte, en raison de leur temps de vie très court, soit d'excitation sélective dans le cas de  $\text{U}^{4+}$  (Kirishima *et al.*, 2003; Kirishima *et al.*, 2004) ou de milieux permettant l'isolement d'autres modes de désexcitation que les transitions radiatives (Thouvenot *et al.*, 1993).

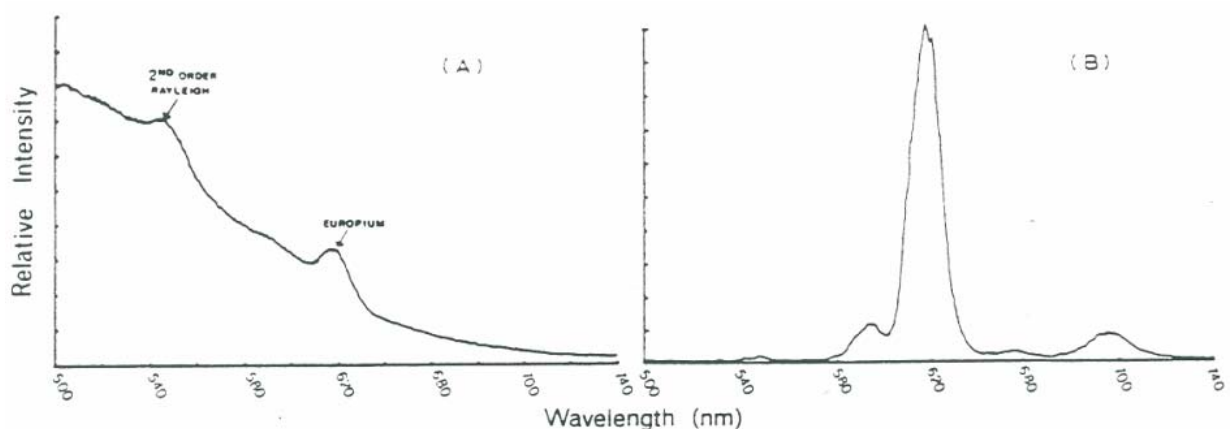
La caractérisation spécifique d'un élément sous une forme chimique particulière est rendue possible par les trois niveaux de sélectivité de la SLRT : longueur d'onde d'excitation, spectres et temps de vie et résolution temporelle.



**Figure 15.** Représentation schématique de la résolution temporelle d'un signal de fluorescence. D et L sont le délai et la largeur de la porte de mesure.

- *Longueur d'onde d'excitation* : la fluorescence d'un composé peut être favorisée par le choix de la source d'excitation laser avec une longueur d'onde correspondant à une bande d'absorption spécifique du composé.

- *Spectres et temps de vie de la fluorescence* : les spectres de fluorescence d'un élément sont composés de bandes plus ou moins sensibles à sa spéciation. Son temps de vie varie également avec son environnement chimique en raison de couplages vibrationnels avec les ligands qui affectent la vitesse de désexcitation.
- *Résolution temporelle* : lorsque les caractéristiques spectroscopiques sont suffisamment distinctes, la discrimination des espèces en solution est permise par le choix de paramètres d'analyse (délai et largeur de la porte de mesure). Le spectre de fluorescence d'une espèce, en mélange avec d'autres, peut ainsi être obtenu. La durée d'une impulsion laser, de l'ordre de la nanoseconde dans notre cas, est courte devant le temps de vie de fluorescence des éléments f. Chaque tir laser définit un temps initial  $t_0$  à partir duquel la fluorescence est mesurable. Une courbe de déclin de fluorescence peut être obtenue après chaque tir laser (**Figure 15**). Le détecteur est synchronisé avec les impulsions laser de sorte que la porte de mesure, définie par un délai D, retard par rapport à  $t_0$ , et une largeur L puissent être choisis. Deux espèces de temps de vie différents peuvent alors être discriminées en ajustant les paramètres D et L, afin de placer la porte de mesure après que la fluorescence de l'espèce 1 a diminué jusqu'à être négligeable. Ainsi l'espèce 1 est « éteinte » et seule la fluorescence de l'espèce 2 est mesurée. Dans le cas particulier des SH, la fluorescence intense, mais de très faible temps de vie, empêche l'obtention de spectres des espèces métal-SH. Par le positionnement de la porte de mesure après la fin de la désexcitation fluorescente des SH, le spectre de l'euporium est obtenu (**Figure 16**).



**Figure 16.** Spectre de fluorescence de l'euporium en présence de 10 mg/L d'acide humique sans résolution temporelle (A), et avec résolution temporelle (B) (Berthoud et al., 1989).

#### 4.3.6.3. Propriétés de fluorescence de l'euporium(III)

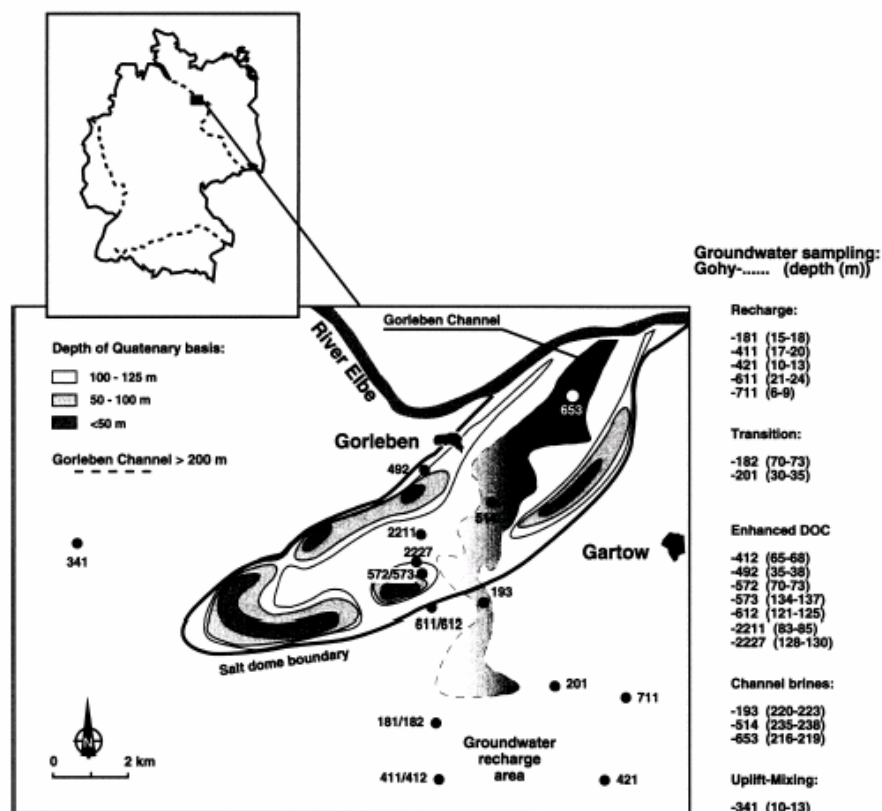
La configuration de l'euporium à l'état fondamental est  $[Xe]4f^6$ . Le couplage spin-orbite lève la dégénérescence de l'état fondamental de Eu(III) en 7 niveaux :  ${}^7F_0$ ,  ${}^7F_1$ ,  ${}^7F_2$ ,  ${}^7F_3$ ,  ${}^7F_4$ ,  ${}^7F_5$ ,  ${}^7F_6$ . Les principales transitions radiatives sont issues de l'état excité  ${}^5D_0$  vers les niveaux  ${}^7F_0$ ,  ${}^7F_1$ ,  ${}^7F_2$ ,  ${}^7F_3$ ,  ${}^7F_4$  de l'état fondamental aux longueurs d'ondes respectives 580, 593, 618, 650 et 700 nm. Le spectre de Eu (III) se caractérise par trois pics principaux correspondant aux transitions  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ ,  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ ,  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_4$ . En milieu complexant, l'intensité des pics de fluorescence est modifiée suite à l'influence du champ de ligand sur les niveaux électroniques. Les plus fortes variations sont observées pour la transition hypersensible  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$  à 618 nm. De plus, des épaulements liés à la structure fine de cette transition (5 niveaux sont dégénérés dans  ${}^7F_2$ ) apparaissent également. La transition  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$  à 580 nm est en général de faible intensité puisque les règles de sélection l'interdisent. Elle apparaît cependant lorsque l'environnement de l'euporium n'est pas centrosymétrique.

### 4.4. Les substances humiques étudiées

#### 4.4.1. L'acide humique de Gorleben

Les acides humiques et fulviques issus des eaux souterraines dans les aquifères de Gorleben (Allemagne) ont été largement étudiés depuis une vingtaine d'années. L'échantillon que nous utiliserons par la suite est issu du puits 570 au troisième niveau de prélèvement (Gohy 573)

Le site de Gorleben est envisagé pour devenir un centre de stockage de déchets radioactifs, des galeries y étant creusées dans un dôme de sel (**Figure 17**). Le forage Gohy-573 est localisé dans les aquifères de Gorleben au-dessus du dôme de sel avec un afflux d'eaux souterraines provenant des sédiments Prälster dans la zone de profondeur 134–137 m (Buckau *et al.*, 2000; Wolf *et al.*, 2004). Les eaux souterraines sont d'un brun très foncé et ont une concentration en COD élevée (97,3 mg C/L). La majeure partie de la COD est constituée de SH : AH (60 mgC/L) et AF (17 mgC/L). Des échantillons ont été isolés, purifiés et caractérisés lors des projets européens MIRAGE (MIgration of RADionuclide in the GEosphere) et HUPA (Humic Substances in Performance Assessment of Nuclear Waste Disposal: Actinide and Iodine Migration in the Far-Field).



**Figure 17.** Site de Gorleben (Allemagne) avec la localisation des sites de prélèvements (Buckau *et al.*, 2000)

La composition élémentaire des AH et des AF est présentée dans le **Tableau 7**. La distribution de la taille des SH déterminée en AFFFF (Asymmetrical flow field-flow fractionation) est de 150 - 3000 Da pour les AF (nombre moyen des poids moléculaires de 470 Da) et de 150 - 14000 Da (nombre moyen des poids moléculaires de 990 Da) pour les AH (Wolf *et al.*, 2004).

**Tableau 7.** Composition élémentaire des AH et AF Gohy-573 de Gorleben.

| Substances Humiques<br>Gohy-573 | C (%) | H (%) | O (%) | N (%) | S (%) |
|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| AF                              | 54,1  | 4,23  | 38,94 | 1,38  | 1,32  |
| AH                              | 59,3  | 4,57  | 32,10 | 2,01  | 2,02  |

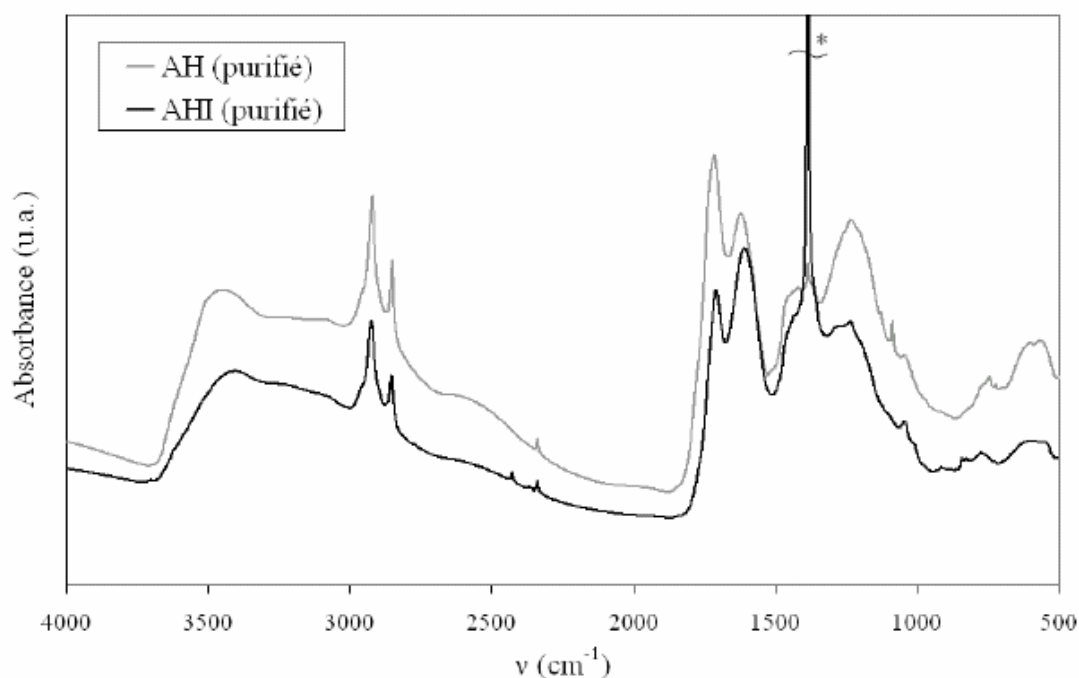
L'intérêt de l'étude des interactions entre la MON de Gorleben et les radionucléides réside dans le fait que ses caractéristiques et propriétés sont bien déterminées (Wolf *et al.*, 2004). De

plus une grande partie des participants du projet européen FUNMIG (Fundamental Process of Radionuclide Migration) étudie les substances humiques de Gorleben ce qui permet une meilleure comparaison des données.

#### 4.4.2. L'acide humique insolubilisé

L'insolubilisation des substances humiques est une approche intéressante pour étudier leurs interactions avec les métaux (Seki et al., 1995; Weber et al., 2006; Weber et al., 2006). En effet, leur utilisation permet d'obtenir simplement la concentration en métal libre en solution après séparation par centrifugation de la solution et de l'acide humique insolubilisé. De plus ces substances humiques insolubilisées ont un comportement potentiellement représentatif de celui de la matière organique dans le milieu naturel, notamment les sols et les sédiments puisqu'elle s'y trouve majoritairement immobilisé (adsorbée sur des surfaces minérales ou agrégée par des interactions avec des espèces organiques ou inorganiques).

L'insolubilisation nécessite de grandes quantités d'AH. L'acide humique Aldrich sous forme de son sel de calcium a été utilisé car il est disponible en grande quantité au laboratoire. Cet acide humique insolubilisé (AHI) a été utilisé comme substance modèle de la matière organique naturelle (Weber et al., 2006; Weber et al., 2006). L'AHI a été insolubilisé d'après le protocole de Seki & Susuki (1995) : il est d'abord condensé par chauffage, puis copolymérisé par du formaldéhyde et enfin purifié. Weber et al. (2006) ont pu montrer grâce à la spectroscopie infrarouge que la structure de l'AHI est malgré tout peu modifiée par le processus d'insolubilisation (**Figure 18**). Weber *et al.* (2006) ont également montré à l'aide de la modélisation des titrages potentiométriques que la réactivité des sites complexant de l'AHI vis-à-vis du proton n'est pas modifiée. Toutefois, ils ont observé un nombre bien moindre de sites, notamment phénoliques dans l'acide condensé. Seki et Susuki (1995) ont également montré que l'insolubilisation d'un AH ne modifiait pas sa réactivité vis à vis du proton, du cadmium ou du plomb mais uniquement le nombre de sites disponibles.



**Figure 18.** Spectres infrarouge de l'acide humique Aldrich (AH) et de l'acide humique condensé (AHI) purifiés (Weber et al., 2006).

#### 4.5. Démarche

La **Figure 19** présente la démarche générale adoptée pour ce travail. L'étude des interactions des radionucléides avec les substances humiques nécessite deux types d'informations expérimentales : des données de complexation parmi lesquelles la concentration en métal libre en solution pour une grande gamme de concentrations totales en métal et en pH, ainsi que des données sur la compétition entre RN et d'autres cations.

Les données de complexation entre RN et SH sont obtenues à partir de deux approches expérimentales :

- Développement de la Flux Donnan Membrane technique (FDM), modification dynamique de la DMT ainsi que l'utilisation de la FDM pour l'acquisition de données de complexation entre  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{UO}_2^{2+}$  et l'AH de Gorleben (AHG) .
- Utilisation d'un acide humique insolubilisé (AHI), analogue des AH. Une séparation entre le métal libre et le métal complexé peut être effectuée à l'aide d'une centrifugation. L'AHI est utilisé pour acquérir des données de complexation  $\text{UO}_2^{2+}$ -AHI pour des pH supérieurs à 4.



La compétition entre cations est également étudiée à partir de deux approches :

- Etude des interactions entre  $Mg^{2+}$  et l'AHG afin de tenir compte de l'éventuel compétition entre le magnésium et les RN. En effet, pour utiliser la FDM, la force ionique doit être fixée par un autre cation divalent que celui étudié afin de fixer le potentiel de la membrane échangeuse de cations. L'ensemble des données de complexation ( $Co^{2+}$ ,  $UO_2^{2+}$  avec un AH) sera obtenues en présence de  $Mg^{2+}$  en solution.
- Etudes potentiométrique (à l'aide d'électrode ionique spécifique) et spectroscopique (à l'aide de la SLRT) de l'effet du  $Ca^{2+}$  et du  $Cu^{2+}$  sur la complexation de  $Eu^{3+}$  par l'AHG.  $Ca^{2+}$  et  $Cu^{2+}$  ont été choisis car les interactions entre  $Ca^{2+}$  et SH sont majoritairement de type électrostatique alors que les interactions  $Cu^{2+}$  et SH sont majoritairement de type spécifique.

La modélisation est effectuée à l'aide du modèle NICA-Donnan. Dans un premier temps, les paramètres propres à l'AHG et l'AHI sont obtenus en ajustant le modèle à des données de titrations potentiométriques. Dans un deuxième temps, les paramètres propres aux RN sont obtenus en ajustant le modèle aux données expérimentales de complexation. Enfin, la prédiction de l'influence de la MON sur la spéciation des RN calculée par le modèle NICA-Donnan sera validée en la comparant à des données de spéciation de la littérature obtenues *in situ* (spéciation de l'uranium dans des eaux souterraines) ou à des données de compétitions expérimentales (calcium/ cuivre/ europium).

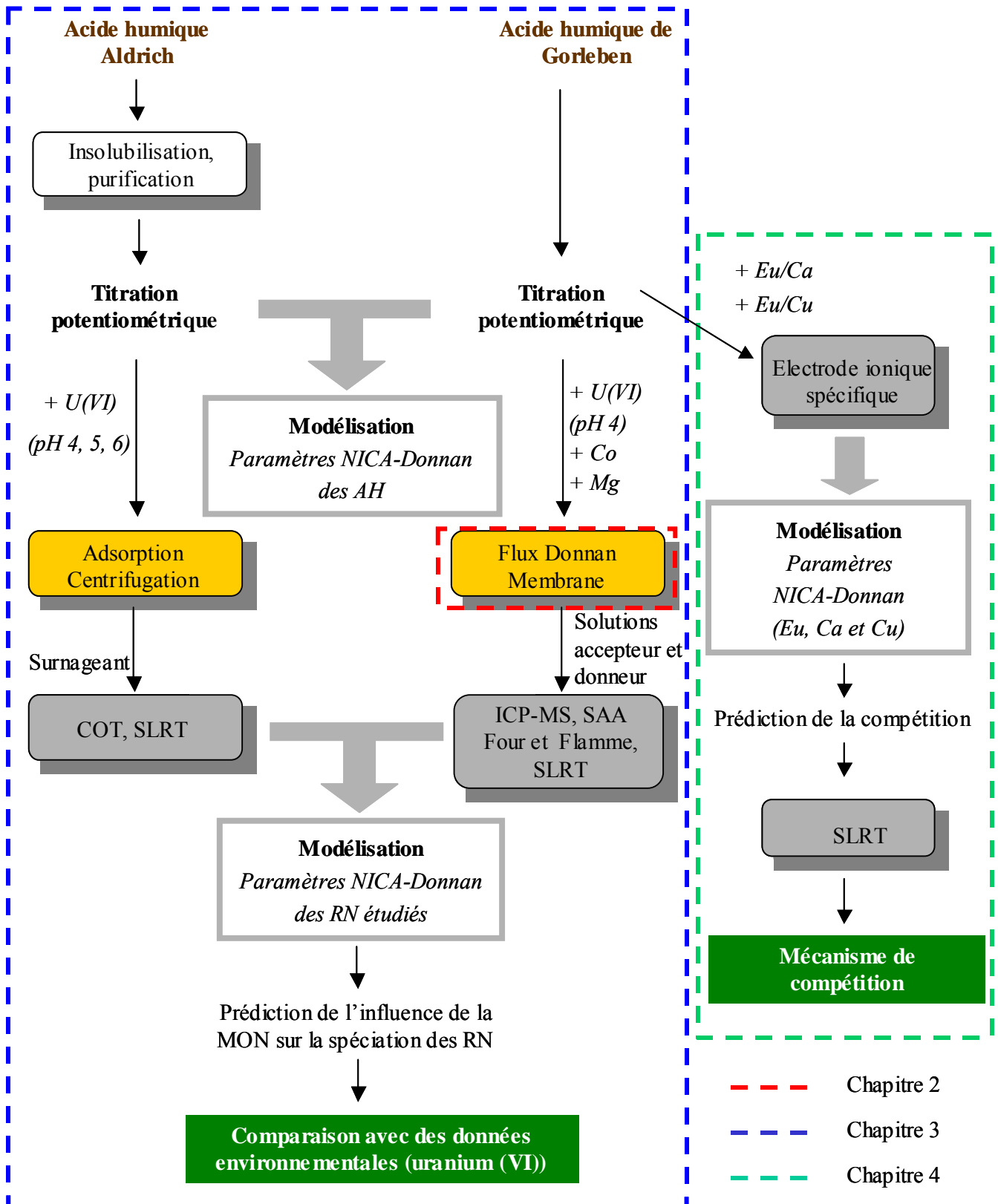


Figure 19. Méthodologie suivie pour l'étude des interactions radionucléides / SH.

## 4.6. Présentation du mémoire

Ce mémoire comporte 5 parties. Après ce chapitre d'introduction générale, le **chapitre 1** présente le développement de la Flux Donnan Membrane ainsi qu'une première application à l'étude des interactions entre le cobalt et l'AH de Gorleben. Le **chapitre 2** présente une étude de l'influence des substances humiques sur la spéciation de l'uranium et du magnésium ainsi que la compétition entre ces deux cations. Le **chapitre 3** présente une étude potentiométrique et spectroscopique de l'effet du calcium et du cuivre sur la complexation de l'euporium par l'AH de Gorleben. La dernière partie présente enfin les conclusions et les perspectives de ce travail.

## REFERENCES

- Aiken, G. R., D. McKnight, R. L. Wershaw and J. F. MacCarthy (1985). Humic substances in soil, sediment and water. New-York, Wiley intersciences.
- ANDRA, Ed. (2005). Dossier 2005 Argiles - Evolution phénoménologique du stockage géologique. Chatenay Malabry, ANDRA.
- Artinger, R., T. Rabung, J. I. Kim, S. Sachs, K. Schmeide, K. H. Heise, G. Bernhard and H. Nitsche (2002). "Humic colloid-borne migration of uranium in sand columns." *Journal Of Contaminant Hydrology* **58**(1-2): 1-12.
- Bayen, S., I. Worms, N. Parthasarathy, K. Wilkinson and J. Buffle (2006). "Cadmium bioavailability and speciation using the permeation liquid membrane." *Analytica Chimica Acta* **575**(2): 267-273.
- Benedetti, M. D. F., W. H. van Riemsdijk and L. K. Koopal (1996). "Humic substances considered as a heterogeneous donnan gel phase." *Environmental Science and Technology* **30**(6): 1805-1813.
- Benedetti, M. D. F., W. H. van Riemsdijk, L. K. Koopal, D. G. Kinniburgh, D. C. Goody and C. J. Milne (1996). "Metal ion binding by natural organic matter: From the model to the field." *Geochimica et Cosmochimica Acta* **60**: 2503-2513.
- Berthoud, T., P. Decambox, B. Kirsch, P. Mauchien and C. Moulin (1988). "Direct Uranium Trace Analysis In Plutonium Solutions By Time-Resolved Laser-Induced Spectrofluorometry." *Analytical Chemistry* **60**(13): 1296-1299.
- Berthoud, T., P. Decambox, B. Kirsch, P. Mauchien and C. Moulin (1989). "Direct Determination Of Traces Of Lanthanide Ions In Aqueous-Solutions By Laser-Induced Time-Resolved Spectrofluorimetry." *Analytica Chimica Acta* **220**(1): 235-241.
- Bidoglio, G., I. Grenthe, P. Qi, P. Robouch and N. Omenetto (1991). "Complexation of Eu and Tb with fulvic acids as studied by time -resolved laser-induced fluorescence." *Talanta* **38**: 999-1008.
- Bidoglio, G., N. Omenetto and P. Robouch (1991). "Kinetic-Studies of Lanthanide Interactions with Humic Substances by Time Resolved Laser-Induced Fluorescence." *Radiochimica Acta* **52-3**: 57-63.
- Bryan, N. D., J. Barlow, P. Warwick, S. Stephens, J. J. W. Higgs and D. Griffin (2005). "The simultaneous modelling of metal ion and humic substance transport in column experiments." *Journal of Environmental Monitoring* **7**(3): 196-202.
- Buckau, G., R. Artinger, S. Geyer, M. Wolf, P. Fritz and J. I. Kim (2000). "Groundwater in-situ generation of aquatic humic and fulvic acids and the mineralization of sedimentary organic carbon." *Applied Geochemistry* **15**(6): 819-832.
- Buddemeier, R. and J. Hunt (1988). "Transport of colloidal contaminants in groundwater: radionuclide migration at the Nevada test site." *Applied Geochemistry* **3**: 535-548.
- Buffle, J. (1988). *Complexation Reactions in Aquatic Systems*, Ellis Horwood Series in Analytical Chemistry.
- Buffle, J. and M. L. Tercier-Waeber (2000). In situ voltammetry: concepts and practice for trace analysis and speciation. In situ monitoring of aquatic systems: chemical analysis and speciation. J. Buffle and G. Horvai. Chichester. **6**: 279-405.
- Cabaniss, S. E. (1992). "Synchronous Fluorescence-Spectra Of Metal-Fulvic Acid Complexes." *Environmental Science & Technology* **26**(6): 1133-1139.
- Cances, B., M. Ponthieu, M. Castrec-Rouelle, E. Aubry and M. F. Benedetti (2003). "Metal ions speciation in a soil and its solution: experimental data and model results." *Geoderma* **113**(3-4): 341-355.
- Chang, Z., S. Ambe, K. Takahashi and F. Ambe (2006). "A study on the metal binding of humic acid by multitracer technique." *Radiochimica Acta* **94**(1): 37-46.

- Choppin, G. R. (1992). "The role of natural organics In radionuclide migration In natural aquifer systems." *Radiochimica Acta* **58-9**: 113-120.
- Choppin, G. R. and B. Allard (1985). Complexes of actinides with naturally occurring organic compounds. Handbook on the Physics and Chemistry of the Actinides. A. J. Freeman and C. Keller, Elsevier: 407-429.
- Choppin, G. R. and N. Labonne Wall (1997). "Comparison of two models for metal-humic interactions." *Journal Of Radioanalytical And Nuclear Chemistry* **221**(1-2): 67-71.
- Chung, K. H., R. Klenze, K. K. Park, P. Paviet-Hartmann and J. I. Kim (1998). "A study of the surface sorption process of Cm(III) on silica by time-resolved laser fluorescence spectroscopy (I)." *Radiochimica Acta* **82**: 215-219.
- Chung, K. H., W. Lee, Y. Cho, G. S. Choi and C. W. Lee (2005). "Comparison of synchronous and laser-induced fluorescence spectroscopy applied to the Eu(III)-fulvate complexation." *Talanta* **65**(2): 389-395.
- Claret, F., T. Schafer, T. Rabung, M. Wolf, A. Bauer and G. Buckau (2005). "Differences in properties and Cm(III) complexation behavior of isolated humic and fulvic acid derived from Opalinus clay and Callovo-Oxfordian argillite." *Applied Geochemistry* **20**(6): 1158-1168.
- Conte, P. and A. Piccolo (1999). "Conformational arrangement of dissolved humic substances. Influence of solution composition on association of humic molecules." *Environmental Science & Technology* **33**(10): 1682-1690.
- Crançon, P. and J. van der Lee (2003). "Speciation and mobility of uranium(VI) in humic-containing soils." *Radiochimica Acta* **91**(11): 673-679.
- Croué, J. P., M. F. Benedetti, D. Violleau and J. A. Leenheer (2003). "Characterization and copper binding of humic and nonhumic organic matter isolated from the South Platte River: Evidence for the presence of nitrogenous binding site." *Environmental Science and Technology* **37**(2): 328-336.
- Czerwinski, K. R., G. Buckau, F. Scherbaum and J. I. Kim (1994). "Complexation Of the Uranyl Ion with aquatic Humic Acid." *Radiochimica Acta* **65**: 111-119.
- Czerwinski, K. R., J. I. Kim, D. S. Rhee and G. Buckau (1996). "Complexation of Trivalent Actinide Ions with Humic Acid: The effect of Ionic Strength." *Radiochimica Acta* **72**: 179-187.
- Decambox, P., P. Mauchien and C. Moulin (1989). "Direct Trace Determination Of Curium By Laser-Induced Time-Resolved Spectrofluorometry." *Radiochimica Acta* **48**(1-2): 23-28.
- Denecke, M. A., S. Pompe, T. Reich, H. Moll, M. Bubner, K. H. Heise, R. Nicolai and H. Nitsche (1997). "Measurements of the structural parameters for the interaction of uranium(VI) with natural and synthetic humic acids using EXAFS." *Radiochimica Acta* **79**(3): 151-159.
- Dong, W. M., G. B. Xie, T. R. Miller, M. P. Franklin, T. P. Oxenberg, E. J. Bouwer, W. P. Ball and R. U. Halden (2006). "Sorption and bioreduction of hexavalent uranium at a military facility by the Chesapeake Bay." *Environmental Pollution* **142**(1): 132-142.
- Donnan, F. G. (1925). *Chem.Rev* **73**: 3.
- Ecole des mines de Paris, d. d. g. JChess, <http://chess.ensmp.fr/fr/index.html>.
- Fitch, A. and P. A. Helmke (1989). "Donnan Equilibrium Graphite-Furnace Atomic-Absorption Estimates Of Soil Extract Complexation Capacities." *Analytical Chemistry* **61**(11): 1295-1298.
- Fujikawa, Y., J. Zheng, I. Cayer, M. Sugahara, H. Takigami and A. Kudo (1999). "Strong association of fallout plutonium with humic and fulvic acid as compared to uranium

- and  $^{137}\text{Cs}$  in Nishiyama soils from Nagasaki, Japan." *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **240**: 69-74.
- Glaus, M. A., W. Hummel and L. R. Van Loon (1997). *Experimental Determination and Modelling of Trace Metal-Humate Interactions: A pragmatic Approach for Applications in Groundwater*. PSI - Bericht 97- 153, Paul Scherrer Institut, Villigen, Switzerland.
- Harter, R. D. and R. Naidu (2001). "An assessment of environmental and solution parameter impact on trace-metal sorption by soils." *Soil Science Society Of America Journal* **65**(3): 597-612.
- Helleferich, F. G. (1962). *Ion Exchange*. McGraw-Hill. New York.
- Higgo, J. J. W., D. G. Kinniburgh, B. Smith and E. Tipping (1993). "Complexation Of  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{UO}_2^{2+}$  And  $\text{Ca}^{2+}$  By Humic Substances In Groundwaters." *Radiochimica Acta* **61**(2): 91-103.
- Kalis, E. J. J., E. J. M. Temminghoff, L. P. Weng and W. H. Van Riemsdijk (2006). "Effects of humic acid and competing cations on metal uptake by *Lolium perenne*." *Environmental Toxicology And Chemistry* **25**(3): 702-711.
- Kalis, E. J. J., L. P. Weng, F. Dousma, E. J. M. Temminghoff and W. H. Van Riemsdijk (2006). "Measuring free metal ion concentrations in situ in natural waters using the Donnan Membrane Technique." *Environmental Science and Technology* **40**(3): 955-961.
- Kaplan, D. I., M. E. Sumner, P. M. Bertsch and D. C. Adriano (1996). "Chemical conditions conducive to the release of mobile colloids from ultisol profiles." *Soil Science Society Of America Journal* **60**(1): 269-274.
- Keizer, M. G. and W. H. Van Riemsdijk (1994). *A computer program for the Calculation of Chemical Speciation and Transport in Soil-Water Systems (ECOSAT 4.7)*. Wageningen, Agricultural University of Wageningen.
- Kerndorff, H. and M. Schnitzer (1980). "Sorption of metals on humic acid." *Geochimica et Cosmochimica Acta* **44**: 1701-1708.
- Kersting, A. B., D. W. Efurud, D. L. Finnegan, D. J. Rokop, D. K. Smith and J. L. Thompson (1999). "Migration of plutonium in groundwater at the Nevada test site." *Nature* **397**: 56-58.
- Kim, J. I. and K. R. Czerwinski (1996). "Complexation of metal ions with humic acid: metal ion charge neutralization model." *Radiochimica Acta* **73**(1): 5-10.
- Kim, J. I. and C. M. Marquardt (1999). "Chemical reaction of  $\text{Np(V)}$  with humic colloids in groundwater: Influence of purification on the complexation behaviour." *Radiochimica Acta* **87**: 105-108.
- Kim, J. I., D. S. Rhee, G. Buckau and A. Morgenstern (1997). "Americium(III)-humate interaction in natural groundwater: Influence of purification on complexation properties." *Radiochimica Acta* **79**(3): 173-181.
- Kim, J. I., D. S. Rhee, H. Wimmer, G. Buckau and R. Klenze (1993). "Complexation of trivalent actinide ions ( $\text{Am}^{3+}$ ,  $\text{Cm}^{3+}$ ) with humic acid: a comparison of different experiment methods." *Radiochimica Acta* **62**: 35-43.
- Kim, J. I. and T. Sekine (1991). "Complexation of neptunium(V) with humic acid." *Radiochimica Acta* **55**(4): 187-192.
- Kim, J. I., H. Wimmer and R. Klenze (1991). "A Study of Curium(III) humate Complexation by Time Resolved Laser Fluorescence Spectroscopy (TRLFS)." *Radiochimica Acta* **54**: 35-41.
- Kinniburgh, D. G., W. H. van Riemsdijk, L. K. Koopal, M. Borkovec, M. F. Benedetti and M. J. Avena (1999). "Ion binding to natural organic matter: competition, heterogeneity,

- stoichiometry and thermodynamic consistency." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **151**(1-2): 147-166.
- Kirishima, A., T. Kimura, R. Nagaishi and O. Tochiyama (2004). "Luminescence properties of tetravalent uranium in aqueous solution." *Radiochimica Acta* **92**(9-11): 705-710.
- Kirishima, A., T. Kimura, O. Tochiyama and Z. Yoshida (2003). "Luminescence study of tetravalent uranium in aqueous solution." *Chemical Communications*(7): 910-911.
- Klenze, R., P. Panak and J. I. Kim (1998). "A complexation study of Cm(III) and Tb(III) with chelating aromatic ligands by time-resolved fluorescence spectroscopy." *Journal of Alloys and Compounds* **271-273**: 746-750.
- Kolokassidou, C. and I. Pashalidis (2006). "Potentiometric investigations on the interactions of humic acid with Cu(II) and Eu(III) ions." *Radiochimica Acta* **94**: 549-552.
- Koopal, L. K. (2001). *Definitions, Terminology and Symbols in Colloid and Surface Chemistry: definition and classification of colloids. Manual of symbols and terminology for physicochemical quantities and units.*
- Koopal, L. K., W. H. Vanriemsdijk, J. C. M. Dewit and M. D. F. Benedetti (1994). "Analytical Isotherm Equations For Multicomponent Adsorption To Heterogeneous Surfaces." *Journal Of Colloid And Interface Science* **166**(1): 51-60.
- Kowal-Fouchard, A., R. Drot, E. Simoni, N. Marmier, F. Fromage and J. J. Ehrhardt (2004). "Structural identification of europium(III) adsorption complexes on montmorillonite." *New Journal of Chemistry* **28**(7): 864-869.
- Kumke, M. U., S. Eidner and T. Kruger (2005). "Fluorescence quenching and luminescence sensitization in complexes of Tb<sup>3+</sup> and Eu<sup>3+</sup> with humic substances." *Environmental Science and Technology* **39**(24): 9528-9533.
- Laszak, I. (1997). *Etude des interactions entre substances humiques et uranium(VI) par spectrofluorimétrie laser à résolution temporelle, Etude chimique et spectroscopique, Université Paris 6.*
- Le Clainche, L., G. Planque, B. Amekraz, C. Moulin, C. Pradines-Lecomte, G. Peltier and C. Vita (2003). "Engineering new metal specificity in EF-hand peptides." *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **8**(3): 334-340.
- Lead, J. R., J. Hamilton-Taylor, A. Peters, S. Reiner and E. Tipping (1998). "Europium binding by fulvic acids." *Analytica Chimica Acta* **239**: 171-180.
- Leenheer, J. A., C. E. Rostad, P. M. Gates, E. T. Furlong and I. Ferrer (2001). "Molecular resolution and fragmentation of fulvic acid by electrospray ionization/multistage tandem mass spectrometry." *Analytical Chemistry* **73**(7): 1461-1471.
- Li, W. C., D. M. Victor and C. L. Chakrabarti (1980). "Effect of pH and uranium concentration on interaction of uranium(VI) and uranium(IV) with organic ligands in aqueous solutions." *Analytical Chemistry* **52**: 520-523.
- MacCarthy, P. (2001). "The principles of humic substances." *Soil Science* **166**(11): 738-751.
- Maes, A., J. de Brabandère and A. Cremers (1988). "A modified Schubert method for the measurement of the stability of europium humic acid complexes in alkaline conditions." *Radiochimica Acta* **44/45**: 51-57.
- Maes, N., L. Wang, T. Hicks, D. Bennett, P. Warwick, T. Hall, G. Walker and A. Dierckx (2006). "The role of natural organic matter in the migration behaviour of americium in the Boom Clay - Part I: Migration experiments." *Physics And Chemistry Of The Earth* **31**(10-14): 541-547.
- Marang, L., P. Reiller, M. Pepe and M. F. Benedetti (2006). "Donnan membrane approach: From equilibrium to dynamic speciation." *Environmental Science & Technology* **40**(17): 5496-5501.

- Marquardt, C., G. Herrman and N. Trautmann (1996). "Complexation of neptunium(V) with humic acids at very low concentrations." *Radiochimica Acta* **73**(3): 119-126.
- Marquardt, C. and J. I. Kim (1998). "Complexation of Np(V) with humic acid: Intercomparison of results from different laboratories." *Radiochimica Acta* **80**(3): 129-137.
- Meinrath, G. (1997). "Uranium(VI) speciation by spectroscopy." *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **224**(1-2): 119-126.
- Milne, C. J., D. G. Kinniburgh and E. Tipping (2001). "Generic NICA-Donnan Model Parameters for Proton Binding by Humic Substances." *Environmental Science & Technology* **35**: 2049-2059.
- Milne, C. J., D. G. Kinniburgh, W. H. van Riemsdijk and E. Tipping (2003). "Generic NICA-Donnan Model Parameters for Metal-Ion Binding by Humic Substances." *Environmental Science & Technology* **37**: 958-971.
- Monsallier, J. M., F. J. Scherbaum, G. Buckau, J. I. Kim, M. U. Kumke, C. H. Specht and F. H. Frimmel (2001). "Influence of photochemical reactions on the complexation of humic acid with europium(III)." *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **138**(1): 55-63.
- Montavon, G., A. Mansel, A. Seibert, H. Keller, J. V. Kratz and N. Trautmann (2000). "Complexation studies of UO<sub>2</sub><sup>2+</sup> with humic acid at low metal ion concentrations by indirect speciation methods." *Radiochimica Acta* **88**(1): 17-24.
- Montavon, G., S. Markai, I. Billard, A. Nehlig and B. Grambow (2002). "Complexation and luminescence spectroscopic studies of europium(III) with polymaleic acid." *Radiochimica Acta* **90**(5): 289-296.
- Montavon, G., S. Markai, S. Ribet, T. Rabung, H. Geckeis and B. Grambow (2007). "Modeling the complexation properties of mineral-bound organic polyelectrolyte: An attempt at comprehension using the model system alumina/polyacrylic acid/M (M = Eu, Cm, Gd)." *Journal of Colloid and Interface Science* **305**(1): 32-39.
- Montavon, G., T. Rabung, H. Geckeis and B. Grambow (2004). "Interaction of Eu(III)/Cm(III) with alumina-bound poly(acrylic acid): Sorption, desorption, and spectroscopic studies." *Environmental Science & Technology* **38**(16): 4312-4318.
- Monteil-Rivera, F. and J. Dumonceau (2002). "Fluorescence spectrometry for quantitative characterization of cobalt(II) complexation by Leonardite humic acid." *Analytical And Bioanalytical Chemistry* **374**(6): 1105-1112.
- Morel, F. M. M. (1983). *Principles of aquatic chemistry*, New York: John Wiley.
- Morgenstern, M., R. Klenze and J. I. Kim (2000). "The formation of mixed-hydroxo complexes of Cm(III) and Am(III) with humic acid in the neutral pH range." *Radiochimica Acta* **88**: 7-16.
- Moulin, C., C. Beaucaire, P. Decambox and P. Mauchien (1990). "Determination of uranium in solution at the ng.l<sup>-1</sup> level by time-resolved laser-induced spectrofluorimetry: application to geological samples." *Analytica Chimica Acta* **238**(2): 291-296.
- Moulin, C., P. Decambox and P. Mauchien (1991). "Determination of Curium at 0.1 ng l<sup>-1</sup> Levels in a Micellar Medium by Time-Resolved Laser-Induced Spectrofluorimetry." *Analytica Chimica Acta* **254**: 145-151.
- Moulin, C., P. Decambox, P. Mauchien, V. Moulin and M. Theyssier (1991). "On the use of laser-induced time-resolved spectrofluorimetry for interaction studies between organic matter and actinides: application to curium." *Radiochimica Acta* **52/53**: 119-125.



- Moulin, C., P. Reiller, C. Beaucaire and D. Lemordant (1993). "Time-resolved laser-induced spectrofluorometry for the study of uranium anionic surfactant micelle interactions." *Journal of Colloid and Interface Science* **157**(2): 411-417.
- Moulin, C., P. Reiller, C. Beaucaire and D. Lemordant (1993). "Time-resolved laser-induced spectrofluorometry studies of uranium/sodium dodecyl sulfate interactions." *Applied Spectroscopy* **47**(12): 2172-2174.
- Moulin, C., J. Wei, P. V. Iseghem, I. Laszak, G. Plancque and V. Moulin (1999). "Europium complexes investigations in natural waters by time-resolved laser-induced fluorescence." *Analytica Chimica Acta* **396**(2-3): 253.
- Moulin, C., Decambox, P., Mauchien, P., Moulin, V., Theyssier, M.(1991)."On the use of TRLIF for interaction studies between organic matters and actinides: application to Cm." *Radiochim. Acta* **58/89**:119
- Moulin, V., Tits, J., Moulin, C., Decambox, P., Mauchien, P., De Ruty, O.(1992) "Complexation behaviour of humic substances towards An and Ln studied by Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence." *Radiochimica Acta* **58/59**: 121-128.
- Moulin, V., Moulin, C., Dran, J.C (1996). "Role of humic substances and colloids in the behavior of radiotoxic elements in relation to nuclear waste disposal." ACS symposium series, Chap 16259-271
- Moulin, V., Moulin, C; (1995). "Fate of actinides in the presence of humic substances under conditions relevant to nuclear waste disposal." *Applied Geochemistry* **10**,573
- Nash, K. L. and G. R. Choppin (1980). "Interaction of humic and fulvic acids with Th(IV)." *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* **42**: 1045-1050.
- Nederlof, M. M., J. C. M. Dewit, W. H. Vanriemsdijk and L. K. Koopal (1993). "Determination of Proton Affinity Distributions for Humic Substances." *Environmental Science & Technology* **27**(5): 846-856.
- Norden, M., J. H. Ephraim and B. Allard (1993). "The binding of strontium and europium by an aquatic fulvic acid - ion exchange distribution and ultrafiltration studies." *Talanta* **40**: 1425-1432.
- Nyhan, J. W., B. J. Drennon, W. V. Abeele, M. L. Wheeler, W. D. Purtymun, G. Trujillo, W. J. Herrera and J. W. Booth (1985). "Distribution of Plutonium and Americium beneath a 33-Yr-Old Liquid Waste-Disposal Site." *Journal of Environmental Quality* **14**(4): 501-509.
- Oste, L. A., E. J. M. Temminghoff, T. M. Lexmond and W. H. Van Riemsdijk (2002). "Measuring and Modeling zinc and cadmium binding by humic acid." *Analytical Chemistry* **74**(4): 856-862.
- Panak, P., R. Klenze and J. I. Kim (1996). "A study of ternary complexes of Cm(III) with humic acid and hydroxyde or carbonate in neutral pH range by time resolved laser fluorescence spectroscopy." *Radiochimica Acta* **74**: 141-146.
- Parkhurst, D. L. and C. A. J. Appelo (1999). User's guide to PHREEQC (version 2) - a computer program for speciation, batch-reaction, one-dimensional transport, and inverse geochemical calculations. Lakewood, Colorado, USA, U.S. Geological Survey, Water-Resources Investigations.
- Parthasarathy, N., M. Pelletier and J. Buffle (2003). "The use of Permeation Liquid Membrane (PLM) as an analytical tool for trace metal speciation studies in natural waters." *Journal De Physique Iv* **107**: 1021-1024.
- Penrose, W. R., W. L. Polzer, E. H. Essington, D. M. Nelson and K. A. Orlandini (1990). "Mobility of Plutonium and Americium through a Shallow Aquifer in a Semiarid Region." *Environmental Science & Technology* **24**(2): 228-234.

- Piccolo, A., S. Nardi and G. Concheri (1996). "Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size exclusion chromatography." *Chemosphere* **33**(4): 595-602.
- Pinheiro, J. P., A. M. Mota and M. F. Benedetti (1999). "Lead and calcium binding to fulvic acids: Salt effect and competition." *Environmental Science & Technology* **33**(19): 3398-3404.
- Pinheiro, J. P., A. M. Mota and M. F. Benedetti (2000). "Effect of aluminum competition on lead and cadmium binding to humic acids at variable ionic strength." *Environmental Science & Technology* **34**(24): 5137-5143.
- Pinheiro, J. P., A. M. Mota and H. P. van Leeuwen (1999). "On lability of chemically heterogeneous systems: Complexes between trace metals and humic matter." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **151**(1-2): 181.
- Plancque, G., B. Amekraz, V. Moulin, P. Toulhoat and C. Moulin (2001). "Molecular structure of fulvic acids by electrospray with quadrupole time-of-flight mass spectrometry." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **15**(10): 827-835.
- Plancque, G., Y. Maurice, V. Moulin, P. Toulhoat and C. Moulin (2005). "On the use of spectroscopic techniques for interaction studies, part I: Complexation between Europium and small organic Ligands." *Applied Spectroscopy* **59**(4): 432-441.
- Plancque, G., V. Moulin, P. Toulhoat and C. Moulin (2003). "Europium speciation by time-resolved laser-induced fluorescence." *Analytica Chimica Acta* **478**(1): 11-22.
- Pompe, S., K. Schmeide, M. Bubner, G. Geipel, K. H. Heise, G. Bernhard and H. Nitsche (2000). "Investigation of humic acid complexation behavior with uranyl ions using modified synthetic and natural humic acids." *Radiochimica Acta* **88**(9-11): 553-558.
- Ranville, J. and Schiermund. (1999). General aspects of aquatic colloids in environmental geochemistry, in *Environmental geochemistry of mineral deposits*.
- Ranville, J. F., M. J. Hendry, T. N. Reszat, Q. Xie and B. D. Honeyman "Quantifying uranium complexation by groundwater dissolved organic carbon using asymmetrical flow field-flow fractionation." *Journal of Contaminant Hydrology* **In Press**, **Corrected Proof**.
- Reemtsma, T. and A. These (2005). "Comparative investigation of low-molecular-weight fulvic acids of different origin by SEC-Q-TOF-MS: New insights into structure and formation." *Environmental Science and Technology* **39**(10): 3507-3512.
- Reiller, P. (2005). "Prognosticating the humic complexation for redox sensitive actinides through analogy, using the charge neutralisation model." *Radiochimica Acta* **93**(1): 43-55.
- Rice, J. A. and J. F. MacCarthy (1991). "Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances." *Organic Geochemistry* **17**(5): 635-648.
- Sachs, S., V. Brendler and G. Geipel (2007). "Uranium(VI) complexation by humic acid under neutral pH conditions studied by laser-induced fluorescence spectroscopy." *Radiochimica Acta* **95**(2): 103-110.
- Saito, T., S. Nagasaki, S. Tanaka and L. K. Koopal (2004). "Application of the NICA-Donnan model for proton, copper and uranyl binding to humic acid." *Radiochimica Acta* **92**(9-11): 567-574.
- Saito, T., S. Nagasaki, S. Tanaka and L. K. Koopal (2005). "Electrostatic interaction models for ion binding to humic substances." *Colloids And Surfaces A-Physicochemical And Engineering Aspects* **265**(1-3): 104-113.
- Scapolan, S., E. Ansoborlo, C. Moulin and C. Madic (1998). "Uranium(VI)-transferrin system studied by time-resolved laser- induced fluorescence." *Radiation Protection Dosimetry* **79**(1-4): 505-508.

- Schafer, T., R. Artinger, K. Dardenne, A. Bauer, W. Schuessler and J. I. Kim (2003). "Colloid-borne Americium migration in gorleben groundwater: Significance of iron secondary phase transformation." *Environmental Science & Technology* **37**(8): 1528-1534.
- Schmeide, K., S. Sachs, M. Bubner, T. Reich, K. H. Heise and G. Bernhard (2003). "Interaction of uranium(VI) with various modified and unmodified natural and synthetic humic substances studied by EXAFS and FTIR spectroscopy." *Inorganica Chimica Acta* **351**: 133.
- Seibert, A., A. Mansel, C. M. Marquardt, H. Keller, J. V. Kratz and N. Trautmann (2001). "Complexation behaviour of neptunium with humic acid." *Radiochimica Acta* **89**(8): 505-510.
- Seki, H. and A. Suzuki (1995). "Adsorption Of Heavy-Metal Ions Onto Insolubilized Humic-Acid." *Journal Of Colloid And Interface Science* **171**(2): 490-494.
- Shin, H. S., S. W. Rhee, B. H. Lee and C. H. Moon (1996). "Metal binding sites and partial structures of soil fulvic and humic acids compared: Aided by Eu(III) luminescence spectroscopy and DEPT/QUAT C-13 NMR pulse techniques." *Organic Geochemistry* **24**(5): 523-529.
- Sigg, L., F. Black, J. Buffle, J. Cao, R. Cleven, W. Davison, J. Galceran, P. Gunkel, E. Kalis, D. Kistler, M. Martin, S. Noel, Y. Nur, N. Odzak, J. Puy, W. H. van Riemsdijk, E. Temminghoff, M. L. Tercier-Waeber, S. Toepperwien, R. M. Town, E. Unsworth, K. W. Warnken, L. P. Weng, H. B. Xue and H. Zhang (2006). "Comparison of analytical techniques for dynamic trace metal speciation in natural freshwaters." *Environmental Science and Technology* **40**(6): 1934-1941.
- Slaveykova, V. I., N. Parthasarathy, J. Buffle and K. J. Wilkinson (2004). "Permeation liquid membrane as a tool for monitoring bioavailable Pb in natural waters." *Science of The Total Environment* **328**(1-3): 55.
- Sposito, G. (1989). "Surface-Reactions In Natural Aqueous Colloidal Systems." *Chimia* **43**(6): 169-176.
- Stevenson, F. J. (1982). *Humus chemistry: genesis, composition, reactions.*
- Stumpf, T., A. Bauer, F. Coppin and J. I. Kim (2001). "Time-resolved laser fluorescence spectroscopy study of the sorption of Cm(III) onto smectite and kaolinite." *Environmental Science and Technology* **35**(18): 3691-3694.
- Swift, R. S. (1989). Molecular weight, shape, and size of humic substances by ultracentrifugation. *Humic Substances II: In search of structure.* Chichester, editors John Wiley & Sons: 467 - 495.
- Takahashi, Y. and Y. Minai (2004). "The effect of Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and Ca<sup>2+</sup> ions on the formation of Eu(III)-humate complex." *Journal of Nuclear and Radiochemical Sciences* **5**(2): 37 - 44.
- Temminghoff, E. J. M., A. C. C. Plette, R. Van Eck and W. H. Van Riemsdijk (2000). "Determination of the chemical speciation of trace metals in aqueous systems by the Wageningen Donnan Membrane Technique." *Analytica Chimica Acta* **417**(2): 149-157.
- Templeton, D. M., F. Ariese, R. Cornelis, L. G. Danielsson, H. Muntau, H. P. Van Leeuwen and R. Lobinski (2000). "Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000)." *Pure And Applied Chemistry* **72**(8): 1453-1470.

- Thomason, J. W., W. Susetyo and L. A. Carreira (1996). "Fluorescence studies of metal humic complexes with the use of lanthanide ion probe spectroscopy." *Applied Spectroscopy* **50**(3): 401-408.
- Thouvenot, P., S. Hubert, C. Moulin, P. Decambox and P. Mauchien (1993). "Americium Trace Determination in Aqueous and Solid Matrices by Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence." *Radiochimica Acta* **61**(1): 15-21.
- Thurman, E. M. (1985). *Organic Chemistry of Natural Waters*, Nijhoff/Junk, The Hague.
- Tipping, E. (1998). "Humic Ion-binding Models VI: an improved description of the interactions of protons and metal ions with humic substances." *Aquatic Geochemistry* **4**: 3 - 48.
- Tipping, E. (2002). *Cation binding by humic substances*, Cambridge Environmental Chemistry Cambridge University Press.
- Torres, R. A. and G. R. Choppin (1984). "Europium(III) and Americium(III) Stability constants with Humic Acid." *Radiochimica Acta* **35**: 143-148.
- van Leeuwen, H. P., R. M. Town, J. Buffle, R. Cleven, W. Davison, J. Puy, W. H. van Riemsdijk and L. Sigg (2005). "Dynamic speciation analysis and bioavailability of metals in aquatic systems." *Environmental Science and Technology* **39**(22): 8545-8556.
- Vandenhove, H., K. Antunes, J. Wannijn, L. Duquene and M. Van Hees (2007). "Method of diffusive gradients in thin films (DGT) compared with other soil testing methods to predict uranium phytoavailability." *Science Of The Total Environment* **373**(2-3): 542-555.
- Vercouter, T., P. Vitorge, N. Trigoulet, E. Giffaut and C. Moulin (2005). " $\text{Eu}(\text{CO}_3)_3^{3-}$  and the limiting carbonate complexes of other  $\text{M}^{3+}$  f-elements in aqueous solutions: a solubility and TRLFS study." *New Journal of Chemistry* **29**(4): 544-553.
- Virchenko, Y. P. and G. I. Agapkina (1993). "Organic Radionuclide Compounds In Soils Surrounding The Chernobyl Nuclear-Power-Plant." *Eurasian Soil Science* **25**(12): 51-59.
- Weber, T., T. Allard and M. F. Benedetti (2006). "Iron speciation in interaction with organic matter: Modelling and experimental approach." *Journal of Geochemical Exploration* **88**(1-3): 166-171.
- Weber, T., T. Allard, E. Tipping and M. F. Benedetti (2006). "Modeling Iron Binding to Organic Matter." *Environmental Science and Technology* **40** (24): 7488-7493.
- Weng, L., E. J. M. Temminghoff and W. H. Van Riemsdijk (2001). "Determination of the free ion concentration of trace metals in soil solution using a soil column Donnan membrane technique." *European Journal Of Soil Science* **52**(4): 629-637.
- Weng, L. P., T. M. Lexmond, A. Wolthoorn, E. J. M. Temminghoff and W. H. Van Riemsdijk (2003). "Phytotoxicity and bioavailability of nickel: Chemical speciation and bioaccumulation." *Environmental Toxicology And Chemistry* **22**(9): 2180-2187.
- Weng, L. P., E. J. M. Temminghoff, S. Lofts, E. Tipping and W. H. Van Riemsdijk (2002). "Complexation with dissolved organic matter and solubility control of heavy metals in a sandy soil." *Environmental Science and Technology* **36**(22): 4804-4810.
- Weng, L. P., E. J. M. Temminghoff and W. H. Van Riemsdijk (2002). "Aluminum speciation in natural waters: measurement using Donnan membrane technique and modeling using NICA-Donnan." *Water Research* **36**(17): 4215-4226.
- Weng, L. P., W. H. Van Riemsdijk and E. J. M. Temminghoff (2005). "Kinetic aspects of donnan membrane technique for measuring free trace cation concentration." *Analytical Chemistry* **77**(9): 2852-2861.

- Wershaw, R. L. (1993). "Model for humus." *Environmental Science and Technology* **27**(5): 814-816.
- Westall, M. L., J. D. Jones, G. D. Turner and J. M. Zachara (1995). "Models for the association of metal ions with heterogeneous environmental sorbents. 1. Complexation of Co(II) by Leonardite humic acid as a function of pH and NaClO<sub>4</sub> concentration." *Environ.Sci.Technol.* **29**: 951-959.
- Wimmer, H., J. I. Kim and R. Klenze (1992). "A direct speciation of Cm(III) in natural aquatic systems by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS)." *Radiochimica Acta* **58/59**: 165-171.
- Wimmer, H., R. Klenze and J. Kim, I., (1992). "A study of reaction of hydrolysis of curium (III) by time-resolved laser fluorescence spectroscopy." *Radiochimica Acta* **56**: 7983.
- Wolf, M., G. Buckau and S. Geyer (2004). Isolation and characterization of new batches of Gohy-573 humic and fulvic acids. Humic Substances in Performance Assessment of Nuclear Waste Disposal: Actinide and Iodine Migration in the Far-Field. Second Technical Progress Report <<http://bibliothek.fzk.de/zb/berichte/FZKA6969.pdf>>. G. Buckau. Karlsruhe: 111-124.
- Zeh, P., K. R. Czerwinski and J. I. Kim (1997). "Speciation of uranium in Gorleben groundwaters." *Radiochimica Acta* **76**(1-2): 37-44.
- Zhang, H. and W. Davison (1999). "Diffusional characteristics of hydrogels in DGT and DET techniques." *Analytica Chimica Acta* **398**: 329-340.

## CHAPITRE 1 : THE DONNAN MEMBRANE APPROACH : FROM EQUILIBRIUM TO DYNAMIC SPECIATION

*Laura Marang<sup>a,b</sup>, Pascal Reiller<sup>a</sup>, Monique Pepe<sup>b</sup>, Marc F. Benedetti<sup>b\*</sup>*

<sup>a</sup>CEA Saclay, Nuclear Energy Division, DPC/SECR, Laboratoire de Spéciation des Radionucléides et des Molécules, BP 11, 91191 Gif sur Yvette, France

<sup>b</sup>Laboratoire de Géochimie des Eaux, Université Paris 7, UMR CNRS 71574 and IPGP, Case Postale 7052, 75251 Paris Cedex 05, France

*Environmental Science & Technology* **40**(17): 5496-5501 (2006)

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Introduction</b>                                       | <b>73</b> |
| <b>Theoretical Basis</b>                                  | <b>74</b> |
| <b>Experimental Section</b>                               | <b>80</b> |
| <i>The Flux Donnan Membrane system</i>                    | 80        |
| <i>Calibration of the system for magnesium and cobalt</i> | 81        |
| <i>Validation of the procedure</i>                        | 82        |
| <i>Cobalt complexation by HS</i>                          | 82        |
| <b>Results and discussion</b>                             | <b>83</b> |
| <i>Calibration of the system for magnesium and cobalt</i> | 83        |
| <i>Validation of the procedure</i>                        | 86        |
| <i>Adsorption Isotherm for cobalt with Gorleben HA</i>    | 87        |



## RESUME

La toxicité d'un ion métallique n'est pas simplement liée à sa concentration totale mais à la concentration du métal libre ou labile en solution. La Donnan Membrane Technique (DMT) permet la concentration en métal libre en solution. Cependant, cette méthode a deux principales limites : une haute limite de détection et un temps de mesure relativement long. Nous avons développé la Flux Donnan Membrane (FDM) qui est une approche dynamique de la DMT avec une amélioration de la limite de détection et une réponse plus rapide du système. Nous avons montré que des calibrations expérimentales du transport de l'ion métallique dans la FDM peuvent être utilisées pour obtenir la concentration en métal libre lorsque le transport est contrôlé par la diffusion en solution ou dans la membrane. En effet, en fonction de la force ionique, de la concentration en ligand et en métal ainsi qu'en fonction de la charge du cation, le transport du cation peut être contrôlé par le transport en solution ou dans la membrane. Il est également essentiel de tenir compte de la labilité du complexé étudié dans une technique de spéciation dynamique. Lorsque le complexe métal-SH est labile et si le flux du métal est contrôlé par la diffusion en solution, alors la concentration mesurée ne correspond pas uniquement à la concentration du métal libre mais également à la concentration en complexe labile. Le paramètre de labilité calculé pour le complexe Mg-EDTA et Co-SH montre que ces deux complexes peuvent être considérés comme inertes, la concentration mesurée par la FDM correspond à la concentration en métal libre quel que soit le contrôle du transport. L'approche expérimentale de la FDM a été validée en comparant la concentration en  $Mg^{2+}$  libre mesurée par FDM à celle calculée par un logiciel de spéciation, ECOSAT pour des expériences de complexation couvrant une large gamme de concentrations en magnésium et en EDTA. La FDM a été utilisée afin de mesurer les isothermes de complexation du  $Co^{2+}$  complexé à un acide humique pour une grande gamme de concentrations et de pH.



## ABSTRACT

Metal ion toxicity is not simply related to the total concentration but to the free or labile metal ion concentration. One of the techniques that can measure the free metal ion concentration is the Donnan Membrane Technique (DMT). However, this method has limitations in terms of a relatively high detection limit (in relation to typical environmental concentrations) and a long equilibration time. We have therefore developed the Flux Donnan Membrane Technique (FDM) which is a dynamic modification of the standard DMT with improved detection limits and a more rapid response. We show that experimental calibrations of metal ion transport in the FDM can be used to measure  $[M]_{\text{free}}$  under conditions of either solution-controlled or membrane-controlled diffusive- transport. The FDM was used to measure cobalt binding isotherms by a humic substance over a large range of free Co concentrations and pH.

***Acknowledgment.*** This work was financed through “FUNMIG project” (EC: FUNMIG-NUWASTE-2004-3.2.1.1-1), and the MRTRA project of the Risk Control Domain of CEA (CEA/DEN/DDIN). The authors would like to thank Dr. L.P. Weng for helpful discussions, and Mr. Dominique Lavergne for his technical support. The authors would like to acknowledge the very useful comments of the 3 reviewers which improved the present manuscript as well as Dr. D Kinniburgh for polishing our “Frenglish”.

## Introduction

Metals exist in the environment in various chemical forms namely as solids (particles and colloids) and as dissolved species. Dissolved species include both free metal ions and complexes with inorganic and organic ligands. Humic substances (HS) represent up to 70% of the natural organic matter (Tipping, 2002) and play a key role in metal ion behavior in the environment because of their ability to complex metal ions and thus to partly control metal ion concentrations in soils and aquifers (Buffle, 1988). A knowledge of the complexation of metals with HS is required to understand pollutant behavior in the environment and, particularly in the case of radioactive waste disposal, to understand radionuclide transport from a source to the biosphere. Despite the large number of studies on this topic, only a few datasets are available for radionuclide binding to humic and fulvic acids (HA, FA) that can describe complexation over a wide range of free metal ion concentrations ( $[M]_{\text{free}}$ ) and pH and which also consider competition with major cations (Milne et al., 2003). This is partly due to the limited number of methods available to measure free metal ion concentrations in the presence of humic substances.

The concentrations of free metal ions and that of any labile metal complexes are key parameters for determining metal ion bioavailability. It is therefore necessary to have a technique which measures  $[M]_{\text{free}}$  as well as the bound metal ion ( $[M]_{\text{bound}}$ ) under a variety of experimental or field conditions. These experimental data are also useful for calibrating models that describe metal HS complexation and for evaluating model predictions in field systems (Tipping, 1998; Kinniburgh et al., 1999).

Various methods have been developed to measure the speciation of metals in the presence of HS (Tipping, 2002; van Leeuwen et al., 2005). Some of these have an analytical signal that is based on a dynamic process, e.g. the diffusive gradient in a thin film technique (DGT) (Davison et al., 1994; Zhang et al., 1999) and stripping voltammetry (Van den Berg, 1991). Other methods depend on the attainment of equilibrium, e.g. the Donnan Membrane Technique (DMT) (Temminghoff et al., 2000) or diffusive equilibration in a thin film technique (DET). Some approaches can function in either a dynamic mode or an equilibrium mode depending on the experimental conditions, e.g. the DMT and the Permeation Liquid Membrane (PLM) technique (Tomaszewski et al., 2003).

The radionuclide  $^{60}\text{Co}$  is present in fluids released from pressurized water reactors (PWRs) and it is also widely used in research and in medical applications. The complexation of cobalt by HS changes its physical–chemical form and may therefore control its transport in the environment. Only two Co-HS datasets cover a sufficiently large range of  $[\text{M}]_{\text{total}}$  and pH (Westall et al., 1995; Glaus et al., 1997) to be generally useful for this type of modeling, but unfortunately both of these show some inconsistencies (Milne et al., 2003). Hence, new experimental data are needed to calibrate models and to predict the influence of the HS complexation on Co speciation. The objectives of this paper are: (i) to develop a method for the determining Co speciation in the presence of HS by modifying the standard DMT approach (Weng et al., 2005), and (ii) to fit these data to the NICA-Donnan Model (Kinniburgh et al., 1999). We call our new approach the Flux Donnan Membrane (FDM) since it is a dynamic version of the standard DMT. We show that experimental calibration of the metal ion transport across the Donnan membrane can be used to estimate the  $[\text{Co}]_{\text{free}}$  which can then be used to estimate the binding isotherms for Co-HA over a large range of  $[\text{Co}]_{\text{free}}$  and pH.

## Theoretical Basis

The theoretical basis for the DMT has been described in detail elsewhere (Temminghoff et al., 2000). It has been developed (Temminghoff et al., 2000) and used for  $[\text{M}]_{\text{free}}$  measurement of divalent cations such as  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  (Weng et al., 2001; Cances et al., 2003). The technique can in principle be applied to all divalent cations. A charged cation exchange membrane is placed between the sample solution (the donor) and a receiving solution (the acceptor). Transport of ions across the membrane is strongly dependent on their electrical charge. The standard DMT measurement is made after equilibrium has been attained which is typically of the order of a few days.

The main limitations of the technique are: (i) a rather long equilibration time (a few days), and (ii) a relatively large detection limit. The detection limit depends on the analytical technique that is used to measure the metal ion concentration on the acceptor side. In order to improve the detection limit, Weng et al. (2005) proposed a modification of the standard DMT which involves adding a strong ligand to the acceptor side in order to increase the amount of free metal ion transported through the membrane (dynamic mode). Weng et al. (2005) discuss the conditions under which either diffusion through the solution film at the solution-membrane interface or

through the membrane becomes the limiting step. They also presented analytical solutions to the transport equations for both of these cases. The  $[M]_{\text{free}}$  concentrations that can be measured using a kinetic approach (based on membrane-controlled transport) are much lower than those based on an equilibrium system (Kalis et al., 2006). Since the value of many of the model parameters underlying the DMT developed by Weng et al. (2005) are not well known, we have developed a new methodology that can be used to derive estimates of these unknown parameters and which lead to a method with a lower detection limit and more rapid throughput.

The FDM system can be represented by 5 zones: (i) bulk solution on the donor side, (ii) a diffusion layer at the donor-membrane interface, (iii) the cation exchange membrane, (iv) a diffusion layer at the membrane-acceptor interface, and (v) the bulk solution in the acceptor (**Figure 1**). There is no concentration gradient in the acceptor or donor bulk solutions because these are kept well-mixed by continuous circulation.

When there is no ligand on the acceptor side and the salt concentration is not very high, the concentration gradient in the membrane (a Donnan phase) for cations is much larger than the concentration gradient in the diffusion layer (Weng et al., 2005; Yezek et al., 2005). Therefore, for cations, diffusion at the membrane-acceptor interface is usually the rate-limiting step under these conditions.



$$J_{i,m} = -D_{i,m} \cdot B^{z_i} \frac{\Delta C_i}{\Delta \delta_m} \quad \text{with} \quad D_{i,m} = \frac{D_i}{\lambda_i} \quad (2),$$

where  $B$  is the Boltzmann factor, which can be calculated from the charge density of the membrane and the ionic strength (Temminghoff et al., 2000),  $C_i$  is the free concentration of ion  $i$  in solution ( $\text{mol L}^{-1}$ ),  $C_{i,tot}$  the total concentration of ion  $i$  in solution ( $\text{mol L}^{-1}$ ),  $D_i$  is the diffusion coefficient of ion  $i$  in water ( $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ),  $D_{i,m}$  the apparent diffusion coefficient on ion  $i$  in the membrane ( $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ),  $\lambda_i$  is the tortuosity factor for ion  $i$  in the membrane,  $J_{i,sol}$  is the flux of ion  $i$  in solution ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),  $J_{i,m}$  the flux of ion  $i$  in the membrane ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),  $z_i$  is the charge of ion  $i$ ,  $\delta$  is the thickness of diffusion layer in solution (m) and  $\delta_m$  is the thickness of the membrane (m).

When the system is far from the Donnan equilibrium,  $[M]_{\text{free}}$  on the acceptor side is much smaller than  $[M]_{\text{free}}$  on the donor side, and so ion transport in the DM can be approximated using the classical linear driving force approximation of equations (1) and (2) as described in detail elsewhere (Weng et al., 2005).

When the transport is controlled by diffusion in solution, the ratio of total metal ion concentration on the acceptor side vs. total concentration on the donor side can be calculated by:

$$\frac{C_{i,tot,acc}}{C_{i,tot,donor}} = A_1 \cdot t \quad \text{with} \quad A_1 = \frac{A_e \cdot D_i}{V_{acc} \cdot \delta} \quad (3),$$

where  $A_e$  is the effective surface area of the membrane ( $\text{m}^2$ ), and  $V_{acc}$  is the volume of the acceptor solution ( $\text{m}^3$ ).

When transport is controlled by diffusion within the membrane, then the ratio of total concentration on the acceptor side vs. the free concentration on the donor side can be calculated by:

$$\frac{C_{i,tot,acc}}{C_{i,donor}} = A_2 \cdot t \quad \text{with} \quad A_2 = \frac{A_e \cdot D_i \cdot B^{z_i}}{V_{acc} \cdot \delta_m \cdot \lambda} \quad (4)$$

In the following, a strong ligand (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) is always added to the acceptor solution. Then the transport is always controlled by either diffusion in the membrane or in the donor solution.

The following relation can be used to compare the flux in solution and in the membrane:

$$\frac{D_i \cdot P_i}{\delta} \cdot \frac{\delta_m}{D_{i,m} \cdot B^{z_i}} = \frac{P_i}{X} \quad \text{with } X = \frac{D_{i,m} \cdot B^{z_i} \cdot \delta}{D_i \cdot \delta_m} \quad (5)$$

Equation (5) suggests that either diffusion in solution or in the membrane can be the rate-limiting step. Increasing  $P_i$  and the background electrolyte concentration, as well as decreasing  $z_i$ , will result in a change from solution-controlled transport towards membrane-controlled transport.

If we stipulate that one flux has to be at least 5 times smaller than the other to be considered the rate limiting flux, then transport is controlled by diffusion in solution when  $P_i < X/5$ , controlled by both when  $X/5 \leq P_i \leq 5X$ , and controlled by diffusion in the membrane when  $P_i > 5X$ . The limiting  $P_i$  values can be calculated for different ionic strengths (**Table 1**). A tortuosity factor ( $\lambda$ ) of 20 has been used for the calculation as proposed by Weng et al. (Weng et al., 2005). The thickness of the solution diffusion layers ( $\delta$ ) on both sides of the membrane was taken as 0.1 mm and the thickness of the membrane ( $\delta_m$ ) was taken as 0.16 mm (Weng et al., 2005). For a given background electrolyte concentration, decreasing the ionic strength results in a change from membrane-controlled transport to solution-controlled transport. The latter increases in importance as the ionic strength decreases (Temminghoff et al., 2000). The ionic strength has to be much higher when using a monovalent electrolyte in order to have a system which is not dominated by diffusion in solution.

**Table 1.** Calculation of the limiting  $P_i$  values ( $P_i = [M]_{\text{total}} / [M]_{\text{free}}$ ) and limiting % of free ion values as a function of ionic strength.

|  | Transport controlled by<br>diffusion in solution: |                 | Transport controlled by<br>diffusion in the membrane: |                 |
|--|---|-----------------|---|-----------------|
|  | $P_i <$   | % of free ion > | $P_i >$   | % of free ion < |
| 2 mM Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>   | 5.4   | 18              | 135   | 0.74            |
| 0.2 mM Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 54  | 0.18            | 1350  | 0.074           |
| 0.1 M KNO <sub>3</sub>                   | 7.6   | 13              | 190   | 0.52            |

In order to be able to apply equations (3) and (4), values of  $A_1$  and  $A_2$ , or the parameters needed to derive them, need to be known. One possibility is to derive the values of  $A_1$  and  $A_2$  from calibration curves that relate the donor-acceptor concentrations as a function of time for the two limiting cases. The first calibration, corresponding to transport controlled by diffusion in solution on the donor side, is done without adding ligand to the donor side, i.e.  $P_i = 1$ . The second calibration, corresponding to transport limited by diffusion in the membrane, is made by adding a high concentration of EDTA to the donor side, i.e.  $P_i \gg 1$ . A strong ligand (EDTA) is always present on the acceptor side.

Knowing  $[M]_{\text{total}}$  and the total ligand concentration in a given system, a preliminary calculation of the speciation can be made. Depending on the ionic strength and the estimated  $[M]_{\text{free}}$  in the sample ( $P_i$  value) (**Table 1**), the appropriate calibration can be used to determine  $[M]_{\text{free}}$  on the donor side from the  $[M]_{\text{total}}$  measured on the acceptor side.

The concept of lability is important for dynamic metal speciation techniques such as FDM. Complexes are labile if the kinetic flux towards an interface, due to the net dissociation of complexed metal ions, is much larger than the diffusive flux of the complex, i.e. diffusion of the metal ion becomes rate determining. Then the thermodynamic equilibrium of the complex dissociation is maintained up to the surface and all the metal is available for uptake. Complexes are inert if they do not have time to dissociate within this time scale and then only the free metal ion is available for uptake. For a given complex, the lability criterion,  $L$  (**Table 2**), represents the ratio of the flux that would result from the kinetically-limited dissociation of the metal complex to that expected when the rate of metal ion transport is purely due to a diffusion-controlled flux. When the transport is controlled by diffusion in solution and if the complex is labile ( $L \gg 1$ ) both labile complexes and the free metal ion will contribute to the flux whereas if the complex is inert ( $L \ll 1$ ) only the free metal ion will contribute. When transport is membrane controlled, then only the free metal ion contributes to the flux (van Leeuwen et al., 2005). The lability parameter (Pinheiro et al., 1999) has to be estimated from a theoretical basis in order to interpret the measured free concentrations.



**Table 2.** Estimates of the Lability criterion ( $L^*$ ) for different experimental conditions under the assumption of homogeneous behavior.

| <b>Ligand</b>              | EDTA                | EDTA                | HA      |
|----------------------------|---------------------|---------------------|---------|
| <b>Metal</b>               | Mg                  | Mg                  | Co      |
| <b>[L]<sub>Total</sub></b> | 50 $\mu$ M          | 500 $\mu$ M         | 50 mg/L |
| <b>[M]<sub>Total</sub></b> | 100 $\mu$ M         | 10 mM               | 0.1 mM  |
| <b>Log K</b>               | 10.5                | 10.5                | 5-6     |
| <b>L</b>                   | $2.7 \cdot 10^{-3}$ | $6.8 \cdot 10^{-3}$ | 1-10    |

\*Value of  $L \gg 1$  indicates that the complexes are labile;  $L \ll 1$  indicate that the complexes are inert.

$L = \frac{k_w^{-1/2} \delta}{C^{1/2} D^{1/2} K}$  with  $D$  = diffusion coefficient of the metal-ligand complex = diffusion

coefficient of the metal/10;  $C$  = free ligand concentration;  $k_w$  = water loss rate constant ( $3 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ ,  $2 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$  for Mg and Co, respectively (Morel, 1983));  $K$  = stability constant for Mg-EDTA (Stumm et al., 1996) or Co-HA (Van Loon et al., 1992; Slaveykova et al., 2004)).

## Experimental Section

### *The Flux Donnan Membrane system*

The design of the cation exchange cell was described by Temminghoff et al. (Temminghoff et al., 2000). In the cell, a cation exchange membrane is used to separate the substrate solution (the donor) from a salt solution (the acceptor). This cation exchange membrane (BDH, Laboratory Supplies) consists of a matrix of polystyrene and divinylbenzene. The sulfonic acid groups are fully deprotonated at  $\text{pH} > 2$ . Its ion exchange capacity and thickness are given by the supplier as  $0.8 \text{ meq} \cdot \text{g}^{-1}$  and  $0.16 \pm 0.1 \text{ mm}$ , respectively. The area of the membrane used in the FDM device is  $7 \text{ cm}^2$ . The reagents used were  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$  (Normapur, Prolabo),  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  (Normapur, Prolabo),  $\text{KNO}_3$  (Panreac), EDTA (Aldrich) and water (Milli Q, Millipore).

The membranes were preconditioned by first soaking in 0.1 M HNO<sub>3</sub> to remove trace metal impurities. Then they were then washed with a solution of either 1 M Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> or 1 M KNO<sub>3</sub> depending on the background electrolyte to be used. A divalent cation was used in the background electrolyte in order to keep the electrostatic potential of the membrane more or less constant. Magnesium was chosen to avoid interference during Co measurement by ICP-MS. The selected background electrolyte was 0.1 M KNO<sub>3</sub> or 2 mM Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> for the Mg and Co experiments, respectively. Finally, the membranes were soaked in the actual background electrolyte to be used. All cells, bottles and tubes were washed with 0.1 M HNO<sub>3</sub> and rinsed with water (Milli Q).

Both donor and acceptor solutions were circulated at a constant rate of 2.5 mL.min<sup>-1</sup>. The acceptor and donor volumes were 25 mL and 200 mL, respectively. The pH was measured using a HANNA pH electrode and was calibrated with N.I.S.T standards buffers pH (4.008, 6.986, and 9.933). The pH of the solutions were adjusted ( $\pm 0.05$  pH) with HNO<sub>3</sub> and freshly prepared KOH. Solutions were buffered at pH 6 using 5.10<sup>-3</sup> M MES (2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid) (Sigma) and at pH 8 using 5.10<sup>-3</sup> M HEPES (N-piperazine-N'-[2-ethane sulfonic acid]) (Sigma).

Aliquots of donor and acceptor solutions were sampled, acidified with HNO<sub>3</sub> (Suprapur, Prolabo) and analyzed for Co either with an inductively coupled plasma–mass spectrometer (Plasmaquad PQ2+ (VG instrument) having a detection limit of 5x10<sup>-9</sup> M, or with an ELC (Extended Lifetime Cuvette) graphite furnace atomic absorption spectrometer at 240.7 nm having a detection limit of 10<sup>-8</sup> M. The Mg analysis was carried out by flame atomic absorption spectroscopy at 285.2 nm with a detection limit of 10<sup>-6</sup> M (Unicam Solaar M6).

### ***Calibration of the system for magnesium and cobalt***

The FDM was initially calibrated when transport on the donor side was dominated either by diffusion in solution (Case 1) or by diffusion in the membrane (Case 2) (**Table 3 a**). In Case 1, the calibration was performed with a high concentration of EDTA on the acceptor side. In Case 2, a high concentration of EDTA was present on both sides of the membrane. The EDTA controls the metal speciation on both sides. The EDTA concentrations were chosen to give the desired free ion concentrations and were calculated for the two limiting cases ( **Table 1**). The influence of pH and [Co] on the donor side and on the calibrations curves was also checked.

In Case 1, the acceptor and donor solutions were sampled every 10, 20, 30, 40, 60, 80 min for both ions. In Case 2, they were sampled every 10, 20, 30, 40 min, 1, 2, 3, 4 hours for Mg and every 16, 20, 30, 40, 60, 80 hours for Co.

### **Validation of the procedure**

In order to test the validity of the method, Mg complexation with EDTA was measured at pH 6 with  $[Mg]_{free}$  ranging from  $10^{-7}$  to  $10^{-2}$  M on the donor side. The  $[Mg]_{free}$ , measured with the appropriate calibration, was then compared with the  $[Mg]_{free}$  calculated with a chemical speciation program, namely ECOSAT (Keizer et al., 1994).

Two experiments were made to measure Mg complexation by EDTA (**Table 3b**). Expt 1 and Expt 2 correspond to high and low  $[Mg]_{free}$  in solution, respectively. The pH was adjusted to  $pH\ 6.00 \pm 0.05$ . The acceptor solution contained 50 mM EDTA. Donor and acceptor sides were sampled every 30 min (calibration 1) for Expt 1, and every 1-3 hours for Expt 2.

**Table 3.** Experimental conditions of the FDM: (a) for the Co and Mg calibrations for solution-controlled diffusion (Case 1) and for membrane-controlled diffusion (Case 2);(b) for the validation of the methodology: Expt 1 corresponds to a high free Mg concentration in solution while Expt 2 corresponds to low free Mg concentration.

| (a)                            | Mg: Case 1             | Mg: Case 2             | Co: Case 1                            | Co: Case 2                           |
|--------------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| [EDTA] in Donor                | 0                      | 5 mM                   | 0                                     | 50 $\mu$ M                           |
| [EDTA] in Acceptor             | 5mM                    | 50 mM                  | 5 $\mu$ M                             | 5 $\mu$ M                            |
| Background Electrolyte         | 0.1 M KNO <sub>3</sub> | 0.1 M KNO <sub>3</sub> | 2mM Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 2mMMg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> |
| [M <sub>Total</sub> ] in donor | $10^{-4}$ M            | $10^{-4}$ M            | $10^{-5}$ , $10^{-7}$ M               | $5 \cdot 10^{-5}$ M                  |
| pH                             | 6                      | 6                      | 4, 6, 8                               | 6                                    |

| (b)    | [EDTA] in the donor side | [Mg total] in the donor side |
|--------|--------------------------|------------------------------|
| Expt 1 | 50 $\mu$ M               | 10-100 $\mu$ M               |
|        | 500 $\mu$ M              | 1-10 mM                      |
| Expt 2 | 1 mM                     | 10-100 $\mu$ M               |
|        | 50 mM                    | 100 $\mu$ M-2 mM             |

### ***Cobalt complexation by HS***

The humic acid used in this experiment was extracted from one of the deep groundwaters in the Gorleben area (Gohy-573, Germany). Its isolation, purification, and characterization are described in detail elsewhere (Wolf et al., 2004). A stock solution of 1 g/L was prepared and stored for 12 hours at pH 10.

The binding isotherms were first measured and then the ability of the FDM to measure low  $[M]_{\text{free}}$  was checked. The measured  $[\text{Co}]_{\text{free}}$  was compared with  $[\text{Co}]_{\text{free}}$  calculated using parameters derived from an analysis of the isotherms.

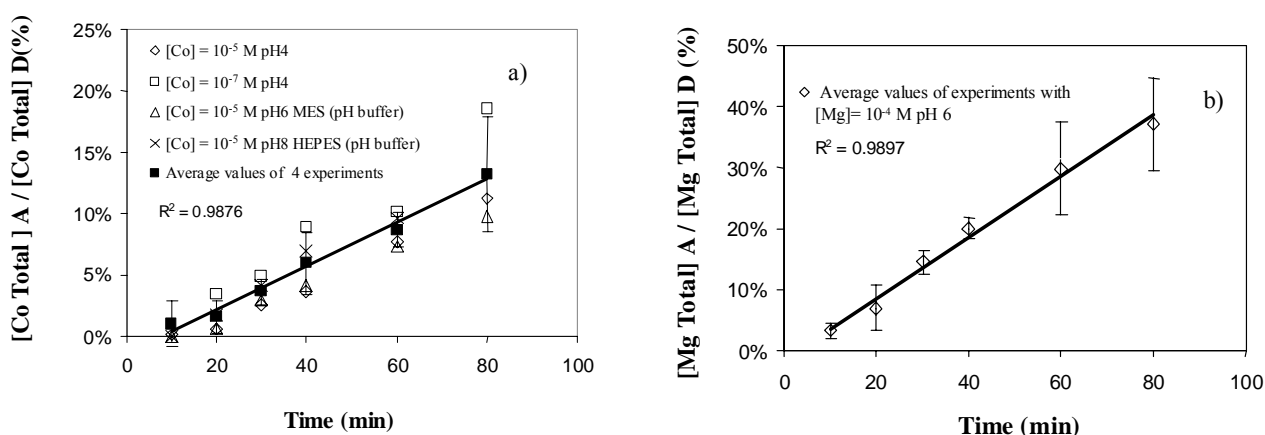
In the first experiment, the donor side consisted of 50 mg/L of HA with  $[\text{Co}]_{\text{total}}$  ranging from  $8.10^{-7}$  M to  $4.10^{-4}$  M. The acceptor solution was 5  $\mu\text{M}$  EDTA. The donor and acceptor sides were sampled after 30 min and calibration 1 used. The binding isotherms were measured at pH 4, 6 and 8. Cobalt was always added to the HA-containing solution to prevent precipitation of  $\text{Co}(\text{OH})_2(\text{s})$  (Wollery, 1992), particularly at pH 8.

In the second experiment, the donor solution contained 650 mg/L HA with  $[\text{Co}]_{\text{total}}$  ranging from  $1.10^{-8}$  M to  $5.5.10^{-8}$  M. The acceptor side contained 5  $\mu\text{M}$  EDTA. The donor and acceptor sides were sampled after 48 hours. Calibration curve 2 was used. The pH was fixed at  $\text{pH } 6.00 \pm 0.05$ .

## **Results and discussion**

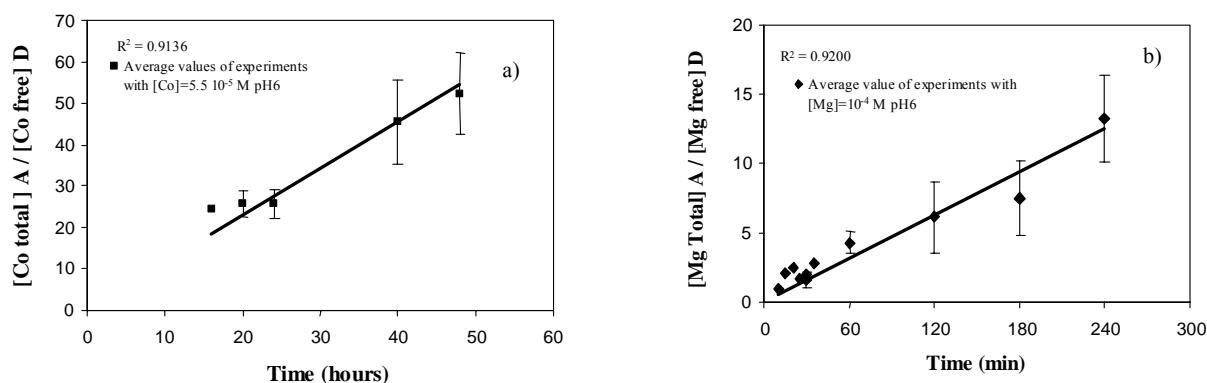
### ***Calibration of the system for magnesium and cobalt***

Calibrations curves for Cases 1 and 2 are shown in **Figures 2 and 3**, respectively. The  $[M]_{\text{free}}$  on the donor side can be directly obtained from the measured  $[M]_{\text{total}}$  in the acceptor solution for Case 1 (Equation 3) because there is no ligand in the donor solution ( $[M]_{\text{free}} = [M]_{\text{total}}$ ). In Case 2 (Equation 4), the  $[M]_{\text{free}}$  on the donor side can be related to the measured  $[M]_{\text{total}}$  in the acceptor solution after calculating the Co and Mg speciation on the donor side using the measured Co and Mg binding and the acidity constants for EDTA (Lindsay, 1979; Stumm et al., 1996).



**Figure 2.** Case 1 - Experimental calibration curves for (a) Co and (b) Mg. Both show the variation of the ratio (total concentration of the metal in the acceptor (A) / total metal concentration in the donor (D) ) as a function of time. The background electrolyte was 0.1M  $\text{KNO}_3$  or 2 mM  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  for Mg and Co, respectively. Both experiments were duplicated.

As expected from theory, the ratio of total/free is a linear function of time. There is no evidence of a pH buffer influence on the flux through the membrane (**Figure 2a**). The flux is also independent of the initial concentration of metal in the donor solution (**Figure 2a**). The y intercept is not zero for short times (**Figure 2**) but it is close to zero for longer times (**Figure 3**). This can be related to the time taken for the initial accumulation of metal in the membrane. The time to attain the steady-state is 5 min (Figure 1). The time to accumulate the data is always chosen much higher than this time in order to correctly represent the steady-state flux.



**Figure 3.** Case 2 - Experimental calibration curves for (a) Co and (b) Mg. Both show the variation of the ratio (total concentration of the metal in the acceptor side(A) / free concentration in the donor side (D)) as a function of time. The background electrolyte was 0.1M  $\text{KNO}_3$  or 2 mM  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  for Mg and Co, respectively. Both experiment were duplicated.

The theoretical values of the slopes  $A_1$  and  $A_2$  corresponding to the two limiting cases have been calculated using an effective surface area  $A_e$  of 20% of the initial value ( $7 \text{ cm}^2$ ) (Weng et al., 2005) (**Table 4**). The diffusion coefficients in water for Co and Mg were assumed to be  $0.732 \cdot 10^{-5}$  and  $0.706 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , respectively (R.Lide, 2004-2005).

A comparison between the theoretical and experimental  $A_1$  values shows good agreement for Co but not for Mg (**Table 4**) given these parameters. The use of  $\text{KNO}_3$  as background electrolyte may affect the effective surface area. Divalent ions are accumulated to a greater extent in the membrane than monovalent ions (Temminghoff et al., 2000). Better agreement between experimental and theoretical values can be obtained if the effective surface  $A_e$  is increased to 40% of the initial value. This value is therefore used to calculate the theoretical slope for Mg in Case 2. The tortuosity factor is a variable parameter in the calculation of  $A_2$  and so the calculations have been carried out with different values (i.e. 20 and 60). The fit was best using a factor of 60 (**Table 4**). This value is within the range (10 to 60). found by Weng et al. (Weng et al., 2005). The good agreement between theoretical and experimental slopes confirms that the transport is controlled either by diffusion in solution (Case 1) or by diffusion in the membrane (Case 2).

**Table 4.** Comparison between the experimental and theoretical slopes ( $A_1$  and  $A_2$ ) for the two calibration curves\*.

|           | Case 1: $A_1$ value ( $s^{-1}$ ) |  | Case 2: $A_2$ value ( $s^{-1}$ ) |   |
|-----------|----------------------------------|--|----------------------------------|---|
|           | Experimental                     | Theoretical                            | Experimental                     | Theoretical                             |
| Cobalt    | $3.0 \pm 0.5 \cdot 10^{-5}$      | $4.1 \cdot 10^{-5}$                    | $3.1 \pm 0.2 \cdot 10^{-4}$      | $1.12 \cdot 10^{-3}$ ( $\lambda = 20$ ) |
|           |                                  |  |                                  | $3.74 \cdot 10^{-4}$ ( $\lambda = 60$ ) |
| Magnesium | $8.3 \pm 1.2 \cdot 10^{-5}$      | $3.95 \cdot 10^{-5}$ (ES= 20% of i.v.) | $8.7 \pm 1.1 \cdot 10^{-4}$      | $3.03 \cdot 10^{-3}$ ( $\lambda = 20$ ) |
|           |                                  | $7.91 \cdot 10^{-5}$ (ES= 40% of i.v.) |                                  | $1.01 \cdot 10^{-3}$ ( $\lambda = 60$ ) |

\*ES = effective surface; i.v. = initial value;  $\lambda$  = tortuosity factor.

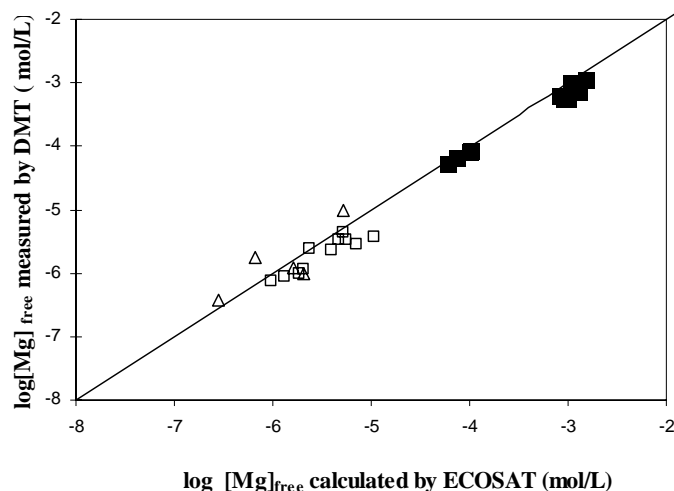
The  $[M]_{\text{total}}$  measured on the acceptor side can be related to the  $[M]_{\text{free}}$  on the donor side using the calibrations curves. The calibrations can be used to choose the time at which to take samples: it can either be reduced (after 30 min, 5% of free Co is on the acceptor side in Case 1), or free Co can be allowed to accumulate on the acceptor side, lowering the detection limit. For example, after 48 hours, the  $[Co]_{\text{free}}$  on the acceptor side will have increased by a factor of 52.

### **Validation of the procedure**

In order to validate the proposed approach, the  $[Mg]_{\text{free}}$  concentrations calculated with ECOSAT were compared with the measured values (**Figure 4**) based on the appropriate calibration curve. The calculated lability (**Table 2**) indicated that inert behavior was expected under these experimental conditions and that only  $[Mg]_{\text{free}}$  should contribute to the flux. The measured concentrations are in good agreement with the calculated concentrations in both cases. The  $[Mg]_{\text{free}}$  was between 80% and 97% of the  $[Mg]_{\text{total}}$  in Expt 1 and between 0.16 % and 10% of the  $[Mg]_{\text{total}}$  in Expt 2.

The limitations of the procedure are: (i) it is difficult to know exactly which diffusion mechanism actually controls the whole process and thus which calibration to use; (ii) the correctness of the calibration depends both on the acidity constants of the ligand and the metal-ligand complexation constants. Nevertheless, the FDM approach can reduce the experimental

time required considerably (30 min instead of 2 days), and also allows much lower detection limits for the  $[M]_{\text{free}}$  to be achieved.



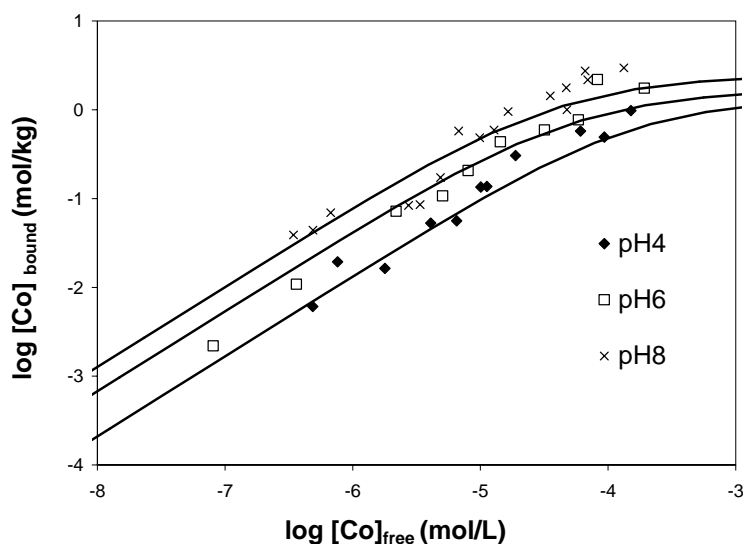
**Figure 4.** Plot of  $\log [Mg]_{\text{free}}$  measured by FDM vs.  $\log [Mg]_{\text{free}}$  calculated by ECOSAT, showing the calculated concentration vs. the measured concentration using the kinetic DMT (FDM) approach: (■) corresponds to calibration 1; (□, Δ) correspond to calibration 2: □, Δ are for sampling after one hour and three hours, respectively, in order to determine the free Mg concentration on the donor side.

### **Adsorption Isotherm for cobalt with Gorleben HA**

**Figure 5** shows the experimental data (log-log plot of the  $[Co]_{\text{bound}}$  vs.  $[Co]_{\text{free}}$ ) obtained by the FDM for pH values of 4, 6 and 8. The experimental data have been obtained using the first calibration procedure because transport is likely to be controlled by diffusion in solution under these conditions. Both  $[M]_{\text{free}}$  and the potentially labile complex contribute to the overall flux. The lability of HS follows the same trends as in better-defined systems, in particular, its dependence on the metal involved. The heterogeneity of the HS results in a multiplicity of potential complexes (Buffle, 1988). Consequently the lability depends on the metal to ligand ratio (Buffle, 1988; Sekaly et al., 1999), on pH (Rocha et al., 1997) and on the degree of heterogeneity (Pinheiro et al., 1999). The lability criterion was estimated under the experimental conditions using the definition for a homogeneous system (**Table 2**). The Co-HA complex seems to be semi-labile ( $L > 1$ ). However, for heterogeneous systems like HS the lability criterion is always much smaller than for the homogeneous case under similar experimental conditions, i.e. 15-20 times smaller (Pinheiro et al., 1999).



We consider that Co-HA complexes are inert under the present experimental conditions due to the well-known high degree of chemical heterogeneity of HS (Tipping, 1998; Kinniburgh et al., 1999).



**Figure 5.** Co adsorption isotherms ( $\log [Co]_{\text{bound}}$  vs.  $\log [Co]_{\text{free}}$ ) with Gorleben HA (50 mg/L) at pH 4, 6 and 8. The background electrolyte was 2 mM  $Mg(NO_3)_2$ . The points are the experimental data and the lines are the NICA-Donnan model fits.

As for other divalent cations,  $Co^{2+}$  binding is pH dependent, with more Co bound at higher pH (Kinniburgh et al., 1999). However the pH effect seems smaller compared with other divalent ions. For instance a  $\Delta pH$  of 1 corresponds, at a given  $[M]_{\text{free}}$ , to a  $\Delta \log[M]_{\text{bound}}$  of 0.25 for Co whereas it corresponds to a  $\Delta \log[M]_{\text{bound}}$  of 1 and 1.5 for Cd and Cu, respectively (Kinniburgh et al., 1999). This effect has also been noted by others (Westall et al., 1995; Glaus et al., 1997).

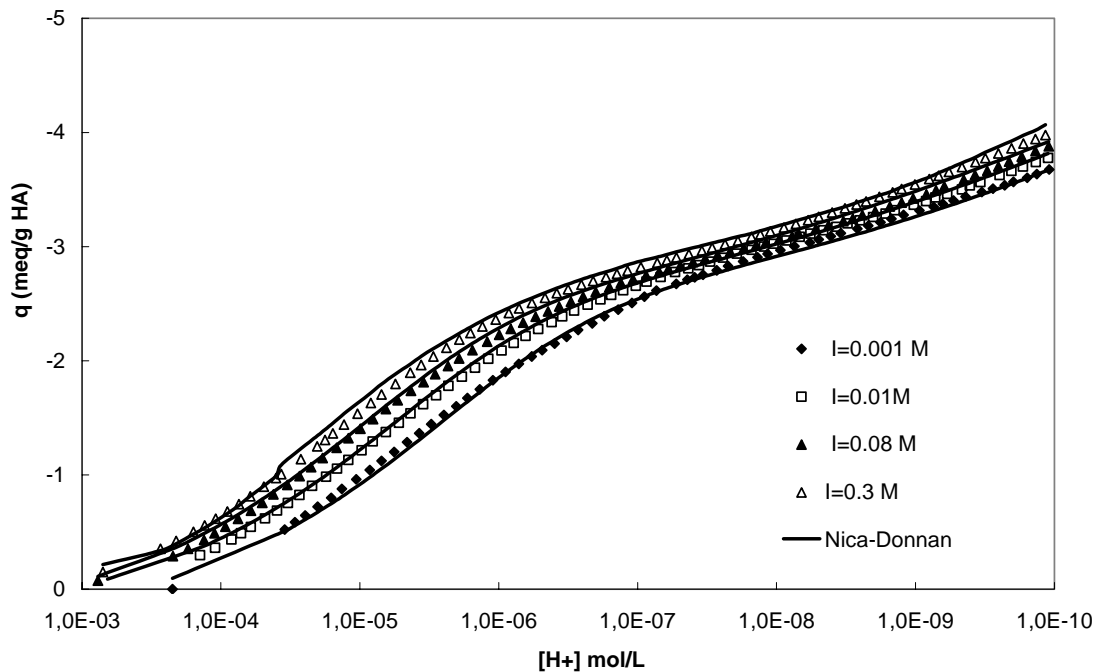
**Table 6.** Nica-Donnan model parameters used for the description of cobalt and magnesium binding isotherms.

|                        | $Q_{Max}$ | $\log K_H$ | $n_H$ | $p$  | $\log K_{Mg}^a$ | $n_{Mg}^a$ | $\log K_{Co}$ | $n_{Co}$ |
|------------------------|-----------|------------|-------|------|-----------------|------------|---------------|----------|
| Carboxylic-type groups | 2.63      | 4.11       | 0.8   | 1    | -0.6            | 0.77       | 2.5           | 0.9      |
| Phenolic-type groups   | 3.08      | 8.92       | 0.65  | 0.41 | 0.6             | 0.59       | 3.5           | 0.9      |

<sup>a</sup> parameters proposed by Milne et al. (2003)

Modeling Co binding to Gorleben HA was carried out using the NICA-Donnan model (Kinniburgh et al., 1999) which has been used previously to describe extensive data sets for proton and metal binding to HS (Milne et al., 2001; Milne et al., 2003). Site density ( $Q_{max}$ ) and proton parameters (non ideality parameter  $n_H$  and median affinity constant,  $\tilde{K}_H$ ) were obtained for carboxylic-type and phenolic-type groups by an acid/base titration of the Gorleben HA (**Figure 6**). A summary of the parameters used for modeling is given in Table S3 of SI. The fitting of the Co-binding data measured by FDM was made by only adjusting the Co binding parameters (**Table 6**). The generic Mg parameters proposed by Milne et al. (2003) were used. The description of the  $Co^{2+}$  binding data based on the NICA-Donnan model is good over a wide range of  $[M]_{free}$  and 4 pH units.

The FDM was able to measure very low  $Co_{free}$  concentrations (lower than could be measured in the equilibrium mode) even for very low  $[Co]_{total}$ , namely  $1.0 \cdot 10^{-8}$ ,  $3.7 \cdot 10^{-8}$  and ca.  $5.2 \cdot 10^{-8}$  M. The calibration curve in Figure S2(a) of SI was used to estimate the  $[Co]_{free}$  concentration on the donor side since the kinetics are believed to be limited by transport through the membrane. The experimentally-determined  $\log [Co]_{free}$  (-9.76, -9.91, -9.62), and the calculated values using parameters given in Table S3 of SI (-10.08, -9.44, -9.27) are in fair agreement. This validates both the FDM and the NICA-Donnan parameters for Co. It also suggests that the assumption that Co-HA complexes are inert under these experimental conditions is also valid. The detection limit of the DMT ( $10^{-9}$  M in equilibrium mode) has been reduced to  $10^{-10}$  M. Further increases in sensitivity can be made by accumulating more metal on the acceptor side by using a longer experimental time.



**Figure 6:** Effect of ionic strength on the proton binding curve. The points are the experimental data and the straight lines are the Nica-Donnan modelling.

REFERENCES

- Buffle, J. (1988). *Complexation Reactions in Aquatic Systems*, Ellis Horwood Series in Analytical Chemistry.
- Cances, B., M. Ponthieu, M. Castrec-Rouelle, E. Aubry and M. F. Benedetti (2003). "Metal ions speciation in a soil and its solution: experimental data and model results." *Geoderma* **113**(3-4): 341-355.
- Davison, W. and H. Zhang (1994). "In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels." *Nature* **367**: 546-548.
- Glaus, M. A., W. Hummel and L. R. Van Loon (1997). *Experimental Determination and Modelling of Trace Metal-Humate Interactions: A pragmatic Approach for Applications in Groudwater*. PSI - Bericht 97- 153, Paul Scherrer Institut, Villigen, Switzerland.
- Kalis, E. J. J., L. P. Weng, F. Dousma, E. J. M. Temminghoff and W. H. Van Riemsdijk (2006). "Measuring free metal ion concentrations in situ in natural waters using the Donnan Membrane Technique." *Environmental Science and Technology* **40**(3): 955-961.
- Keizer, M. G. and W. H. Van Riemsdijk (1994). *A computer program for the Calculation of Chemical Speciation and Transport in Soil-Water Systems (ECOSAT 4.7)*. Wageningen, Agricultural University of Wageningen.
- Kinniburgh, D. G., W. H. van Riemsdijk, L. K. Koopal, M. Borkovec, M. F. Benedetti and M. J. Avena (1999). "Ion binding to natural organic matter: competition, heterogeneity, stoichiometry and thermodynamic consistency." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **151**(1-2): 147-166.
- Lindsay, W. L. (1979). *Chemical Equilibria in Soils*.
- Milne, C. J., D. G. Kinniburgh and E. Tipping (2001). "Generic NICA-Donnan Model Parameters for Proton Binding by Humic Substances." *Environmental Science & Technology* **35**: 2049-2059.
- Milne, C. J., D. G. Kinniburgh, W. H. van Riemsdijk and E. Tipping (2003). "Generic NICA-Donnan Model Parameters for Metal-Ion Binding by Humic Substances." *Environmental Science & Technology* **37**: 958-971.
- Morel, F. M. M. (1983). *Principles of aquatic chemistry*, New York: John Wiley.
- Pinheiro, J. P., A. M. Mota and H. P. van Leeuwen (1999). "On lability of chemically heterogeneous systems: Complexes between trace metals and humic matter." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **151**(1-2): 181.
- R.Lide, D. (2004-2005). *Handbook of Chemistry and Physics 85 th Edition*, CRC Press.
- Rocha, J. C., I. A. S. Toscano and P. Burba (1997). "Lability of heavy metal species in aquatic humic substances characterized by ion exchange with cellulose phosphate." *Talanta* **44**(1): 69.
- Sekaly, A. L. R., R. Mandal, N. M. Hassan, J. Murimboh, C. L. Chakrabarti, M. H. Back, D. C. Gregoire and W. H. Schroeder (1999). "Effect of metal/fulvic acid mole ratios on the binding of Ni(II), Pb(II), Cu(II), Cd(II), and Al(III) by two well-characterized fulvic acids in aqueous model solutions." *Analytica Chimica Acta* **402**(1-2): 211.
- Slaveykova, V. I., N. Parthasarathy, J. Buffle and K. J. Wilkinson (2004). "Permeation liquid membrane as a tool for monitoring bioavailable Pb in natural waters." *Science of The Total Environment* **328**(1-3): 55.
- Stumm, W. and J. J. Morgan (1996). *Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*, Environmental Science and Technology, A Wiley-Interscience Publication.

- Temminghoff, E. J. M., A. C. C. Plette, R. Van Eck and W. H. Van Riemsdijk (2000). "Determination of the chemical speciation of trace metals in aqueous systems by the Wageningen Donnan Membrane Technique." *Analytica Chimica Acta* **417**(2): 149-157.
- Tipping, E. (1998). "Humic Ion-binding Models VI: an improved description of the interactions of protons and metal ions with humic substances." *Aquatic Geochemistry* **4**: 3 - 48.
- Tipping, E. (2002). *Cation binding by humic substances*, Cambridge Environmental Chemistry Cambridge University Press.
- Tomaszewski, L., J. Buffle and J. Galceran (2003). "Theoretical and analytical characterization of a flow-through permeation liquid membrane with controlled flux for metal speciation measurements." *Anal. Chem.* **75**: 893-900.
- Van den Berg, C. M. G. (1991). "Potentials and potentialities of cathodic stripping voltametry of trace elements in natural waters." *Anal. Chim. Acta* **250**: 265-276.
- van Leeuwen, H. P., R. M. Town, J. Buffle, R. Cleven, W. Davison, J. Puy, W. H. van Riemsdijk and L. Sigg (2005). "Dynamic speciation analysis and bioavailability of metals in aquatic systems." *Environmental Science and Technology* **39**(22): 8545-8556.
- Van Loon, L. R., S. Granacher and H. Harduf (1992). "Equilibrium dialysis ligand exchange: a novel method for determining conditional stability constants of radionuclide-humic acid complexes." *Anal. Chim. Acta* **268**: 235.
- Weng, L. P., E. J. M. Temminghoff and W. H. van Riemsdijk (2001). "Contribution of individual sorbents to the control of heavy metal activity in sandy soil." *Environmental Science and Technology* **35**(22): 4436-4443.
- Weng, L. P., W. H. Van Riemsdijk and E. J. M. Temminghoff (2005). "Kinetic aspects of donnan membrane technique for measuring free trace cation concentration." *Analytical Chemistry* **77**(9): 2852-2861.
- Westall, M. L., J. D. Jones, G. D. Turner and J. M. Zachara (1995). "Models for the association of metal ions with heterogeneous environmental sorbents. 1. Complexation of Co(II) by leonardite humic acid as a function of pH and NaClO<sub>4</sub> concentration." *Environ.Sci.Technol.* **29**: 951-959.
- Wolf, M., G. Buckau and S. Geyer (2004). Isolation and characterization of new batches of Gohy-573 humic and fulvic acids. *Humic Substances in Performance Assessment of Nuclear Waste Disposal: Actinide and Iodine Migration in the Far-Field. Second Technical Progress Report* <<http://bibliothek.fzk.de/zb/berichte/FZKA6969.pdf>>. G. Buckau. Karlsruhe: 111-124.
- Wollery, T. J. W., T. J. (1992). EQ3/6, A computer program for geochemical aqueous speciation-solubility calculations. LLNL, Report UCRL-MA-110662. Livermore.
- Yezek, L. P. and H. P. van Leeuwen (2005). "Donnan effects in the steady-state diffusion of metal ions through charged thin films." *Langmuir* **21**(23): 10342-10347.
- Zhang, H. and W. Davison (1999). "Diffusional characteristics of hydrogels in DGT and DET techniques." *Analytica Chimica Acta* **398**: 329-340.

## CHAPITRE 2 : U(VI) AND MG(II) COMPETITIVE BINDING TO HUMIC SUBSTANCES: IMPLICATION FOR GROUNDWATER CHEMISTRY.

*Laura Marang<sup>a,b</sup>, Pascal Reiller<sup>a</sup>, Delphine Jouvin<sup>b</sup>, Marc F. Benedetti<sup>b\*</sup>*

<sup>a</sup>CEA Saclay, Nuclear Energy Division, DPC/SECR, Laboratoire de Spéciation des Radionucléides et des Molécules, BP 11, 91191 Gif sur Yvette, France

<sup>b</sup>Laboratoire de Géochimie des Eaux, Université Paris Diderot, IPGP and UMR CNRS 71574, Case Postale 7052, 75251 Paris Cedex 05, France

*Submitted to Applied Geochemistry (2007)*

|  |            |
|--|------------|
| <b>Introduction</b>  | <b>98</b>  |
| <b>Materials and methods</b>   | <b>100</b> |
| <i>Reagents.</i>   | 100        |
| <i>The Flux Donnan Membrane.</i>   | 100        |
| <i>Experimental set-up.</i>  | 101        |
| <i>Magnesium complexation with Humic Acid from Gorleben (GHA).</i>   | 102        |
| <i>Calibration of the FDM system for U(VI).</i>  | 102        |
| <i>U(VI) complexation with GHA.</i>  | 103        |
| <i>Humic acid analogue: U(VI) ion complexation with an insolubilized HA (IHA).</i>   | 103        |
| <i>Analytical techniques.</i>  | 104        |
| <i>NICA-Donnan model.</i>  | 104        |
| <b>Results</b>   | <b>105</b> |
| <i>Mg binding data.</i>  | 105        |
| <i>Uranium(VI): Complexation isotherm with HA</i>  | 106        |
| <b>Discussion</b>  | <b>109</b> |
| <i>Effect of the Mg to GHA ratio.</i>  | 109        |
| <i>Impact of Donnan effects and specific interactions between the metal ion and membrane on the determination of trace element speciation with the FDM</i> | 113        |
| <i>Uranium (VI) complexation data</i>  | 114        |
| <i>Application to field data.</i>  | 116        |
| <b>Conclusion</b>  | <b>118</b> |



## RESUME

Dans des eaux souterraines contenant de fortes concentrations en matière organique naturelle (MON), la MON pourrait avoir une influence importante sur la mobilité de l'uranium. La compréhension de la complexation de l'uranium (VI) par les substances humiques (SH), pouvant représenter jusqu'à 70 % de la MON, est ainsi nécessaire afin de comprendre son devenir dans l'environnement. La compétition avec des cations majeurs tels que  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  lors de la complexation par les SH peut également influencer son devenir. Contrairement au  $\text{Ca}^{2+}$ , aucune donnée de complexation du  $\text{Mg}^{2+}$  par les SH n'est disponible. Le but de cette étude est d'acquérir des données de l'uranium (VI) et du  $\text{Mg}^{2+}$  complexés par des SH à l'aide de deux nouvelles approches méthodologiques. La Flux Donnan Membrane (FDM), développée récemment, est une approche dynamique de la DMT. Cette technique permet d'acquérir des données de complexation pour une grande gamme de concentration en un temps relativement court. L'utilisation de la FDM est limitée à des pH acides pour des métaux ayant une faible solubilité et de fortes interactions avec la membrane tel que l'uranium (VI). Un acide humique insolubilisé est également utilisé afin d'obtenir des données à des pH plus élevés. Le modèle NICA-Donnan peut être calibré pour ces deux éléments et utilisé pour simuler l'effet compétitif du  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$  sur la spéciation de l'uranium (VI) et du  $\text{Co}^{2+}$ . Les alcalino-terreux n'ont pas d'effet sur la spéciation de l'uranium (VI) qui se complexent fortement à la MON. Par contre  $\text{Mg}^{2+}$  a un effet sur la spéciation de cations comme  $\text{Co}^{2+}$ , qui sont faiblement complexés par les SH. Il est donc nécessaire de prendre en compte la compétition avec les alcalino-terreux lors de la prédiction de la spéciation de radionucléides faiblement complexés aux SH. La prédiction de la spéciation de l'uranium (VI) calculée par le logiciel ECOSAT comprenant le modèle NICA-Donnan est comparée à celle mesurée dans des eaux souterraines. Dans la première eau souterraine (Ranville et al.), la faible quantité d'uranium associé à la MON est en accord avec le calcul du code de spéciation. La présence de complexes inorganiques conduit à une diminution des interactions entre uranium et MON. Afin de tester si un COD plus réactif pourrait avoir une influence sur la spéciation de l'uranium, nous avons étudié une deuxième eau souterraine. Dans l'eau souterraine de Gorleben (Zeh et al., 1997), le logiciel ECOSAT prédit que l'uranium est sous la forme  $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$  alors que la mesure indique que 70 % de l'uranium sont à l'état colloïdal (essentiellement de la MON). Le fait que le modèle n'arrive pas à décrire correctement ces interactions montre que la forte réactivité du COD et donc la seule complexation avec la MON n'est pas responsable de la spéciation de l'uranium. Afin de



comprendre ces fortes interactions, il serait nécessaire d'obtenir d'autres informations sur cette eau souterraine comme le contrôle du redox par les phases minérales ainsi que sur les bactéries présentes dans cette eau souterraine qui pourraient influencer la complexation de l'uranium par la MON.

**ABSTRACT**

In groundwaters that contain high concentrations of natural organic matter (NOM), mostly humic substances (HS), it is expected that NOM plays an important role on the behaviour of uranium. The knowledge of the complexation of U(VI) by HS is therefore required to understand its fate in the environment. Another point is the actual effect of the competition with major cations as  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  in NOM complexation. The aim of this study is to acquire experimental data for the complexation of uranium (VI) and magnesium with HS with two new different methodologies. Then the NICA-Donnan model is calibrated for both elements and can be used to simulate the competitive effect of magnesium on uranium (VI) speciation. Lastly, these parameters are applied to predict uranium speciation in two different groundwaters.

**Acknowledgment.** This work was financed through “FUNMIG project” (EC: FUNMIG-NUWASTE-2004-3.2.1.1-1), and the MRTRA project of the Risk Control Domain of CEA (CEA/DEN/DDIN). The authors would like to thank Dr. F.Claret and Dr. T.Vercouter for helpful discussions.

## Introduction

The different anthropogenic contributions to the global uranium geochemical cycle can lead to an increase of the uranium concentration in the environment. These contributions are the use in nuclear cycle, such as (mining extraction and mine piles, reprocessing, radioactive waste disposal), the use in research and military use of depleted uranium... The transport and the accumulation of uranium in different parts of the ecosystems are related to its physical-chemical form.

Under oxidizing conditions, uranium is essentially under the oxidation state +VI, in the form of complexes of the uranyl ion  $\text{UO}_2^{2+}$ . Under reducing conditions  $\text{U}(\text{OH})_4(\text{aq})$  is the dominant form even if mixed hydroxo-carbonato complexes are likely to be formed (Grenthe et al., 1992). In addition to  $\text{UO}_2^{2+}$ , the occurrence of other aqueous U(VI) species depends upon pH and the occurrence of ligands in solution such as hydroxide and carbonate ions as well as complexes with other aquatic constituents such as phosphate, sulphate, fluoride and alkaline-earth ions (*i.e.* calcium, magnesium), dependant on local conditions (Guillaumont et al., 2003). The mobility of U(VI) in soils is typically controlled by sorption and biological processes, which are influenced by the U(VI) speciation, soils and sediment properties and other aquatic chemical conditions. An important question for risk assessment is whether the water-soluble U(VI) species are immobilized in soils or sediments, or whether they migrate with the water flow.

A number of studies have demonstrated that U(VI) can sorb to clays and oxides (Hsi et al., 1985; Payne et al., 1996; Turner et al., 1996; Schmeide et al., 2000; Sylwester et al., 2000). Sorption of inorganic U(VI) to individual minerals can be well described by surface complexation and/or ion exchange model. In contrast, sorption of U(VI) to soils and sediments is more complicated because of multiple sorption sites and the difficulty to characterize either the full spectrum of aquatic species present or the individual properties and contribution to overall U(VI) sorption of the wide variety of co-mingled solid-phase sorbents, including natural organic matter (NOM) (Davis et al., 2004).

NOM exists in natural waters as stable colloids and dissolved forms: mostly humic substances (HS). It is also a major component of the solid phases in environmental soils and sediments. In an area that contains high concentrations of organic matter, it is expected that NOM plays an important role on the behaviour of uranium (Choppin, 1992; Zeh et al., 1997; Crançon et al., 2003; Thiry et al., 2005) and on its bioavailability. Radionuclides can be complexed by dissolved organic matter (DOM) (Choppin, 1992; Higgs et al., 1993; Lenhart

et al., 1999). In the case of actinide ions, such as the uranyl ion, DOM has been shown to facilitate transport in column experiments using natural sand and groundwater rich in DOM (Artinger et al., 2002). The knowledge of the complexation of U(VI) by DOM is therefore required to understand its fate in the environment.

The competition between uranium (VI) and major cation during NOM complexation in groundwaters is not a easy task to tackle. It has been shown that classes of metals were in direct competition (Kerndorff et al., 1980; Alberts et al., 1998; Pinheiro et al., 1999), whereas others were not (Tipping et al., 1988; Hering et al., 1988a; Hering et al., 1988b; Pinheiro et al., 2000). Amongst these major cations, calcium and magnesium are the most abundant in solution. The direct quantification of their actual competition vs. uranium (VI) is thus important to obtain.

Due to the difficulty to measure the uranium speciation in the field, models are useful tools that can give quantitative and qualitative information on the metal ion forms in soils, sediments and solutions. However, to be of any use, these models need a robust data base of reactive sorption experiments in order to derive reliable parameters that can then be used to predict the behaviour of trace elements in conditions relevant for field systems. The NICA-Donnan model describes metal ion binding to NOM (Kinniburgh et al., 1999): it accounts for NOM chemical heterogeneity, competition during binding, and ionic strength effects. It could be used to predict the influence of the NOM complexation on the uranium speciation, and possible competition with major cations. Moreover, various species of a given element may determine its toxicity or uptake, the free metal ion concentration is still one of the key parameters that can be obtained by speciation calculations. It is therefore important to obtain information to relate soil and sediment chemistry to biological response.

Despite the large number of studies describing the interactions between uranium (VI) and HS, only few datasets (Czerwinski et al., 1994; Glaus et al., 1997; Zeh et al., 1997; Saito et al., 2004) describe the complexation over a wide range of free metal ion concentration, ionic strength, and pH. The objectives of this work are to acquire new data for uranium (VI) complexation by humic substances using two different methodologies: i.) a recently developed technique, the Flux Donnan Membrane technique (FDM) (Weng et al., 2005; Marang et al., 2006), an evolution of the Donnan Membrane Technique (DMT); ii.) a natural organic matter analogue, i.e. an insolubilised humic acid (IHA) (Seki et al., 1995; Weber et al., 2006). These new data sets will permit to increase the confidence in the NICA-Donnan model predictions for  $\text{UO}_2^{2+}$  biogeochemistry (Milne et al., 2003; Saito et al., 2004).

Usually, calcium is used in the DMT or FDM experiments to fix the membrane potential (Temminghoff et al., 2000). In this case a nitrate magnesium salt solution was used to avoid the precipitation of calcium uranate (Guillaumont et al., 2003). Magnesium complexation by humic substances was then also studied with FDM to account for the competition between uranium and magnesium in the background electrolyte. These data will also help us to ascertain the  $Mg^{2+}$  generic parameters for NICA-Donnan model, and will be used in the discussion of competition issues.

## Materials and methods

### *Reagents.*

The reagents used were  $Mg(NO_3)_2$ ,  $KNO_3$  (Panreac), EDTA (Sigma-Alrich),  $H_3PO_4$  (Normapur, Prolabo),  $U(NO_3)_2$  (SPEX certiprep 5%  $HNO_3$ ) and water (Milli Q, Millipore).

### *The Flux Donnan Membrane.*

The Donnan membrane cells consists of two compartments, the first one (donor) containing the free metal ion as well as the complexed metal, and the second one (acceptor) containing a solution of the same salt concentration as in the donor solution where only free metal ion is detected (Temminghoff et al., 2000). The two compartments are separated by a semi-permeable cation exchange membrane. The standard DMT measurement is made once the equilibrium has been attained between the two compartments, which is typically of the order of a few days. When the equilibrium is reached, the free metal ion concentration in the acceptor and in the donor will be identical.

The Flux Donnan Membrane is a dynamic modification of the standard DMT with improved detection limits and a faster response. It is based on the addition of a strong ligand on the acceptor side to increase the amount of free metal ion transported through the membrane to the acceptor, and on the analysis of the metal flux through the membrane. The theoretical basis for the FDM has been described in details elsewhere (Weng et al., 2005; Marang et al., 2006).

The transport of the metal ion can be either limited by the diffusion in the membrane and/or by the diffusion in solution. If we postulate that one flux has to be at least 5 times smaller than the other one to be considered the rate-limiting flux (Marang et al., 2006), then when the complexation factor  $P_i$  ( $[M]_{total}/[M]_{free}$ ) is  $< 5.4$  in the donor or in the acceptor solution, the transport will be limited by the diffusion in solution. Conversely, when  $P_i$  is greater than 135

in both cell compartments, the transport will be controlled by the diffusion in the membrane. When  $5.4 < P_i < 135$  in the donor and/or in the acceptor, the transport of the metal is controlled both by the diffusion in the solution and in the membrane. To link the total concentration measured in the acceptor to the free metal ion concentration in the donor, calibration curves that gives the donor-acceptor concentrations as a function of time for the two limiting cases are needed. Knowing the total metal ion concentration and the total ligand concentration in a given system, a preliminary calculation of the speciation can be made. Then, according to the  $P_i$  approximated values and the ionic strength, the appropriate calibration curve can be used to determine the free metal ion concentration on the donor side from the total metal ion concentration measured on the acceptor side.

The concept of lability is important for dynamic metal speciation technique (van Leeuwen et al., 2005). When the transport is controlled by diffusion in the solution and if the complex is labile, both labile complexes and the free metal ion will contribute to the flux. Whereas, if the complex is inert, only the free metal ion will contribute. When the transport is membrane-controlled, only the free metal ion contributes to the flux. The definition of the lability concept is described in detail elsewhere (Pinheiro et al., 1999). In general, the increase of the binding constant between metal ion and HS, the HS concentration, and the decrease of the metal water loss rate constant (Morel, 1983), lead to a more inert system. The lability of the studied complex has to be estimated in order to interpret correctly the measured free concentration.

### **Experimental set-up.**

The design of the cation exchange cell is described by Temminghoff *et al.* (2000). In the cell, a cation exchange membrane is used to separate the substrate solution (the donor) from a salt solution (the acceptor). This cation exchange membrane (BDH, Laboratory Supplies) consists of a matrix of polystyrene and divinyl-benzene. The sulfonic acid groups are fully ionised at  $\text{pH} > 2$ . Its ion exchange capacity and thickness are given by the supplier as  $0.8 \text{ meq.g}^{-1}$  and  $0.16 \pm 0.1 \text{ mm}$ , respectively. The area of the membrane used in the FDM device is  $7 \text{ cm}^2$ .

The membranes were preconditioned by first soaking in  $0.1 \text{ M HNO}_3$  to remove trace metal impurities. Then, they were washed with a solution of either  $1 \text{ M Mg(NO}_3)_2$  or  $1 \text{ M KNO}_3$  depending on the background electrolyte to be used. A divalent cation was used in the background electrolyte in order to keep the electrostatic potential of the membrane more or

less constant. The selected background electrolytes were 0.1 M  $\text{KNO}_3$  and 2 mM  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  for the  $\text{Mg}^{2+}$  and U(VI) experiments, respectively. Finally, the membranes were equilibrated in the final background electrolyte of the experiments. All cells, bottles and tubes were washed with 0.1 M  $\text{HNO}_3$  and rinsed with water (Milli Q).

Both donor and acceptor solutions were circulated at a constant rate of  $2.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . The acceptor and donor volumes were 25 mL and 200 mL, respectively. The pH was measured using a HANNA pH combined electrode and was calibrated with SCHOTT standards buffers pH (4.01, 6.87, and 9.18).

Aliquots of donor and acceptor solutions were sampled, acidified with  $\text{HNO}_3$  (Suprapur, Prolabo) and the total metal ion concentration were measured.

### ***Magnesium complexation with Humic Acid from Gorleben (GHA).***

The humic acid used in this experiment was extracted from one of the deep groundwaters in the Gorleben area (Gohy-573, Germany). Its isolation, purification, and characterization are described in detail elsewhere (Wolf et al., 2004). A stock solution of  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  was prepared and stored for 12 hours at pH 10 and then stored at pH 5.5. The selected background electrolyte was 0.1 M  $\text{KNO}_3$ . The acceptor solution consisted of 50 mM of EDTA.

The ability of the FDM to measure free metal ion and labile complex concentrations or only free metal ion concentration was checked by measuring Mg binding isotherms with different concentrations of GHA. In the first experiment (Exp-1), the donor solution contained  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  of GHA with  $[\text{Mg}]_{\text{total}}$  ranging from  $10^{-4}$  to  $10^{-2}$  M. The experiment was done at  $\text{pH } 6 \pm 0.05$  and  $8 \pm 0.05$ . The acceptor and donor were sampled after 30 min. In the second experiment (Exp-2), the donor solution contained  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  of GHA with  $[\text{Mg}]_{\text{total}}$  ranging from  $2 \times 10^{-5}$  to  $4 \times 10^{-4}$  M. The pH was fixed at  $\text{pH } 6 \pm 0.05$ . The acceptor and donor were sampled after 1 hour. In the third experiment (Exp-3), the donor solution contained  $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  of HA with  $[\text{Mg}]_{\text{total}}$  ranging from  $8 \times 10^{-6}$  to  $2 \times 10^{-4}$  M. The pH was fixed at  $\text{pH } 6 \pm 0.05$ . The acceptor and donor were sampled after 2 hours. Magnesium calibrations curves are taken from our previous work (Marang et al., 2006).

### ***Calibration of the FDM system for U(VI).***

The FDM was calibrated when transport on the donor side was dominated either by diffusion in solution (case 1) or by diffusion in the membrane (case 2). Calibrations conditions are summarised in **Table 1**. In case 1, the calibration was performed with a high

concentration of phosphoric acid ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) on the acceptor side. In case 2, EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) and  $\text{H}_3\text{PO}_4$  were present in the donor and acceptor side, respectively.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  was used in the acceptor side to simplify the analytical determination of uranium by time resolved laser induced spectrofluorimetry (strong complexation and fluorescence enhancement). The concentration of EDTA and  $\text{H}_3\text{PO}_4$  needed for the two calibration conditions were estimated with the help of ECOSAT code (Keizer et al., 1994) using known thermodynamic binding constants of U(VI) with both ligand (Guillaumont et al., 2003; Hummel et al., 2005). The background electrolyte was 2 mM  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  for both cases and negligible binding was awaited between  $\text{Mg}^{2+}$  and both ligand.

In case 1, the acceptor and donor solutions were sampled at 3, 4, 6, 8, 19, 23 and 24 hours. In case 2, they were sampled at 3, 9, 24, 48 and 96 hours.

**Table 1.** Experimental conditions of the FDM for the U(VI) calibrations for solution-controlled diffusion (Case 1) and for membrane-controlled diffusion (Case 2)

|   | Case 1                         | Case 2                         |
|---|--------------------------------|--------------------------------|
| [EDTA] in Donor                         | 0                              | 0.5 mM                         |
| [ $\text{H}_3\text{PO}_4$ ] in Acceptor | 100mM                          | 100mM                          |
| Background Electrolyte                  | 2mM $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ | 2mM $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ |
| [M <sub>Total</sub> ] in donor          | 5 $\mu\text{M}$                | 20 $\mu\text{M}$               |
| pH                                      | 4                              | 4                              |

### ***U(VI) complexation with GHA.***

The donor solution contains 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  of HA with  $[\text{U(VI)}]_{\text{total}}$  ranging from  $8 \times 10^{-8}$  to  $1 \times 10^{-5}$  M. The acceptor solution consisted of  $10^{-2}$  M of  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . The pH was fixed at 4, 5, 6  $\pm$  0.05. The background electrolyte was 2 mM  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ . The acceptor and donor sides were sampled after 24 hours and calibration 1 was used for high metal to ligand ratio or they were sampled after 48 hours and calibration 2 used for low metal to ligand ratio.

### ***Humic acid analogue: U(VI) ion complexation with an insolubilized HA (IHA).***

Calcium hydroxide precipitation has been observed by other authors in a cation exchange membrane used during water treatment at high pH values (pH = 12) (Ayala-Bribiesca et al.,



2006). Similarly, shœpite ( $\text{UO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) because of its low solubility product (Guillaumont et al., 2003) could precipitate in the membrane at pH higher than 4. To control the potential precipitate formation during the FDM experiments for this pH range, a different experimental protocol was applied. An insolubilised Humic Acid (IHA) was used in order to separate the bound U(VI) from the free U(VI) in solution. This IHA was previously used to study iron binding to humic acid (Weber et al., 2006). A detailed description of the insolubilization procedure and a full characterization of the IHA used in this study, especially proton titration can be found elsewhere (Seki et al., 1995; Weber et al., 2006). Reactivity studies showed that only a minor amount of the binding capacity of the IHA was lost by the insolubilization procedure (*i.e.* mainly high affinity type of sites) (Seki et al., 1995; Weber et al., 2006).

A mixture of  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  of IHA was reacted with solutions of known concentrations of U(VI) ranging from  $10^{-8} \text{ M}$  to  $2.5 \times 10^{-6} \text{ M}$  in a  $2 \text{ mM Mg(NO}_3)_2$  background electrolyte. The pH values ranged from 4 to 6 and were adjusted with known volumes of a  $0.1 \text{ M KOH}$  solutions. After a first equilibration step under agitation during 24 h, the pH was adjusted. The samples were again equilibrated for 24 h under the same conditions and their final pH values measured. The solutions were then centrifuged during 20 min at 4000 rpm. The supernatant was removed and filtered using  $0.2 \text{ }\mu\text{m}$  minisart-GF units to perform subsequent chemical analysis.

### ***Analytical techniques.***

The Mg analysis was carried out by flame atomic absorption spectroscopy at 285.2 nm with a detection limit of  $10^{-6} \text{ M}$  (Unicam Solaar M6). Uranium concentrations were determined by time resolved laser induced spectrofluorimetry (Moulin et al., 1993; Plancque et al., 2005) using the standard addition method in 5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ( $0.1 \text{ M}$ ) with a detection limit of  $10^{-10} \text{ M}$ . Experimental set-up is described elsewhere (Plancque et al., 2005). HA concentration were determined by total organic carbon (TOC) using a TOC analyser (Schimadzu TOC-Vesh) with a detection limit of  $0.3 \text{ mg.L}^{-1}$ .

### ***NICA-Donnan model.***

Chemical calculations were made using ECOSAT (Keizer et al., 1994), that includes speciation with inorganic ligands and the NICA-Donnan model (Kinniburgh et al., 1999) that describes metals and protons complexation with humic substances. The pH values, free metal

ion concentration and HA concentration are used as input data to adjust the NICA-Donnan parameters in order to fit the binding data.

In the pH range of our experiments,  $\text{UO}_2^{2+}$  and its hydroxyl complexes, *i.e.*  $\text{UO}_2\text{OH}^+$  and  $\text{UO}_2(\text{OH})_2(\text{aq})$ , coexist together with  $\text{UO}_2\text{CO}_3(\text{aq})$  and  $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$  carbonate complexes ( $p\text{CO}_2 = p_{\text{atm}} \equiv 10^{-3.5}$  atm). In addition, the solution U(VI) activity was supposed to be controlled by the solubility of  $\text{UO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Guillaumont et al., 2003).

## Results

### ***Mg binding data.***

Calibrations curves used to construct the Mg binding isotherms were taken from our previously work (Marang et al., 2006). The slopes of the theoretical calibrations curves, when the transport is controlled by diffusion in solution (case 1) or by diffusion in the membrane (case 2), are shown in **Table 2** together with the experimental values obtained previously (Marang et al., 2006). Weng et al. (2005) have described theoretically the transport of the metal in the FDM system. Donnan effect will control the flux in case 1 or 2. Specific and electrostatic effects could also dominate the transport of the metal ion in the FDM device (Yezek et al., 2005). Their relative contribution will depend on the diffusing species. For  $\text{Mg}^{2+}$ , theoretical and experimental values agree (**Table 2**). The transport in the FDM device is therefore only dominated by Donnan effects, *i.e.* transport controlled in the membrane or in solution.

**Table 2** . Comparison between experimental and theoretical calibrations curves slopes for magnesium and uranium in case the transport is solution controlled (case 1) and membrane controlled (case 2);

|           | Case 1: $A_1^*$ value ( $s^{-1}$ ) |                      | Case 2: $A_2^*$ value ( $s^{-1}$ ) |                      |
|-----------|------------------------------------|----------------------|------------------------------------|----------------------|
|           | Experimental                       | Theoretical          | Experimental                       | Theoretical          |
| Uranium   | $2.3 \cdot 10^{-6}$                | $2.4 \cdot 10^{-5}$  | $1.47 \cdot 10^{-5}$               | $2.0 \cdot 10^{-4}$  |
| Magnesium | $8.3 \pm 1.2 \cdot 10^{-5}$        | $7.91 \cdot 10^{-5}$ | $8.7 \pm 1.1 \cdot 10^{-4}$        | $1.01 \cdot 10^{-3}$ |

\* : Case 1 : transport is solution controlled  $A_1 = \frac{A_e \cdot D_i}{V_{acc} \cdot \delta}$

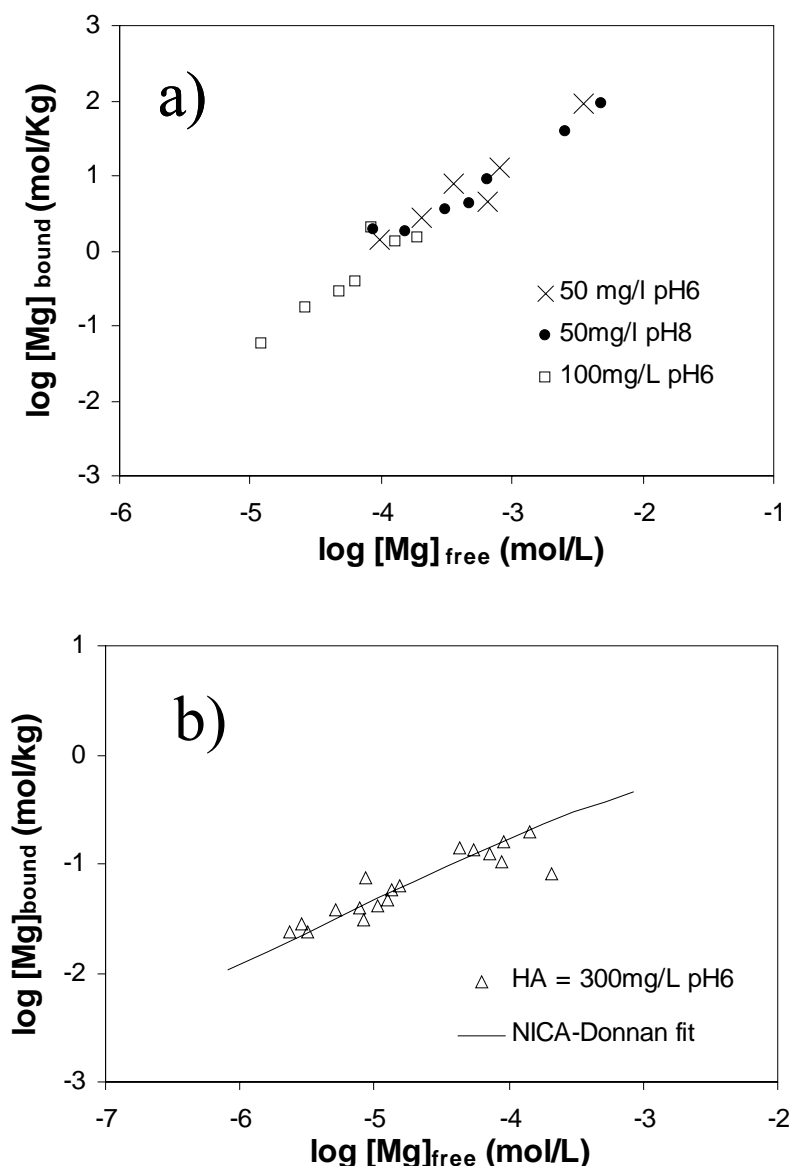
Case 2: transport is membrane controlled  $A_2 = \frac{A_e \cdot D_i \cdot B^{z_i}}{V_{acc} \cdot \delta_m \cdot \lambda}$

where  $B$  is the Boltzmann factor,  $D_i$  is the diffusion coefficient of ion  $i$  in water ( $m^2 s^{-1}$ ),  $D_{i,m}$  the apparent diffusion coefficient on ion  $i$  in the membrane ( $m^2 s^{-1}$ ),  $\lambda_i$  is the tortuosity factor for ion  $i$  in the membrane,  $z_i$  is the charge of ion  $i$ ,  $\delta$  is the thickness of diffusion layer in solution (m) and  $\delta_m$  is the thickness of the membrane (m).

**Figure 1** shows the results obtained using the FDM with GHA for Exp-1, Exp-2 (a) and Exp-3 (b). Exp-1 and Exp-2 show a similar binding behaviour for Mg with GHA. Remarkably, the binding isotherms have a slope of 1.2 in both experiments a). In Exp-3 (**Figure 1 b**), the binding is much smaller for  $[Mg]_{free}$  higher than 0.1mM and the slope of the isotherm is equal to 0.43 like for Ca binding to HA measured by ISE (Benedetti et al., 1995).

### **Uranium(VI): Complexation isotherm with HA**

*Calibration of the FDM for uranium (VI).* Theoretical slopes of uranium calibrations curves, when the transport is controlled by diffusion in solution (case 1) or by diffusion in the membrane (case 2), are given in **Table 2** together with experimental calibrations curves slopes obtained in this study. Theoretical and experimental values are not in agreement.

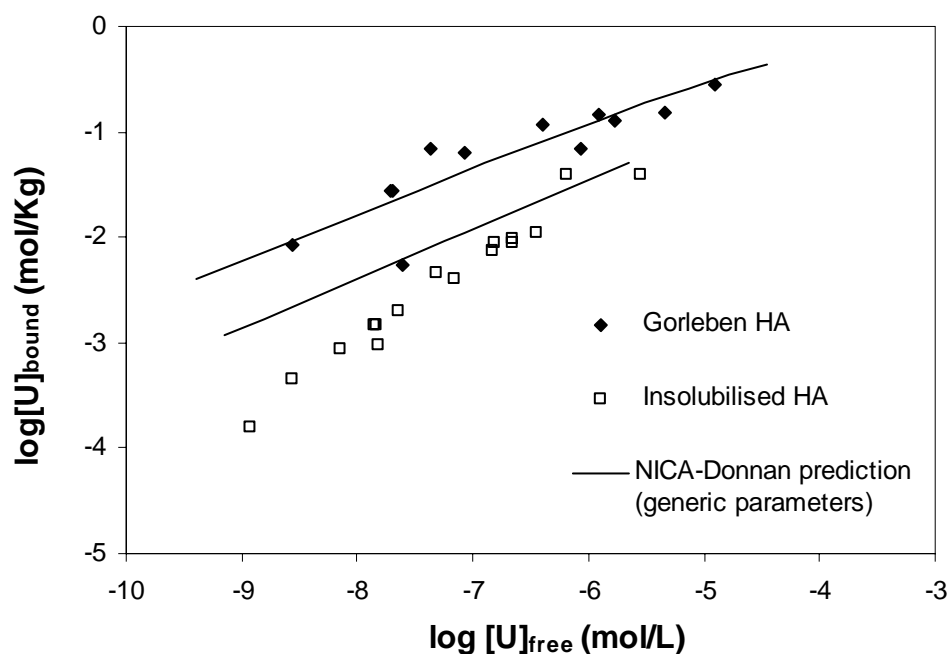


**Figure 1.** Mg complexation isotherm ( $\log [Mg]_{\text{bound}}$  vs.  $\log [Mg]_{\text{free}}$ ) with GHA (50 mg/L or 100mg/L) at pH 6 and 8 (a) and with GHA (300 mg/L) at pH 6 (b). The background electrolyte was 2 mM  $Mg(NO_3)_2$ .

However, the ratio (i.e. equal to 10) between the slopes, corresponding to membrane and solution transport, is the same as for magnesium calibration data. The flux of U(VI) in the FDM is therefore like Mg, dominated by Donnan effects and the experimental curves can be used to determine the free uranium concentration on the donor side from the total concentration on the acceptor side. The discrepancy between the theoretical and the experimental values could be due to the strong specific interactions between  $UO_2^{2+}$  and the sulphonic groups of the membrane. This was tested by a standard DMT equilibrium

measurement made with uranium (data not shown). In that case, the equilibration was reached in 10 days instead of 2 days for the other divalent cations (Temminghoff et al., 2000). During this time, 70% of the total  $\text{UO}_2^{2+}$  introduced on the donor side was accumulated in the membrane. Moreover, calibration curves showed that the initial accumulation time of U(VI) in the membrane was 4 hours instead of 10 minutes for Mg. Under these conditions, the theoretical calculation developed by Weng et al. (2005) cannot be used to determine the free metal ion concentration because specific interactions of the metal ion with the membrane are not explicitly taken into account in the calculation of the calibration curve. It is then necessary to obtain an experimental calibration curve for each cation that will behave like  $\text{UO}_2^{2+}$ . Ultimately, a similar effect is expected for trivalent and tetravalent cations like  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zr}^{4+}$  or lanthanides/actinides(III) and (IV).

*Uranium(VI) binding data.* The U(VI) binding isotherm to GHA is given in **Figure 2**.



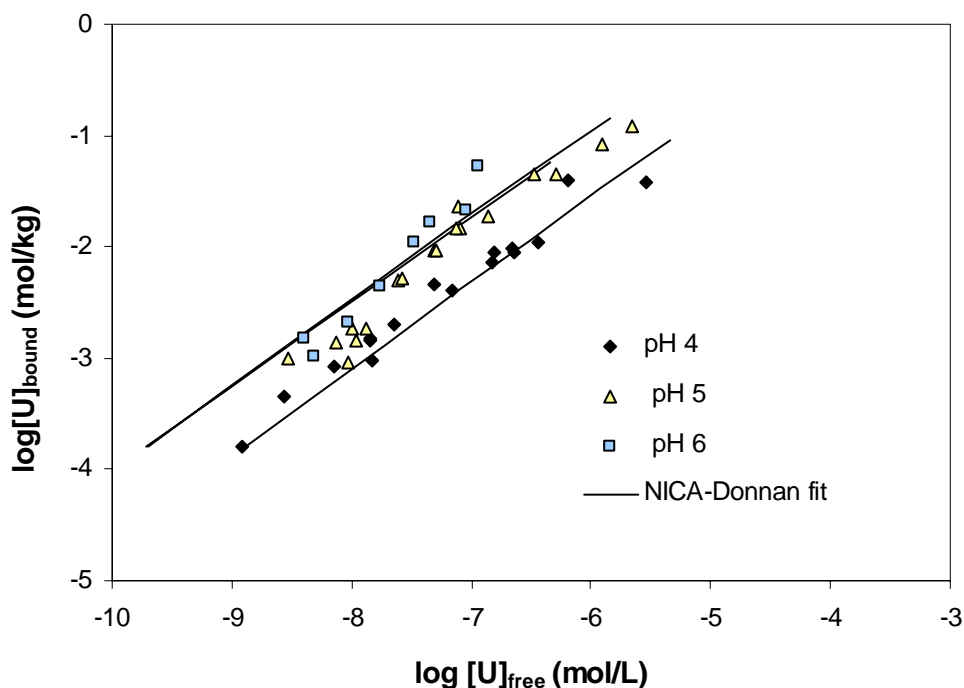
**Figure 2.** U(VI) complexation isotherms ( $\log [\text{UO}_2^{2+}]_{\text{bound}}$  vs.  $\log [\text{UO}_2^{2+}]_{\text{free}}$ ) at pH 4 with Gorleben HA (10mg/L) and with HA insolubilised (50 mg/L). The background electrolyte was 2 mM  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ .

The isotherm was constructed with the two experimental calibration curves (**Table 2**); data points corresponding to low  $P_i$  value, *i.e.*  $\log [\text{UO}_2^{2+}]_{\text{free}} > -7$ , were obtained using the calibration corresponding to solution-diffusion controlled transport (case 1); data point with

high  $P_i$ , *i.e.*  $\log[\text{UO}_2^{2+}]_{\text{free}} < -7$ , were obtained with the membrane-diffusion controlled transport calibration curve (case 2). The discrepancy between data points corresponding to *i.e.*  $-8 < \log [\text{U}]_{\text{free}} < -7$ , could be due to a mixed contribution of membrane and solution diffusion controlled flux (Marang *et al.*, 2006).

The  $\text{UO}_2^{2+}$  binding to GHA is high at pH 4 and similar to the one obtained for copper by Kinnibugh *et al.* (1996) for the same pH. The slope of the isotherm, *i.e.* 0.41, is also similar to the one obtained for copper suggesting the implication of high affinity sites for the binding of  $\text{UO}_2^{2+}$  to HS.

The data point corresponding to the experiment made with the IHA show a much smaller  $\text{UO}_2^{2+}$  binding under similar conditions (**Figure 3**). Moreover, the slope of the binding is steeper (*i.e.*  $\cong 0.7$ ). The data in **Figure 3** show that the binding increases as pH increases from pH 4 to 5 but remains constant when pH increases from pH 5 to 6.



**Figure 3.** U(VI) complexation isotherms ( $\log [\text{UO}_2^{2+}]_{\text{bound}}$  vs.  $\log [\text{UO}_2^{2+}]_{\text{free}}$ ) with IHA (50mg/L) at pH 4, 5, 6. The background electrolyte was 2 mM  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ .

## Discussion

### **Effect of the Mg to GHA ratio.**

Mg experiments obtained with the FDM system with increasing GHA concentration clearly show the influence of the metal to ligand ratio (**Figure 1**). The higher slope value obtained for

low concentration of GHA can have several origins. The first one is to assume that the Mg-GHA is a cooperative system. In other words, the binding of Mg promotes more Mg binding. This kind of behaviour was never reported for divalent cations and based on the analysis of the extensive data set available for Ca binding to Humic Substances (Milne et al., 2003), it seems a very unlikely process. The other option is to assume that the dynamic mode of the FDM is able, under these conditions, to measure both free and labile forms of Mg. An estimation of the lability criterion (L), as defined by Pinheiro et al. (1999), was made for our experimental conditions. The results of the calculation show that for both Exp-1 and Exp-2, the value of L is  $\gg 1$  which is characteristic of labile system. In these experiments, labile complex and free  $Mg^{2+}$  ion are transported through the membrane. This explains why the  $[Mg]_{bound}$  is proportional to the total Mg concentration introduced in the experiments and why the transport is controlled by the diffusion in the solution. For the experiments made at higher GHA concentration, the lability criterion show that the Mg-GHA complex are less labile. The transport under such experimental conditions is more controlled by the diffusion in the membrane. Indeed for a given background electrolyte concentration, decreasing  $P_i$  (ratio of total metal ion concentration on free metal ion concentration) results in a change from solution-controlled transport to a membrane-controlled transport. Hence, only the data of Exp-1 can be used to adjust  $Mg^{2+}$  binding parameters within the framework of a chemical equilibrium model like the NICA-Donnan model (**Figure 1**).

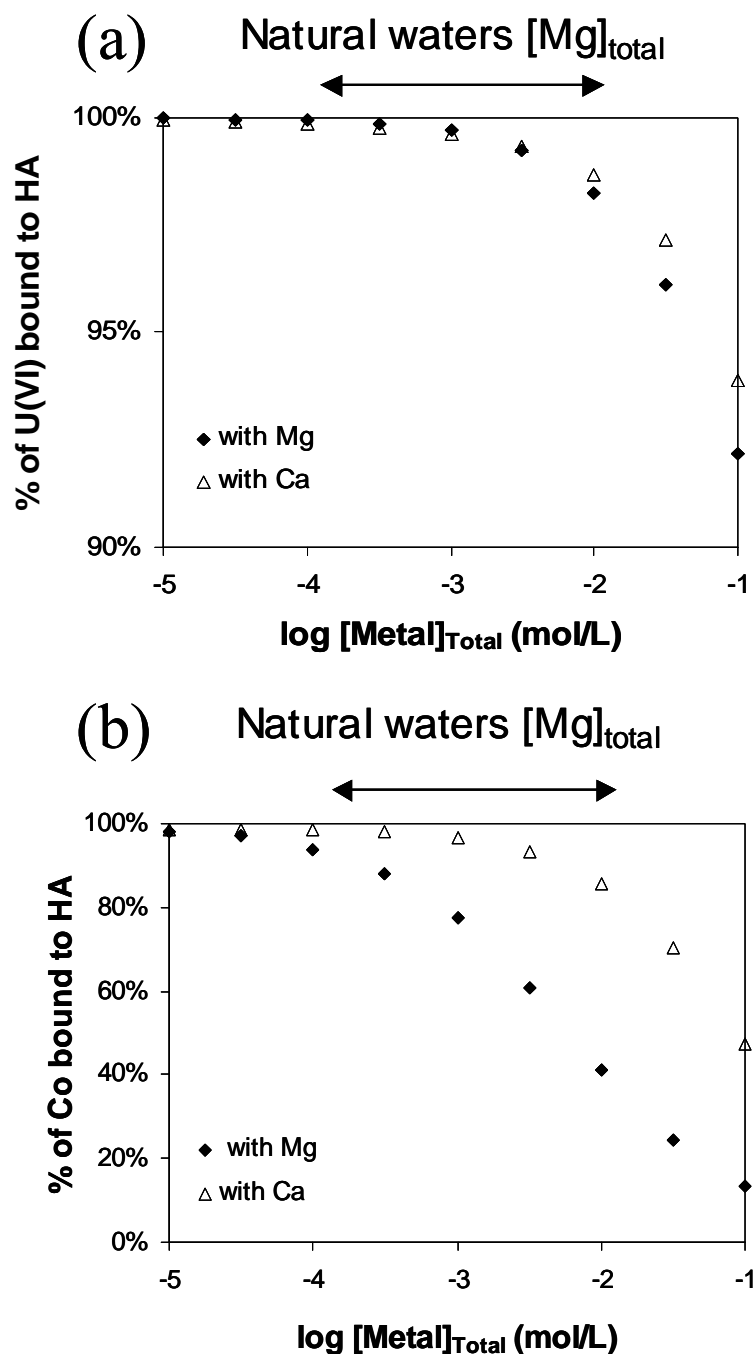
The fitting procedure for the parameters have been extensively described in Milne et al. (2001; Milne et al., 2003). Site density ( $Q_{max}$ ) and proton parameters (non ideality parameter  $n_H$ ,  $p$  the width of the distribution and median affinity constant  $\tilde{K}_H$ ) were obtained for carboxylic-type and phenolic-type groups by an acid/base titration of the GHA (Marang et al., 2006) and only the magnesium parameters were adjusted in this study. A summary of the parameters used for fitting is presented in **Table 3**.

The NICA-Donnan fit is in good agreement with the experimental data. Compared to  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  is more strongly bound by humic acid and interestingly the binding occurs mostly to low affinity, or carboxylic type of sites and much less in the Donnan phase as proposed for  $Ca^{2+}$  (Kinniburgh et al., 1999). This is an important result because it means that  $Mg^{2+}$  will be a stronger competitor for other divalent cations compared to  $Ca^{2+}$ . A simulation of the potential competitive effect of  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  on uranium (VI) and cobalt(II) binding is shown in **Figure 4**. The data in **Figure 4** were obtained with binding parameters given in **Table 3** for the GHA,  $Mg^{2+}$  and U(VI) and taken from Milne et al (2003) for  $Ca^{2+}$ .

**Table 3** . Nica-Donnan model parameters used for the description of magnesium and uranium binding isotherms. \*Generic Parameters derived from the study of Saito *et al.* (2004); \*\* IHA parameters derived from the study of Weber *et al.*(2006)

|                                   | Carboxylic-type groups | Phenolic-type groups |
|-----------------------------------|------------------------|----------------------|
| <i>Gorleben HA</i> $Q_{Max}$      | 2.63                   | 3.08                 |
| $\log K_H$                        | 4.11                   | 8.92                 |
| $n_H$                             | 0.8                    | 0.65                 |
| $p$                               | 1                      | 0.41                 |
| $\log K_{Mg}$                     | 0.6                    | 0.6                  |
| $n_{Mg}$                          | 0.6                    | 0.59                 |
| $\log K_{Co}$                     | 2.5                    | 3.5                  |
| $n_{Co}$                          | 0.9                    | 0.9                  |
| $\log K_{UO_2^{2+}}$              | 3.84*                  | 6.92*                |
| $n_{UO_2^{2+}}$                   | 0.49*                  | 0.39*                |
|                                   |                        |                      |
|                                   | Carboxylic-type groups | Phenolic-type groups |
| <i>Insolubilised HA</i> $Q_{Max}$ | 1.98**                 | 0.98**               |
| $\log K_H$                        | 4.52**                 | 8**                  |
| $n_H$                             | 0.81**                 | 0.63**               |
| $p$                               | 0.73**                 | 0.83**               |
| $\log K_{UO_2^{2+}}$              | 4.0                    | 5.0                  |
| $n_{UO_2^{2+}}$                   | 0.8                    | 0.6                  |





**Figure 4.** NICA-Donnan prediction: Percentage of uranium (VI) (a), cobalt (b) bound to HA vs log of the total magnesium, calcium concentrations in solution. The calculation is done with  $[HA] = 10\text{mg/L}$ ,  $[U(VI)]_{\text{total}} = 10^{-7}\text{ M}$  for uranium(VI) and with  $[HA] = 50\text{mg/L}$ ,  $[Co]_{\text{total}} = 10^{-7}\text{ M}$  for cobalt at pH 6 and with a ionic strength of  $0.1\text{ M KNO}_3$ .

Calculations show that  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  have no effect on Uranium (VI) speciation under environmental conditions. Whereas the results show that the nature of the alkaline earth cations, i.e.  $\text{Ca}^{2+}$  vs  $\text{Mg}^{2+}$ , has a major effect on the strength of the competition for cobalt(II).

For  $Mg^{2+}$  rich waters the amount of  $Co^{2+}$  bound to the HS could be reduced to 40% while it would only decrease of 10% in presence of the same  $Ca^{2+}$  concentration. Cobalt(II) is more affected by the competition because it is weakly bound to GHA (Marang et al., 2006).  $Mg^{2+}$  ion should therefore be taken into account during natural system speciation calculation, especially for metal ions that bind moderately to HS.

### ***Impact of Donnan effects and specific interactions between the metal ion and membrane on the determination of trace element speciation with the FDM***

The advantage of the FDM technique in comparison with the equilibrium mode (i.e. DMT) is that it can reduce the experimental time as well as the quantification limit for the free metal ion concentration (Marang et al., 2006).

In a previous paper (Marang et al., 2006), limitations of the FDM were forecasted: (i) under particular experimental conditions it will not only measure the free metal ion concentration but also labile metal ion complexes especially when the conditions favour the flux controlled by diffusion in solution; (ii) specific interactions between metal ion and the membrane, and Donnan effects could potentially reduce its detection limits as well as its application for some trace elements. Here, we have clearly shown that in the case of  $Mg^{2+}$ , labile forms of Mg-GHA were detected using the FDM technique. The other conclusion is that in the case of Mg the proportion of the labile complex is a function of the Mg/HA ratio.

Depending on the conditions, it means that when using the FDM, the free metal ion concentration for an element with a low affinity towards HS or a very high water loss rate constant, like  $Pb^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  (Morel, 1983), can only be detected at low metal to ligand ratio. Otherwise, both labile and free metal ion will be measured. Such an information may however be relevant for bio-uptake studies where the flux of element through the membrane is actually more relevant than the free metal ion concentration only (Slaveykova et al., 2004). For such studies the FDM is perfectly suited and could be used to make multi-component experiments which are actually not available and relevant to understand the natural aquatic systems.

Until now the impact of specific interactions and Donnan effects inside the membrane were not discussed. For U(VI)-GHA experiments at  $pH > 4$ , fouling was clearly visible at the surface of the membrane where the donor solution was injected. Moreover, U(VI) concentration were always below detection limits in the acceptor side. This type of obstruction has been previously reported for cation exchange membrane used in water

treatment were portlandite ( $\text{CaOH}_2$ ) precipitated in the membrane at high pH (Ayala-Bribiesca et al., 2006).

In addition to the strong specific interactions of U(VI) with the membrane reactive sites evidenced in the calibration section, and because of the Donnan effects, the precipitation of schoepite ( $\text{UO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) seems to be the cause of the fouling and the lack of transport of uranium through the membrane under these conditions. Indeed, during the transport of the metal through the membrane, there is a high concentration gradient in the Donnan phase (membrane). The concentration of ions in the Donnan phase can be calculated using the Boltzmann equation (1).

$$C_{i,m} = C_i B^{Z_i} \quad \text{with } B = e^{\frac{-F\Psi}{RT}} \quad (1)$$

where  $C_i$  is the free concentration of ion  $i$  in solution ( $\text{mol L}^{-1}$ ),  $C_{i,m}$  the concentration of ion  $i$  in the membrane ( $\text{mol L}^{-1}$ ),  $Z_i$  the charge of ion  $i$ ,  $B$  the Boltzmann factor,  $F$  the Faraday's constant ( $\text{C mol}^{-1}$ ),  $R$  the gas constant ( $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ ),  $T$  the absolute temperature (K) and  $\Psi$  the electrostatic potential in the membrane phase (V).

For a background electrolyte of 2mM of  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ , the Boltzmann factor is equal to 29.9 (Weng et al., 2005). The uranium concentration in the membrane should be at least 894 time ( $B^2$ ) higher than in the donor side. This effect is a potential limitation of the used of FDM as well as DMT to estimate the speciation of some trace elements. This will be the case for trace elements which have a very low solubility and potentially a high affinity towards the membrane binding sites.

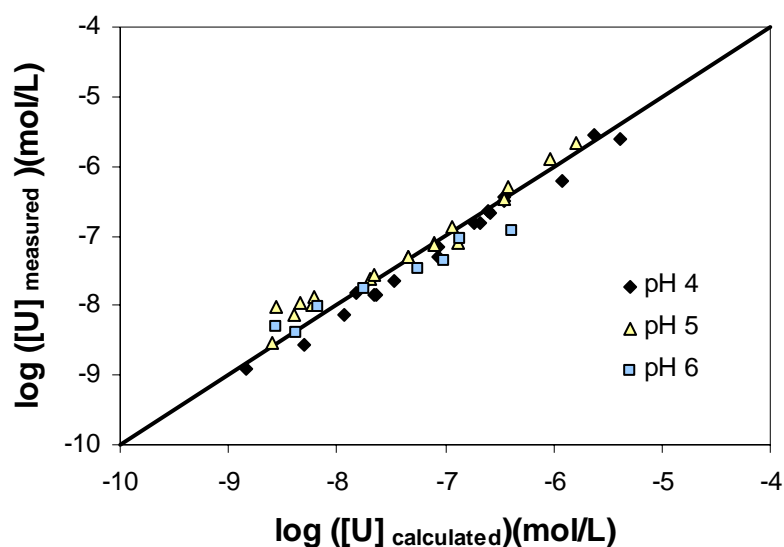
### **Uranium (VI) complexation data**

The  $\text{UO}_2^{2+}$ -HA complex can be considered as inert. Indeed, uranyl is known to bind strongly with HS (Higgo et al., 1993; Czewinski et al., 1994; Glaus et al., 1997) and its water loss rate constant is very small (Morel, 1983). Consequently, the free  $\text{UO}_2^{2+}$  concentration is measured using the FDM whatsoever the experimental conditions.

**Figure 3** shows the experimental data with GHA using FDM or with IHA at pH 4. The difference between both isotherms is due to the difference of reactivity among humic acid. Indeed HS are well known to be chemically complex and heterogeneous (Tipping, 2002). Most have a continuum of properties, as it can be evidenced by the comparison of proton titration of fulvic and humic acid, illustrating a clear difference between their typical protonation behaviour (Milne et al., 2001). Weber et al. (2006) have shown that for IHA, the abundance of the phenolic type of sites is half those of the pristine humic acid. This loss of

reactive sites is due to condensation reactions during insolubilisation process. It explains the shift between both isotherms as well as the different slope reflecting different heterogeneity.

Using the pH, the total uranium(VI) concentration,  $Mg^{2+}$  concentration and GHA concentration, the uranium(VI) bound to GHA was simulated with the NICA-Donnan model using the GHA parameters (**Table 3**) and the U(VI) generic parameters originally from the study of Saito et al. (2004). The good agreement between prediction and experimental data is obtained, which validates the FDM technique as a mean to determine  $UO_2^{2+}$  concentration in solution containing DOM under these conditions. However the uranium(VI) parameters had to be adjusted to fit correctly the IHA experimental data pH dependance (**Figure 2**). The parameters used in the NICA-Donnan prediction are based on experimental data acquired for acid conditions. For this reason, the model could not describe the IHA experimental data which are acquired for higher pH. Site density ( $Q_{max}$ ) and proton parameters (non ideality parameter  $n_H$ , with of the distribution  $p$  and median affinity constant  $\tilde{K}_H$ ) were obtained for carboxylic-type and phenolic-type groups by an acid/base titration of the IHA (Weber et al., 2006).  $Mg^{2+}$  parameters previously obtained with FDM were used (**Table 3**). In the calculation of U(VI) binding to IHA, only the free  $UO_2^{2+}$  ion species was considered to bind specifically.



**Figure 5.** Plot of the calculated uranium concentration with NICA-Donnan model vs the one measured in solution with TRLFS for pH 4, 5 and 6.

**Figure 5** compares the U(VI) concentration measured in the solution and calculated with the NICA-Donnan model for pH 4, 5, 6. The agreement is good ( $R^2= 0.94$ ), and the NICA-Donnan model is now calibrated in the range of pH where U(VI) is bound to HS. The lack of increase at pH 6 may result from the formation of  $\text{UO}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ ,  $(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^+$  and  $(\text{UO}_2)_2\text{CO}_3(\text{OH})_3^-$  complexes that accounts for around 20% under ambient  $\text{CO}_2(\text{g})$  conditions for total U concentration ranging from  $10^{-8}$  to  $10^{-5}$  mol U/L (Guillaumont et al., 2003). Zeh et al (1997) have demonstrated that elevated partial pressures of  $\text{CO}_2(\text{g})$ , significantly limit the formation of U(VI)-HA complexes. Moreover, Glaus *et al.* (1995) only evidence a weak mixed complex of  $\text{UO}_2^{2+}$  with humic acids. The new parameters adjusted in this work can be used to predict the behaviour of uranium in natural samples.

### **Application to field data.**

Ranville et al. (in press) have recently developed a new analytical technique (Asymmetrical flow flow-fractionation) to measure metal speciation in the environment. The authors quantified the association of uranium with natural dissolved organic carbon (DOC) collected from a vertical porewater profile through a clay-rich aquitard. The groundwaters analyzed are described in Jackson et al. (2005). The pH values of these groundwaters are between 7.6 and 7.9. The low measured binding of U by DOC validates that the presence of uranium inorganic complexes leads to a decrease of uranium binding by DOC. The minor amount of the uranium associated to the DOC is in agreement with the results of the modeling performed by ECOSAT including the NICA-Donnan model. With a DOC concentration of 135 mg/L and a concentration of uranium of  $2.5 \times 10^{-6}$  M the calculation yielded to 1.15 % of uranium bound whereas Ranville et al. (in press) measured 0.5 %. It is then confirmed that facilitated transport of uranium by humic colloids is unimportant for aquifers with pH greater than 7 if substantial dissolved carbonate is present. The lower measured amount of uranium associated to DOC could be explained by the fact that DOC from this site is not predominantly HA (Jackson et al., 2005) as it has been assumed in the calculation. This may suggest that the DOC has a weaker affinity for metal as uranium. To check if a more reactive DOC could have an influence on uranium speciation, we decided to model the Gorleben groundwaters. Indeed, the Gorleben groundwater DOC derived from microbial oxidation of sedimentary organic carbon consisted of 90 % of FA+HA and has potentially a greater complexing capacity (Buckau et al., 2000).

Five different Gorleben groundwaters have been analysed by Zeh *et al.* (1997) to evaluate the amount of natural uranium in the colloidal born state. Physical and chemical parameters of

each groundwater are presented in Zeh et al. (1997). The dissolved organic carbon under the colloidal state can be assimilated to HS. The uranium speciation calculated by Zeh et al. (1997) can be compared with the ECOSAT calculation under the same conditions. It has been demonstrated that the complexation studies made on purified Gorleben humic and fulvic acids are applicable to the Gorleben groundwaters containing humic and fulvic acids in colloidal form (Kim et al., 1999). The ECOSAT code predicts that the natural uranium is under the form of an inorganic complexes  $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$ , as it was calculated by Zeh *et al* (1997), whereas the authors have measured that over 75% of the natural uranium is under the colloidal state (e.g. 0.58 nM out of 2.31 nM total uranium for Gohy 532). This high difference could not come from higher reactivity of the DOC. Another explanation for this difference could come from the redox potential (Eh) in the Gorleben groundwaters and the presence of U(IV), as tetravalent actinides may form complexes with humic substances (Reiller, 2005; Warwick et al., 2005). Indeed, the Zeh *et al* (1997) measured Eh values ( $11 < \text{Eh (mV)} < 75$ ) are much lower than those of oxidizing surfaces waters. In the ECOSAT calculation it was assumed that only U(VI) is complexed by the HA. It has been shown that no reduction of U(VI) to U(IV) occurs in contact with NOM in the laboratory (Czerwinski et al., 1994) and that NOM should oxidize U(IV) (Gu et al., 2005). If we assume that  $\text{U(OH)}_4$  binds preferentially to the phenolic type of group of the HA, the adjustment of the experimental data by the NICA-Donnan model leads to unrealistic parameters ( $\log \tilde{K}_{2,\text{U(OH)}_4} = 42$  and  $n_{2,\text{U(OH)}_4} = 0.3$ ) compared to those assumed for  $\text{Th}^{4+}$  and  $\text{U}^{4+}$  (Milne et al., 2003; Reiller, 2005; Warwick et al., 2005). Moreover, using the thermodynamic data available for uranium (Guillaumont et al., 2003), no formation of  $\text{U(OH)}_4(\text{aq})$  could be anticipated under these conditions. Moreover, neither the use of the lower Eh value proposed by Artinger et al. (2002) ( $\text{Eh} = -160$  mV for Gohy 532), nor the evaluation of  $E(\text{UO}_2^{2+}/\text{U}^{4+})$  from IUPAC (+0.319 V in 1999) do end in a more significant proportion of  $\text{U(OH)}_4(\text{aq})$  (less than  $10^{-15}$  and  $10^{-13}$  M respectively). Furthermore, no uranium (IV) phases proposed in Guillaumont et al. (2003) could have precipitated under these conditions. The high measured concentration of uranium-DOC complexes were formed under different conditions.

The desorption behaviours of uranium, europium, and thorium from humic colloids were examined in Gorleben groundwaters by addition of a chelating cation exchange resin (Geckeis et al., 2002). Distinctly different kinetics of individual elements were observed. For example, starting from 100% of metal complexed, after 105 days around 20% of lead, 43 % of uranium (VI) and europium and 73% of thorium still remain bound to the colloidal fraction. This study

shows that metal binding to aquatic colloids can be considerably kinetically stabilized or even irreversible. This result is confirmed by the study of Davis *et al.* (2000) which shows also that thorium (IV) dissociation kinetic is slower than uranium (VI). The dissociation of uranium (IV) can also be considered as very slow by analogy to thorium (IV). The uranium-NOM complexes measured by Zeh *et al.* (1997) could have been formed during the microbial oxidation from bio-reduced uranium (Gu *et al.*, 2005), and, due to their slow dissociations and considerable water mixing in the Gorleben area (Buckau *et al.*, 2000), could be measured under other conditions. Contrary to the previous case (Ranville *et al.*, in press), it is very difficult to come to a conclusion on DOM implication of the uranium speciation under these conditions.

## Conclusion

This paper presents the results of the study of uranium (VI) and magnesium complexation with HA using two new different methodologies. The experimental data show that uranium (VI) is strongly bound to HA for pH inferior to 6. For superior pH elevated partial pressures of CO<sub>2</sub>(g), significantly limit the formation of U(VI) – HA complexes. Magnesium experimental data obtained with FDM show that the proportion of the labile complex is a function of Mg/HA ratio.

The NICA-Donnan model was calibrated from this new experimental data for uranium (VI) and magnesium. A simulation of the potential competitive effect of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> on uranium (VI) and cobalt (II) binding to HA shows that Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> have only a minor effect on uranium (VI) speciation. Whereas the results show that the nature of the alkaline earth cations, i.e. Ca<sup>2+</sup> vs Mg<sup>2+</sup> will have a major effect on the speciation of metal like cobalt which is weakly bound to HA.

The ECOSAT code was then used to predict the uranium speciation in two different groundwaters. In the former (Ranville *et al.*, in press), the measurement of the minor amount of the uranium associated to the DOM is in agreement with the results of the modeling performed by the ECOSAT code including the NICA-Donnan model. The low binding of uranium by DOC measured validates the presence of uranium inorganic complexes leading to a decrease of uranium binding by DOC. Whereas in the latter (Zeh *et al.*, 1997; Artinger *et al.*, 2002), the ECOSAT code predicted that the natural uranium is under the form of UO<sub>2</sub>(CO<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>4-</sup>, whereas Zeh *et al.* (1997) have measured that over 75% of the natural uranium is under the colloidal state. As accounting for U(IV)-DOC complexation would lead to

unrealistic parameters, it seems that these complexes could have been inherited from other conditions, due to the low dissociation kinetic of either U(IV) DOM complexes and water mixing form in the Gorleben groundwaters. More information on field systems including redox control by mineral phases are needed to better ascertain the influence of natural organic matter on the chemistry of uranium.



## REFERENCES

- Alberts, J. J. and Z. Filip (1998). "Metal binding in estuarine humic and fulvic acids: FTIR analysis of humic acid-metal complexes." *Environmental Technology* **19**(9): 923-931.
- Artinger, R., T. Rabung, J. I. Kim, S. Sachs, K. Schmeide, K. H. Heise, G. Bernhard and H. Nitsche (2002). "Humic colloid-borne migration of uranium in sand columns." *Journal Of Contaminant Hydrology* **58**(1-2): 1-12.
- Ayala-Bribiesca, E., G. Pourcelly and L. Bazinet (2006). "Nature identification and morphology characterization of cation-exchange membrane fouling during conventional electro dialysis." *Journal of Colloid and Interface Science* **300**(2): 663.
- Benedetti, M. D. F., C. J. Milne, D. G. Kinniburgh, W. H. van Riemsdijk and L. K. Koopal (1995). "Metal Ion Binding to Humic Substances: Application of the Non-Ideal Competitive Adsorption Model." *Environmental Science & Technology* **29**: 446-457.
- Buckau, G., R. Artinger, P. Fritz, S. Geyer and J. I. Kim (2000). "Origin and mobility of humic colloids in the Gorleben aquifer system." *Appl. Geochem* **15**: 171.
- Choppin, G. R. (1992). "The role of natural organics In radionuclide migration In natural aquifer systems." *Radiochimica Acta* **58-9**: 113-120.
- Crançon, P. and J. van der Lee (2003). "Speciation and mobility of uranium(VI) in humic-containing soils." *Radiochimica Acta* **91**(11): 673-679.
- Czerwinski, K. R., G. Buckau, F. Scherbaum and J. I. Kim (1994). "Complexation Of the Uranyl Ion with aquatic Humic Acid." *Radiochimica Acta* **65**: 111-119.
- Czewinski, K. R., G. Buckau, F. Scherbaum and J. I. Kim (1994). "Complexation Of the Uranyl Ion with aquatic Humic Acid." *Radiochimica Acta* **65**: 111-119.
- Davis, J. A., D. E. Meece, M. Kohler and G. P. Curtis (2004). "Approaches to surface complexation modeling of uranium(VI) adsorption on aquifer sediments." *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **68**(18): 3621-3641.
- Davis, J. R., J. J. W. Higgs, D. J. Noy and P. J. Hooker (2000). Complexation studies of uranium and thorium with a natural fulvic acid. Effect of humic substances on the migration of radionuclides: complexation and transport of actinides (Third technical progress report). G. E. F.-I. Buckau, ZK-INE. Karlsruhe. **Report FZKA 6524**: 87.
- Geckeis, H., T. Rabung, T. N. Manh, J. I. Kim and H. P. Beck (2002). "Humic colloid-borne natural polyvalent metal ions: Dissociation experiment." *Environmental Science & Technology* **36**(13): 2946-2952.
- Glaus, M. A., W. Hummel and L. R. Van Loon (1997). Experimental Determination and Modelling of Trace Metal-Humate Interactions: A pragmatic Approach for Applications in Groudwater. PSI - Bericht 97- 153, Paul Scherrer Institut, Villigen, Switzerland.
- Glaus, M. A., W. Hummel and L. R. Vanloon (1995). "Stability Of Mixed-Ligand Complexes Of Metal-Ions With Humic Substances And Low-Molecular-Weight Ligands." *Environmental Science & Technology* **29**(8): 2150-2153.
- Grenthe, I., L. Fuger, R. G. M. Konings, R. J. Lemire, A. B. Muller, C. Nguyen-Trung and H. Wanner (1992). *Chemical thermodynamics of uranium*, North-Holland: Amsterdam.
- Gu, B. H., H. Yan, P. Zhou, D. B. Watson, M. Park and J. Istok (2005). "Natural humics impact uranium bioreduction and oxidation." *Environmental Science & Technology* **39**(14): 5268-5275.
- Guillaumont, R., T. Fanghänel, J. Fuger, I. Grenthe, V. Neck, D. A. Palmer and M. Rand (2003). "Update on the chemical thermodynamic of uranium, neptunium, plutonium, americium and technetium." North-Holland.
- Hering, J. G. and F. M. M. Morel (1988a). "Humic acid complexation of calcium and copper." *Environmental Science and Technology* **22**: 1234-1237.

- Hering, J. G. and F. M. M. Morel (1988b). "Kinetics of trace metal complexation: role of alkaline-earth metals." *Environmental Science and Technology* **22**: 1469-1478.
- Higgo, J. J. W., D. G. Kinniburgh, B. Smith and E. Tipping (1993). "Complexation Of  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{UO}_2^{2+}$  And  $\text{Ca}^{2+}$  By Humic Substances In Groundwaters." *Radiochimica Acta* **61**(2): 91-103.
- Hsi, C. K. D. and D. Langmuir (1985). "Adsorption Of Uranyl Onto Ferric Oxyhydroxides - Application Of The Surface Complexation Site-Binding Model." *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **49**(9): 1931-1941.
- Hummel, W., G. Anderegg, L. F. Rao, I. Puigdomènech and O. Tochiyama (2005). Chemical thermodynamics of compounds and complexes of U, Np, Pu, Am, Tc, Se, Ni and Zr with selected organic ligands. Amsterdam, Elsevier.
- Jackson, B. P., J. F. Ranville, P. M. Bertsch and A. G. Sowder (2005). "Characterization of colloidal and humic-bound Ni and U in the "dissolved" fraction of contaminated sediment extracts." *Environmental Science & Technology* **39**(8): 2478-2485.
- Keizer, M. G. and W. H. Van Riemsdijk (1994). A computer program for the Calculation of Chemical Speciation and Transport in Soil-Water Systems (ECOSAT 4.7). Wageningen, Agricultural University of Wageningen.
- Kerndorff, H. and M. Schnitzer (1980). "Sorption of metals on humic acid." *Geochimica et Cosmochimica Acta* **44**: 1701-1708.
- Kihara, S., Z. Yoshida, H. Aoyagi, K. Maeda, O. Shirai, Y. Kitatsuji and Y. Yoshida (1999). "A critical evaluation of the redox properties of uranium, neptunium and plutonium ions in acidic aqueous solutions - (Technical report)." *Pure and Applied Chemistry* **71**: 1771.
- Kim, J. I. and C. M. Marquardt (1999). "Chemical reaction of Np(V) with humic colloids in groundwater: Influence of purification on the complexation behaviour." *Radiochimica Acta* **87**(3-4): 105-108.
- Kinniburgh, D. G., C. J. Milne, M. D. F. Benedetti, J. P. Pinheiro, J. Filius and W. H. van Riemsdijk (1996). "Metal Ion Binding by Humic Acid: application of the NICA-Donnan Model." *Environmental Science & Technology* **30**: 1687-1698.
- Kinniburgh, D. G., W. H. van Riemsdijk, L. K. Koopal, M. Borkovec, M. F. Benedetti and M. J. Avena (1999). "Ion binding to natural organic matter: competition, heterogeneity, stoichiometry and thermodynamic consistency." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **151**(1-2): 147-166.
- Lenhart, J. J. and B. D. Honeyman (1999). "Uranium(VI) sorption to hematite in the presence of humic acid." *Geochimica et Cosmochimica Acta* **63**(19-20): 2891.
- Marang, L., P. Reiller, M. Pepe and M. F. Benedetti (2006). "Donnan membrane approach: From equilibrium to dynamic speciation." *Environmental Science & Technology* **40**(17): 5496-5501.
- Milne, C. J., D. G. Kinniburgh and E. Tipping (2001). "Generic NICA-Donnan Model Parameters for Proton Binding by Humic Substances." *Environmental Science & Technology* **35**: 2049-2059.
- Milne, C. J., D. G. Kinniburgh, W. H. van Riemsdijk and E. Tipping (2003). "Generic NICA-Donnan Model Parameters for Metal-Ion Binding by Humic Substances." *Environmental Science & Technology* **37**: 958-971.
- Morel, F. M. M. (1983). Principles of aquatic chemistry, New York: John Wiley.
- Moulin, C., P. Reiller, C. Beaucaire and D. Lemordant (1993). "Time-resolved laser-induced spectrofluorometry for the study of uranium anionic surfactant micelle interactions." *Journal of Colloid and Interface Science* **157**(2): 411-417.
- Payne, T. E., J. A. Davis and T. D. Waite (1996). "Uranium adsorption on ferrihydrite - Effects of phosphate and humic acid." *Radiochimica Acta* **74**: 239-243.

- Pinheiro, J. P., A. M. Mota and M. F. Benedetti (1999). "Lead and calcium binding to fulvic acids: Salt effect and competition." *Environmental Science & Technology* **33**(19): 3398-3404.
- Pinheiro, J. P., A. M. Mota and M. F. Benedetti (2000). "Effect of aluminum competition on lead and cadmium binding to humic acids at variable ionic strength." *Environmental Science & Technology* **34**(24): 5137-5143.
- Pinheiro, J. P., A. M. Mota and H. P. van Leeuwen (1999). "On lability of chemically heterogeneous systems: Complexes between trace metals and humic matter." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **151**(1-2): 181.
- Plancque, G., Y. Maurice, V. Moulin, P. Toulhoat and C. Moulin (2005). "On the use of spectroscopic techniques for interaction studies, part I: Complexation between Europium and small organic Ligands." *Applied Spectroscopy* **59**(4): 432-441.
- Ranville, J. F., M. J. Hendry, T. N. Reszat, Q. Xie and B. D. Honeyman "Quantifying uranium complexation by groundwater dissolved organic carbon using asymmetrical flow field-flow fractionation." *Journal of Contaminant Hydrology* **In Press**, **Corrected Proof**.
- Reiller, P. (2005). "Prognosticating the humic complexation for redox sensitive actinides through analogy, using the charge neutralisation model." *Radiochimica Acta* **93**(1): 43-55.
- Saito, T., S. Nagasaki, S. Tanaka and L. K. Koopal (2004). "Application of the NICA-Donnan model for proton, copper and uranyl binding to humic acid." *Radiochimica Acta* **92**(9-11): 567-574.
- Schmeide, K., S. Pompe, M. Bubner, K. H. Heise, G. Bernhard and H. Nitsche (2000). "Uranium(VI) sorption onto phyllite and selected minerals in the presence of humic acid." *Radiochimica Acta* **88**(9-11): 723-728.
- Seki, H. and A. Suzuki (1995). "Adsorption Of Heavy-Metal Ions Onto Insolubilized Humic-Acid." *Journal Of Colloid And Interface Science* **171**(2): 490-494.
- Slaveykova, V. I., N. Parthasarathy, J. Buffle and K. J. Wilkinson (2004). "Permeation liquid membrane as a tool for monitoring bioavailable Pb in natural waters." *Science of The Total Environment* **328**(1-3): 55.
- Sylwester, E. R., E. A. Hudson and P. G. Allen (2000). "The structure of uranium (VI) sorption complexes on silica, alumina, and montmorillonite." *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **64**(14): 2431-2438.
- Temminghoff, E. J. M., A. C. C. Plette, R. Van Eck and W. H. Van Riemsdijk (2000). "Determination of the chemical speciation of trace metals in aqueous systems by the Wageningen Donnan Membrane Technique." *Analytica Chimica Acta* **417**(2): 149-157.
- Thiry, Y., P. Schmidt, M. Van Hees, J. Wannijn, P. Van Bree, G. Rufyikiri and H. Vandenhove (2005). "Uranium distribution and cycling in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) growing on a revegetated U-mining heap." *Journal Of Environmental Radioactivity* **81**(2-3): 201-219.
- Tipping, E. (2002). *Cation binding by humic substances*, Cambridge Environmental Chemistry Cambridge University Press.
- Tipping, E., C. A. Backes and M. A. Hurley (1988). "The Complexation of Protons, Aluminum and Calcium by Aquatic Humic Substances - a Model Incorporating Binding-Site Heterogeneity and Macroionic Effects." *Water Research* **22**(5): 597-611.
- Turner, G. D., J. M. Zachara, J. P. McKinley and S. C. Smith (1996). "Surface-charge properties and UO<sub>2</sub><sup>2+</sup> adsorption of a subsurface smectite." *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **60**(18): 3399-3414.

- van Leeuwen, H. P., R. M. Town, J. Buffle, R. Cleven, W. Davison, J. Puy, W. H. van Riemsdijk and L. Sigg (2005). "Dynamic speciation analysis and bioavailability of metals in aquatic systems." *Environmental Science and Technology* **39**(22): 8545-8556.
- Warwick, P., N. Evans, A. Hall, G. Walker and E. Steigleder (2005). "Stability constants of U(VI) and U(IV)-humic acid complexes." *Journal Of Radioanalytical And Nuclear Chemistry* **266**(2): 179-190.
- Weber, T., T. Allard, E. Tipping and M. F. Benedetti (2006). "Modeling Iron Binding to Organic Matter." *Environmental Science and Technology* **40** (24): 7488-7493.
- Weng, L. P., W. H. Van Riemsdijk and E. J. M. Temminghoff (2005). "Kinetic aspects of donnan membrane technique for measuring free trace cation concentration." *Analytical Chemistry* **77**(9): 2852-2861.
- Wolf, M., G. Buckau and S. Geyer (2004). Isolation and characterization of new batches of Gohy-573 humic and fulvic acids. Humic Substances in Performance Assessment of Nuclear Waste Disposal: Actinide and Iodine Migration in the Far-Field. Second Technical Progress Report <<http://bibliothek.fzk.de/zb/berichte/FZKA6969.pdf>>. G. Buckau. Karlsruhe: 111-124.
- Yezek, L. P. and H. P. van Leeuwen (2005). "Donnan effects in the steady-state diffusion of metal ions through charged thin films." *Langmuir* **21**(23): 10342-10347.
- Zeh, P., K. R. Czerwinski and J. I. Kim (1997). "Speciation of uranium in Gorleben groundwaters." *Radiochimica Acta* **76**(1-2): 37-44.



## **CHAPITRE 3 : COMBINING SPECTROSCOPIC AND POTENTIOMETRIC APPROACH TO CHARACTERIZE COMPETITIVE BINDING TO HUMIC SUBSTANCES.**

*To be submitted in Environmental Science and Technologies*

*Laura Marang<sup>a,b</sup>, Pascal Reiller<sup>a</sup>, Sascha Eidner<sup>c</sup>, Michael Kumke<sup>c</sup>, Marc F. Benedetti<sup>b\*</sup>*

<sup>a</sup>CEA Saclay, Nuclear Energy Division, DPC/SECR, Laboratoire de Spéciation des  
Radionucléides et des Molécules, BP 11, 91191 Gif sur Yvette, France

<sup>b</sup>Laboratoire de Géochimie des Eaux, Université Paris Diderot, IPGP and UMR CNRS 71574,  
Case Postale 7052, 75251 Paris Cedex 05, France

<sup>c</sup>Institute of Chemistry, University of Potsdam, Karl-Liebknecht-strasse 24-25, 14476 Potsdam,  
Germany



## RESUME

La matière organique naturelle, en particulier les substances humiques (SH), pourrait jouer un rôle important dans le comportement et le transport des terres rares comme l'euporium dans un environnement naturel ou contaminé. Les acides humiques (AH) et fulviques (AF) sont d'excellents analogues de la MON des sols, sédiments et milieux aquatiques. La compréhension des mécanismes de complexation de l'euporium par les SH est essentielle à une meilleure compréhension du comportement des terres rares dans un cycle géochimique environnementale. De plus, l'euporium peut être considéré comme un analogue des actinides (III), la connaissance de son devenir dans l'environnement est nécessaire à l'estimation des risques sanitaires et écologiques. La compétition avec d'autres cations tels que  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ... pourrait influencer le transport et la biodisponibilité de l'euporium. Des expériences de compétition entre cations qui se complexent de manière différente aux AH, permettraient d'obtenir des informations sur le mécanisme de compétition.

Le but de cette étude est d'acquérir de nouvelles données de compétition entre  $Eu^{3+}/Cu^{2+}$  et  $Eu^{3+}/Ca^{2+}$  complexés à un acide humique de Gorbun (AHG). Ces deux cations ont été choisis car ils se complexent de manière différente à GHA. ( $Cu^{2+}$  se complexe essentiellement de manière spécifique et  $Ca^{2+}$  de manière non spécifique à GHA). Les paramètres NICA-Donnan pour les trois cations étudiés ont été obtenus en ajustant le modèle à des données de compétition mesurées par électrode spécifique ionique. Ces paramètres ont alors été validés en comparant la prédiction du modèle à des données de compétition mesurées par spectrofluorimétrie laser résolue dans le temps. Ainsi, un mécanisme de compétition a pu être proposé par le modèle NICA-Donnan. Une excitation indirecte de  $Eu^{3+}$  par un transfert d'énergie par les SH permet d'obtenir des informations sur la manière dont  $Eu^{3+}$  est affecté par la compétition. Ces données ont pu être discutées à l'aide du mécanisme proposé par le modèle NICA-Donnan : une compétition spécifique entre cations par exemple entre  $Eu^{3+}$  et  $Cu^{2+}$  expulse le cation de son site de complexation, celui-ci se trouve alors essentiellement dans la phase de Donnan alors qu'une compétition non spécifique par exemple entre  $Eu^{3+}$  et  $Ca^{2+}$  n'affecte pas son mode de complexation ( $Eu^{3+}$  reste sur le même type de site). La compétition entre  $Eu^{3+}$  et  $Cu^{2+}$  est donc importante car elle affecte à la fois la concentration en  $Eu^{3+}$  libre en solution mais également son mode de complexation à AHG. La compétition avec  $Ca^{2+}$  est par contre négligeable.





# COMBINING SPECTROSCOPIC AND POTENTIOMETRIC APPROACH TO CHARACTERIZE COMPETITIVE BINDING TO HUMIC SUBSTANCES: PART 1.

|   |            |
|---|------------|
| <b>Introduction</b>   | <b>132</b> |
| <b>Experimental Section</b>   | <b>133</b> |
| <i>Ion selective electrode measurements</i>   | 133        |
| <i>Cu binding to Gohy573-HA in the absence and presence of Eu at pH 5.5</i>                                 | 134        |
| <i>Ca binding to Gohy573-HA in the absence and presence of Eu at pH 5.5</i>                                 | 134        |
| <b>Time-resolved luminescence measurement</b>   | <b>135</b> |
| <i>Eu binding to Gohy573-HA in the presence of Cu and Ca at pH 5.5</i>                                      | 136        |
| <i>NICA-Donnan model description</i>  | 136        |
| <i>Model simulations</i>  | 138        |
| <b>Results and Discussion</b>   | <b>138</b> |
| <i>ISE data: Ca and Cu binding to Gohy573-HA in the presence or absence of Eu.</i>                          | 138        |
| <i>TRLFS data: Eu binding to Gohy573-HA in the presence of Ca and Cu.</i>                                   | 141        |
| <i>Modeling: Specific NICA-Donnan Gohy573-HA parameters for Eu, Cu and Ca derived from ISE experiments.</i> | 143        |
| <i>Predicting Ca/Eu and Cu/Eu TRLFS data.</i>   | 145        |
| <i>Eu mobility implication</i>  | 147        |



## ABSTRACT

In an area that contains high concentrations of organic matter, it is expected that natural organic matter plays an important role on the behaviour of Rare Earth Elements (REE) like europium. Competitive interactions with  $H^+$ , inorganic species, major cations ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ...) could influence REE transport and bioavailability. Competitive experiments between cations which can bind differently to humic substances and  $Eu^{3+}$  could bring a better understanding of the competitive mechanisms. The aim of this study is to acquire new data for  $Eu^{3+}/Cu^{2+}$  and  $Eu^{3+}/Ca^{2+}$  competitive binding to the Gorleben Humic acid (GoHy573-HA).  $Ca^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  were chosen because they are known to bind differently to HS (i.e. non specific versus specific binding for  $Ca^{2+}$  and  $Cu^{2+}$ , respectively). The new NICA-Donnan parameters for  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Eu^{3+}$  obtained from competitive binding experiments using  $Ca^{2+}$  or  $Cu^{2+}$  ion selective electrodes were used to simulate Time Resolved Laser Fluorescence Spectroscopy measurements. Based on the model results a competitive mechanism is proposed and the competitive effect of  $Ca^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  on  $Eu^{3+}$  speciation is predicted.

## Introduction

Natural organic matter (NOM) plays a major role on the geochemical cycle of major and trace elements in natural and contaminated environment. The knowledge of radionuclides transport in the geosphere is a key issue for the assessment of the safety of possible radioactive waste repositories. Humic acids (HA) and fulvic acids (FA) provide excellent analogues, for the reactive components of NOM in soils and rivers and can be used to model metal ion binding to NOM. Several trivalent f-block elements are long lived radionuclides typically the actinides (Ac) like Pu, Am and Cm and among the lanthanide (Ln) the  $^{151}\text{Sm}$  isotope. Moreover, analogies between  $\text{Ac}^{3+}$  and  $\text{Ln}^{3+}$  are sometimes used to implement database. So complexation of europium(III) with HA or FA can be considered as an analogue to actinide complexation to NOM as well as a relevant test element for a better understanding of Rare Earth Elements (REE) behavior in complex geochemical environment (i.e. soil solution, soils, and aquifers). Competitive interactions with  $\text{H}^+$ , inorganic species, major cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ...) could influence REE transport and bioavailability. Hence, it is important to obtain reliable  $\text{Eu}^{3+}$  binding data for organic and inorganic ligands and to calibrate the model to predict  $\text{Eu}^{3+}$  speciation in natural multi-component systems (i.e. soils and rivers). High quality data for  $\text{Eu}^{3+}$  complexation with inorganic ligands are already available (Vercouter et al., 2005; Vercouter et al., 2005). Several data sets for  $\text{Eu}^{3+}$  binding to HA and FA are available for different salt level and pH values (Torres et al., 1984; Norden et al., 1993; Lead et al., 1998; Chung et al., 2005). However, these data sets are frequently not interpreted within consistent modeling frameworks approaches which result in diverse and controversial binding constants. Moreover, studies integrating competitive binding effects are scarce. It has been shown that classes of metals are in direct competition (Kerndorff et al., 1980; Alberts et al., 1998; Pinheiro et al., 1999), whereas others are not (Tipping et al., 1988; Hering et al., 1988a; Hering et al., 1988b; Pinheiro et al., 2000). Competitive experiments between cations which can bind differently to humic substances and  $\text{Eu}^{3+}$  could bring new information. Moreover, we believe that the combined use of spectroscopic and potentiometric measurements can help to validate the model choices and bring a better understanding of the competitive mechanisms.

Our aim in the present work is the prediction of the free metal ion concentration in the presence of competing ions for various relevant environmental conditions, with the help of a “unifying”

model because direct measurements are sometimes difficult or time – consuming. We present new data for  $\text{Eu}^{3+}/\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Eu}^{3+}/\text{Ca}^{2+}$  competitive binding to the Gorleben Humic acid (Gohy573-HA).  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  were chosen because they are known to bind differently to HS (i.e. non specific versus specific binding for  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$ , respectively). The competitive binding experiments using  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Cu}^{2+}$  ion selective electrodes (ISE) are used to derive new  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , and  $\text{Eu}^{3+}$  parameters for the Gorleben Humic Acid extracted from the German repository test site (Wolf et al., 2004) within the NICA-Donnan unifying approach. Then, these parameters were used to simulate Time Resolved Laser Fluorescence Spectroscopy (TRLFS) measurements.

## Experimental Section

The humic acid (Gohy573-HA) was extracted from one of the deep groundwaters in the Gorleben area and was provided by Manfred Wolf (GSF). Its isolation, purification and characterisation are described in detail elsewhere (Wolf et al., 2004).

The reagents used were  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  (Certiprep, Spex),  $\text{Eu}(\text{NO}_3)_2$  (europium ICP standard solution, Aldrich),  $\text{KNO}_3$  (Panreac),  $\text{KCl}$  (Suprapur, Merck) for ISE experiments. In the TRLFS experiments the reagents used were  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (Certiprep, Spex),  $\text{EuCl}_3$  (Aldrich) and deionised water (Milli Q, Millipore).

### *Ion selective electrode measurements*

The pH was measured using a pH Metrohm electrode (6.0133.100) and an Ag/AgCl glass reference Metrohm electrode (6.0733.100). After addition of acid or base, the rate of drift for both electrodes was measured after 1 min and readings were accepted when the drift was less than  $0.25 \text{ mV}\cdot\text{min}^{-1}$ . For each data point, the maximum drift monitoring time was 20 min. The pH electrode was calibrated with SCHOTT standards buffers (4.01, 6.87, and 9.18). During the fixed pH experiment, the pH was controlled with  $\text{CO}_2$  free KOH (0.01 M) and  $\text{HNO}_3$  (0.01 M).

### ***Cu binding to Gohy573-HA in the absence and presence of Eu at pH 5.5***

The  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations in solution were measured potentiometrically using a  $\text{Cu}^{2+}$  ISE (Metrohm, 6.0508.140). Routine calibrations were performed at pH 5.5 in the absence of humic acid with total  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations ranging from 0.5  $\mu\text{M}$  to 1mM in 1 mM  $\text{KNO}_3$ . In the first experiment, a solution of Gohy573-HA (60  $\text{mg.L}^{-1}$ ) was titrated to pH 5.5, and then pH was kept constant for 30 min to stabilize the Gohy573-HA before titration with  $\text{Cu}^{2+}$  in the concentration range of 10  $\mu\text{M}$  to 75  $\mu\text{M}$ . In the second experiment, a solution of Gohy573-HA (60  $\text{mg.L}^{-1}$ ) containing 20  $\mu\text{M}$  of  $\text{Cu}^{2+}$  was titrated to pH 5.5 and then pH was kept constant for 30 min before titration with  $\text{Eu}^{3+}$  in the concentration range of 3  $\mu\text{M}$  to 60  $\mu\text{M}$ .

At each step, the concentration of  $\text{Cu}^{2+}$  was measured after the pH has been stabilized at pH 5.5 for 10 min and the drift of the electrode was less than 0.1  $\text{mV.min}^{-1}$ . The total concentration of  $\text{Cu}^{2+}$  in the solution was then corrected from the dilution factor (less than 10 %), and the amount of  $\text{Cu}^{2+}$  bound to Gohy573-HA was calculated as the difference  $\text{Cu}^{2+}(\text{total}) - \text{Cu}^{2+}(\text{free})$ .

### ***Ca binding to Gohy573-HA in the absence and presence of Eu at pH 5.5***

$\text{Ca}^{2+}$  concentrations in solution were measured potentiometrically using a  $\text{Ca}^{2+}$  ISE (Metrohm, 6.0508.110). Routine calibrations were performed at pH 5.5 in the absence of humic acid with total  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations ranging from 0.5  $\mu\text{M}$  to 1mM in 1 mM  $\text{KCl}$ . In the first experiment, a solution of Gohy573-HA (200  $\text{mg.L}^{-1}$ ) was titrated to pH 5.5 and pH was kept constant for 30 min to stabilize the Gohy573-HA before titration with  $\text{Ca}^{2+}$  in the concentration range of 9  $\mu\text{M}$  to 200  $\mu\text{M}$ . In the second experiment, a solution of Gohy573-HA (200  $\text{mg.L}^{-1}$ ) containing 30  $\mu\text{M}$  of  $\text{Ca}^{2+}$  was also titrated to 5.5 and then maintained to 30 min before titration with  $\text{Eu}^{3+}$  in the concentration range of 1  $\mu\text{M}$  to 50  $\mu\text{M}$ .

At each step the concentration of the  $\text{Ca}^{2+}$  was measured after the pH has been stabilized at pH 5.5 for 10 min and the drift of the electrode was less than 0.1  $\text{mV.min}^{-1}$ . The total concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  in the solution was then corrected from the dilution factor (less than 10 %), and the amount of bound  $\text{Ca}^{2+}$  was calculated from the difference  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}} - [\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ .

## Time-resolved luminescence measurement

*Apparatus:* In the time-resolved laser fluorescence spectroscopy (TRLFS) a wavelength tuneable Nd:YAG/OPO system (Spectra Physics/GWU) operating at 20 Hz was used as excitation light source. The spectra were recorded with an intensified CCD camera (Andor Technology) coupled to a spectrograph (MS257 Model 77700A, Oriel Instruments) as detector. The detector allows a spectral resolution of 0.08 nm. For the time-resolved detection the box car technique was used in which the luminescence signal is collected over a certain time interval (gate width) a certain time (gate delay) after excitation by the laser flash.

*Fluorescence measurements procedure:* The free europium concentration in solution was measured using TRLFS. All fluorescence measurements were performed at ambient temperature. The gate delay was 10  $\mu$ s and the gate width was 100  $\mu$ s. It is a great advantage for the interpretation of such data when the experiment is done in such a way that only one, or a few species, contribute to the fluorescence emission of the solution. Europium(III) is often excited to 394 nm which corresponds to its highest resonant absorption transition. We decided to excite the samples at 356 and 361.7 nm. At 361.7 nm the fluorescence spectra contains significant contributions from both free and bound  $\text{Eu}^{3+}$  due to indirect excitation via sensitisation by the ligand (antenna effect). The fluorescence observed corresponds to the  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$  “hypersensitive” transition and the  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$  transition. The excitation of the bound  $\text{Eu}^{3+}$  occurs much more efficiently through the excitation of the Gohy573-HA followed by an energy transfer to the  $\text{Eu}^{3+}$ . At 356 nm, the signal of  $\text{Eu}^{3+}$  in water is negligible under our experimental conditions, and the spectra correspond solely to  $\text{Eu}^{3+}$  bound to Gohy573-HA and excitation via an energy transfer from Gohy573-HA to  $\text{Eu}^{3+}$ . The fluorescence spectra were analyzed with a fit of 2 species: the spectra of a given  $\text{Eu}^{3+}$  concentration totally bound to the Gohy573-HA obtained at 356 nm and the spectra of  $\text{Eu}^{3+}$  in water for the same total  $\text{Eu}^{3+}$  concentration. Before the fit, all spectra obtained in the presence of Gohy573-HA in solution were corrected from the absorption of Gohy573-HA. The percentage of free  $\text{Eu}^{3+}$  solution could be obtained from this fit with an error of 10%.



### ***Eu binding to Gohy573-HA in the presence of Cu and Ca at pH 5.5***

Competition between  $\text{Eu}^{3+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  were made with a Gohy573-HA concentration of  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  and a total  $\text{Eu}^{3+}$  concentration of  $7 \mu\text{M}$ . The salt concentration was equal to  $1 \text{ mM}$  of  $\text{KNO}_3$  and the pH set to  $5.5 \pm 0.1$ . The total  $\text{Cu}^{2+}$  concentration ranged from  $1 \mu\text{M}$  to  $0.3 \text{ mM}$ .

Competition between  $\text{Eu}^{3+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  were made with a Gohy573-HA concentration of  $15 \text{ mg L}^{-1}$  and a  $\text{Eu}^{3+}$  concentration of  $5 \mu\text{M}$  and pH was set at  $5.5 \pm 0.1$ . The total  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ranged from  $1 \mu\text{M}$  to  $0.1 \text{ M}$ . For total  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations lower than  $0.3 \text{ mM}$  the background electrolyte was fixed with  $1 \text{ mM KNO}_3$ . For total  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations ranging from  $0.3 \text{ mM}$  to  $20 \text{ mM}$ , it was fixed with  $0.1 \text{ M KNO}_3$ . For a total  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations higher than  $20 \text{ mM}$  the ionic strength was fixed by the  $\text{Ca}^{2+}$  salt added in the system and calculated for each data points.

### ***NICA-Donnan model description***

Metal ions binding to humic substances is assumed to occur through specific interactions between cations and the “surface” functional groups and non specific binding to any residual negative charge. The specific binding is described by the NICA model and the non specific binding by the Donnan mode (Kinniburgh et al., 1999). In the NICA model the affinity distributions for the different ions are not necessarily of identical shape. As well as a general heterogeneity that is seen for all ions, the NICA model includes ion specific heterogeneity or non ideality. The NICA equation for the overall binding of species  $i$  in the competitive situation is:

$$\theta_{i,t} = \frac{\left(\tilde{K}_i C_{D,i}\right)^{n_i} \left(\sum_i \left(K_i \tilde{C}_{D,i}\right)^{n_i}\right)^p}{\sum_i \left(K_i \tilde{C}_{D,i}\right)^{n_i} + \left(\sum_i \left(K_i \tilde{C}_{D,i}\right)^{n_i}\right)^p} \quad (1)$$

Where  $\theta_{i,t}$  is the fraction of all sites occupied by the species  $i$ ,  $\tilde{K}_i$  is the median value of the affinity distribution for species  $i$ ,  $\tilde{K}_i$  is the median value of the affinity distribution for species  $i$ ,  $p$  is the width of the distribution,  $n_i$  an ion-specific non ideality coefficient and  $C_{D,i}$  the concentration in the Donnan phase.

For humic and fulvic acids, the model is based on a bimodal quasi-gaussian intrinsic affinity distribution for all ions. In the applications of the NICA model, the amount of component  $i$  bound to a given type of site, i.e., carboxylic COOH and/or phenolic OH type groups,  $Q_i$  is given by:

$$Q_i = \theta_{i,i} (n_i / n_H) Q_{\max} \quad (2)$$

Where it is assumed that species  $i$  reacts with one site and  $Q_{\max}$  is the maximum site density for proton binding to one type of site (COOH or OH).  $n_i$  and  $p$  in equation 1 can only be separated using multicomponent data. Therefore, data for metal ion binding is necessary to split the apparent heterogeneity into the generic or intrinsic heterogeneity.

The Donnan model used in combination with NICA has only a single unknown parameter, the Donnan volume, but a critical aspect of the model is how the Donnan volume varies or does not vary with changes in solution chemistry. This point is discussed in (Benedetti et al., 1996; Avena et al., 1999; Avena et al., 1999). It is concluded that the Donnan volume is most sensitive to changes of ionic strength. It does not appear to change during simple acid/base titration. Therefore, an empirical relationship between ionic strength and Donnan volume is used.

The total amount of metal bound ( $Q_{M,i}$  in mol kg<sup>-1</sup>) measured experimentally corresponds to the sum of the specifically bound metal ion to the COOH and OH type site and the amount of metal ion bound in the Donnan phase and is given by

$$Q_{M,i} = Q_i + V_D (C_{D,i} - C_i) \quad (3)$$

Where  $C_i$  is the concentration of the metal ion in the bulk solution (mol.L<sup>-1</sup>) and is related to  $C_{D,i}$  by the Boltzmann factor.

$$C_{D,i} = C_i \exp(-z_i F \Psi_D / RT) \quad (4)$$

Where  $z_i$  is the charge of the metal ion,  $\Psi_D$  is the Donnan potential inside the Donnan gel,  $F$  is the Faraday constant (C.mol<sup>-1</sup>),  $R$  is the gas constant (J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>) and  $T$  is the temperature (K).

As discussed above (Kinniburgh et al., 1999), the simple empirical relation is a good choice for the calculation of the Donnan volume ( $V_D$ ):

$$\log V_D = -1 + b(1 - \log I)$$

where  $b$  is an adjustable parameter with a positive value depending on the humic substances and  $I$  (mol/L) is the ionic strength.

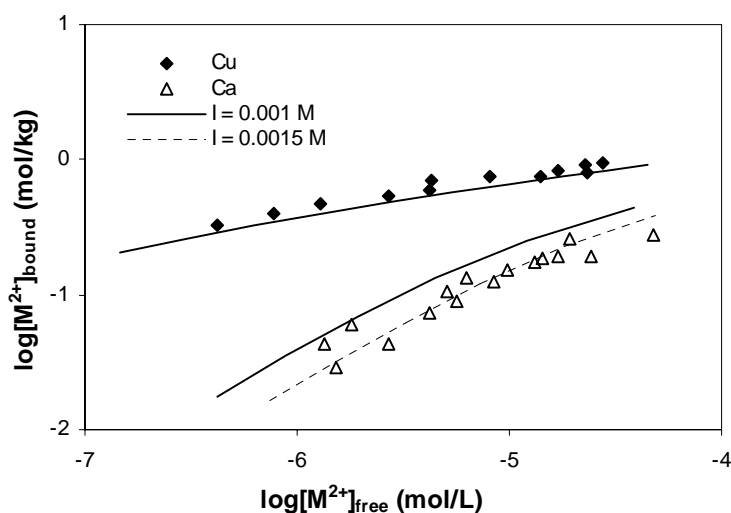
## Model simulations

Chemical calculations were made using ECOSAT (Keizer et al., 1994), which includes speciation with inorganic ligands and the NICA-Donnan model (Kinniburgh et al., 1999) that describes metals and protons complexation with humic substances. The NICA-Donnan model accounts for NOM chemical heterogeneity, competition during binding, and ionic strength effects. In the pH range ( $5.5 \pm 0.1$ ) of our experiments, only  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  coexist together in solution.

## Results and Discussion

### ISE data: Ca and Cu binding to Gohy573-HA in the presence or absence of Eu.

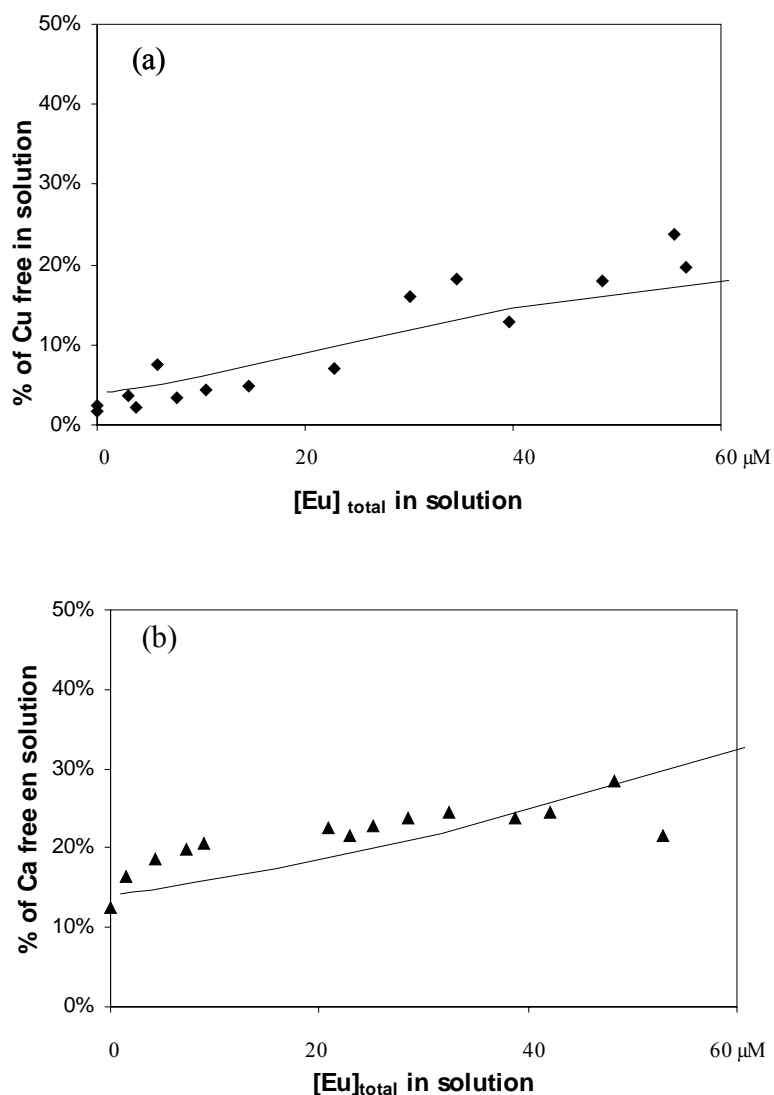
The  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  potentiometric titrations are shown in **Figure 1**.



**Figure 1.**  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  binding isotherms to Gohy573-HA at pH 5.5 with a salt concentration of  $I = 1 \text{ mM KNO}_3$ . The  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  binding to Gohy573-HA was measured with  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  ISE.  $\text{Cu}^{2+}$  binding isotherms correspond to a total amount of 60 mg Gohy573-HA /L with a total copper concentration ranging from 10  $\mu\text{M}$  to 75  $\mu\text{M}$ .  $\text{Ca}^{2+}$  binding isotherms correspond to a total amount of 200 mg Gohy573-HA /L with a total calcium concentration ranging from 9  $\mu\text{M}$  to 200  $\mu\text{M}$ . All data points are used to obtain NICA-Donnan parameters given in **Table 1** corresponding to the fitted model line for a ionic strength of 1 mM or 1.5 mM  $\text{KNO}_3$ .

These are the first  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  data for Gohy573-HA taken from a potential repository site for RN storage. The amount of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  bound is in both cases in the range of previously published data (Kinniburgh et al., 1996; Milne et al., 2003) for  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  binding to humic acids of different origin. However, the unusual slope of the  $\text{Ca}^{2+}$  binding isotherm (i.e. slope = 0.61) compared to the one obtained in a previous study (Benedetti et al., 1995) where the slope was 0.43 could indicate that for the same total amount  $\text{Ca}^{2+}$  binding to Gohy573-HA is more controlled by non-specific binding than when is bound to other HA.

The effect of  $\text{Eu}^{3+}$  is more significant on  $\text{Cu}^{2+}$  than on  $\text{Ca}^{2+}$  binding (**Figure 2**). Indeed for an  $\text{Eu}^{3+}$  concentration added in solution ranging from 0 to 60  $\mu\text{M}$ , the percentage of free  $\text{Cu}^{2+}$  measured in solution increases from 0 to 25% of the total  $\text{Cu}^{2+}$  corresponding to an increase of the free copper concentration in solution by a factor of 10. Whereas for an  $\text{Eu}^{3+}$  concentration ranging from 0 to 60  $\mu\text{M}$ , the percentage of free  $\text{Ca}^{2+}$  measured in solution varies only by a few percent (increase of the free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in solution by a factor of 1.5). Experiments with higher concentrations of  $\text{Eu}^{3+}$  were not performed because they would be irrelevant for most natural or repository conditions.

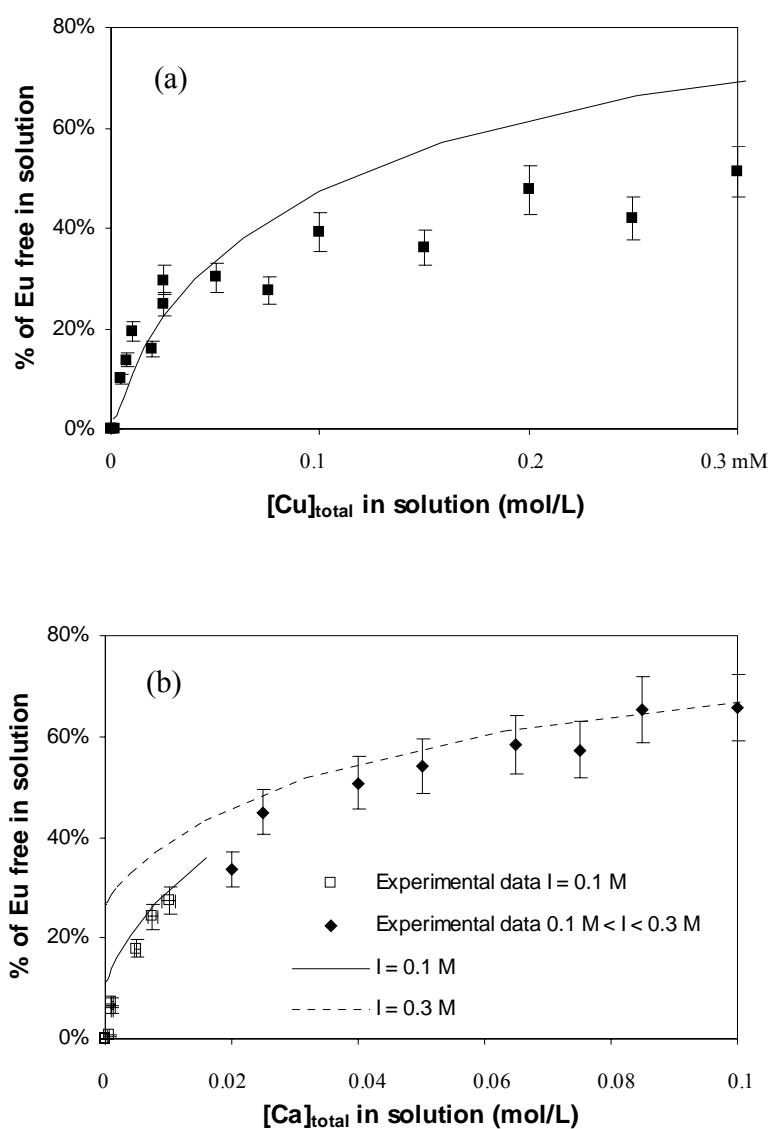


**Figure 2.** Cu-Eu competitive binding to Gohy573-HA (a) and Ca-Eu competitive binding to Gohy573-HA (b) at pH 5.5 with a salt concentration of  $I = 1 \text{ mM KNO}_3$ . The  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  binding to Gohy573-HA were followed with  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  ISE. Cu-Eu competitive experiments correspond to a total amount of 60 mg Gohy573-HA /L with a total copper concentration of 20  $\mu\text{M}$  and with a total europium concentration ranging from 3  $\mu\text{M}$  to 60  $\mu\text{M}$ . Ca-Eu competitive experiments correspond to a total amount of 200 mg Gohy573-HA /L with a total calcium concentration of 30  $\mu\text{M}$  and with a total europium concentration ranging from 1  $\mu\text{M}$  to 50  $\mu\text{M}$ .

All data points are used to obtain NICA –Donnan parameters given in **Table 1** corresponding to the fitted model line.

***TRLFS data: Eu binding to Gohy573-HA in the presence of Ca and Cu.***

The effect of  $\text{Eu}^{3+}$  on  $\text{Cu}^{2+}$  binding to Gohy573-HA measured by TRLFS is more significant than the effect of  $\text{Ca}^{2+}$  (**Figure 3**). The addition of  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations ranging from 0 to 0.4 mM increases the free  $\text{Eu}^{3+}$  concentrations measured in solution by a factor of 6. Whereas, in order to have the same effect on the  $\text{Eu}^{3+}$  binding, it is necessary to raise the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration up to 0.1 M. The competitive  $\text{Ca}^{2+}$  experiments done with a ionic strength fixed to 1 mM, corresponding to the low calcium concentrations, have no effect on  $\text{Eu}^{3+}$  binding to Gohy573-HA. From these competitive experiments, we can conclude that competition between  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Eu}^{3+}$  is more important than for  $\text{Ca}^{2+}$  on  $\text{Eu}^{3+}$  binding even at high  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations. These differences are accounted for if  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Eu}^{3+}$  compete for the same binding sites within a given range of total  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Eu}^{3+}$  concentrations. The  $\text{Ca}^{2+}$  data show that non-specific binding is negligible in the case of  $\text{Eu}^{3+}$  even at low salt level.



**Figure 3.** Eu – Cu competitive binding to Gohy573-HA (20 mg/L) at pH 5.5 with a salt concentration of  $I = 1$  mM and with a total europium concentration of  $7 \mu\text{M}$  and a total copper concentration ranging from  $1 \mu\text{M}$  to  $0.3$  mM (a). Eu-Ca competitive binding to Gohy573-HA (15 mg/L) at pH 5.5 with a salt concentration of  $I = 0.1$  M or  $0.1 \text{ M} < I < 0.3 \text{ M}$  with a total europium concentration of  $5 \mu\text{M}$  and a total calcium concentration ranging from  $1 \mu\text{M}$  to  $0.1$  M (b). The Eu binding to Gohy573-HA was measured with TRLFS. The straight line represents the NICA-Donnan prediction calculated with parameters of Table 1. Error bars correspond to a 10% error on TRLFS experiments.

### **Modeling: Specific NICA-Donnan Gohy573-HA parameters for Eu, Cu and Ca derived from ISE experiments.**

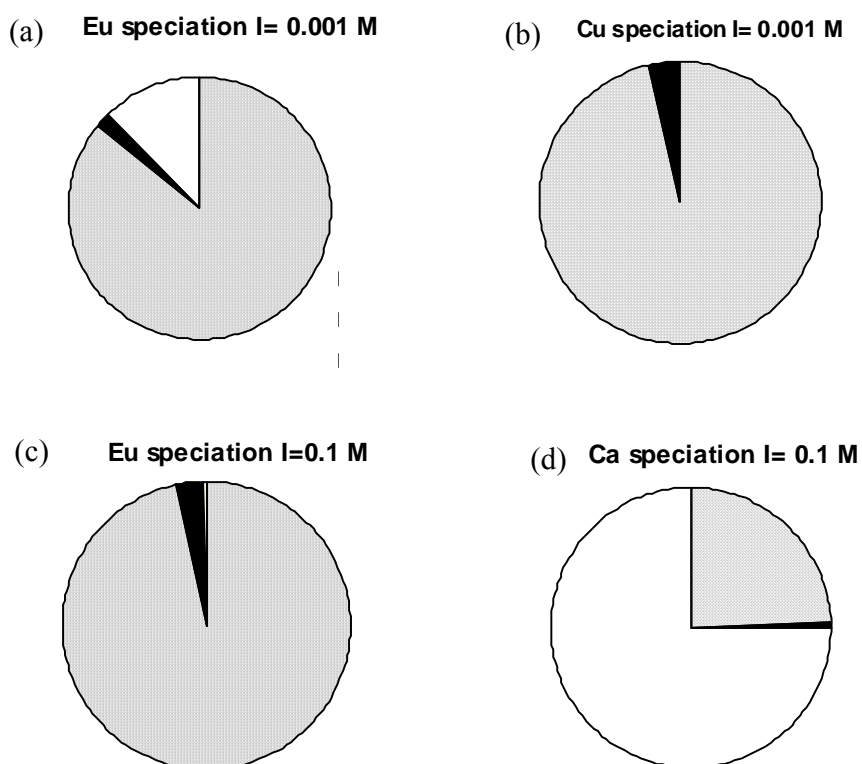
We will first discuss - the generic parameter values for  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  (Milne et al., 2003) published by Milne et al. (2003). Using these parameters, a reasonable description of the competitive effect of  $\text{Eu}^{3+}$  on  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  binding to Gohy573-HA could be achieved (data not shown here). However, to have an accurate description of the actual competitive processes in Gohy573-HA, we have determined the specific Gohy573-HA NICA-Donnan parameters for  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Eu}^{3+}$ . Proton parameters were taken from a previous study (Marang et al., 2006). The other ion specific parameters were obtained by fitting the data acquired in this study. The parameters are given in **Table 1**. To fit correctly the ISE experiments, we had to increase affinity constant values for  $\text{Cu}^{2+}$  for both type of sites and to decrease  $\text{Eu}^{3+}$  affinity constant values for the carboxylic type of sites compared to the generic values proposed by Milne *et al.* (2003). The calcium ISE experiments could be described without changing the generic parameter values, since binding occurred mostly in the Donnan phase (non-specific binding) for this low ionic strength.

**Table 1.** Parameters derived using the NICA-Donnan model. \*Parameters determined by Milne et al. (Milne et al., 2003). The intrinsic heterogeneity parameters  $p$  for Gohy573-HA are  $p_1 = 0.8$  and  $p_2 = 0.41$  and site density  $Q_1 = 2.63$  and  $Q_2 = 3.08$ .

| <b>Metal Ion Binding</b> |       |                    |       |                    |
|--------------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|
|                          | $n_1$ | $\log \tilde{K}_1$ | $n_2$ | $\log \tilde{K}_2$ |
| $\text{H}^+$             | 0.8   | 4.11               | 0.65  | 8.92               |
| $\text{Cu}^{2+}$         | 0.6   | 2.85               | 0.34  | 7                  |
| $\text{Ca}^{2+}$         | 0.78* | -1.37*             | 0.75* | -0.43*             |
| $\text{Eu}^{3+}$         | 0.6   | 1.8                | 0.36* | 3.43*              |



The asset of models which explicitly consider electrostatic effects (like the NICA-Donnan model) is that they can be used not only to calculate the respective contribution for specific binding to carboxylic type or phenolic type of sites, but also to account for non-specific binding through electrostatic effects. The new parameters can be used to simulate the speciation of each cation in the Gohy573-HA (**Figure 4**) under TRLFS experimental conditions.



**Figure 4.**  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , and  $\text{Cu}^{2+}$  individual calculated speciation. The calculations are made with a Gohy573-HA concentration of 20 mg/L and a salt concentration of 1mM for a total europium concentration of 7  $\mu\text{M}$  (a) and for a total copper concentration of 1  $\mu\text{M}$  (b). The calculations are made with a Gohy573-HA concentration of 15 mg/L and a salt concentration of 0.1 M for a total europium concentration of 5  $\mu\text{M}$  (c) and for a total copper concentration of 1 mM (d). The specific binding site ( $\square$ ) ( $\blacksquare$ ) correspond to the low affinity type of sites and high affinity type of sites, respectively. ( $\square$ ) corresponds to the metal ion located in the humic Donnan phase.

The calculations were done for two ionic strengths for  $\text{Eu}^{3+}$  (1 mM and 0.1 M) and for one ionic strength equal to 1mM for  $\text{Cu}^{2+}$  and to 0.1 M for  $\text{Ca}^{2+}$ . For  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Eu}^{3+}$ , binding is dominated

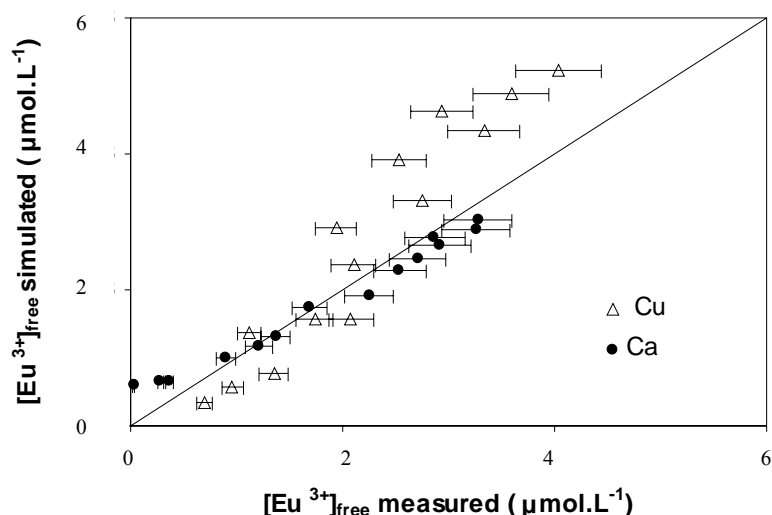
by the carboxylic type sites, i.e. carboxylic groups. Thomason *et al.* (1996) have investigated the binding of  $\text{Eu}^{3+}$  to aquatic humic substances using lanthanide ion probe spectroscopy. The results, which refer to pH 3.5, showed that at the lowest europium loadings approximately four humic ligands atoms were involved in metal binding. At higher loadings, fewer ligand atoms were involved. The authors consider a series of mono-, bi-, tri-, tetra-dentate binding sites, probably due to carboxylate groups. In the NICA-Donnan model, the ratio of the non ideality parameter for metal and proton ( $n_M/n_H$ ) per type of groups can be analyzed to obtain information on the complex stoichiometry (Kinniburgh *et al.*, 1999). The values of the ratio  $n_{1\text{Eu}}/n_{1\text{H}} = 0.75$  and  $n_{2\text{Eu}}/n_{2\text{H}} = 0.55$  suggests that  $\text{Eu}^{3+}$  binds most likely in bidentate form to the two type of groups. This conclusion is supported by the study of Shin *et al.* (1996) who suggested that humic acid have two  $\text{Eu}^{3+}$  binding sites both connected to carboxylic acid groups but from different chemical environment. Cabaniss (1992) used synchronous fluorescence quenching spectra to investigate binding site heterogeneity. The quenching for  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  are similar in shape at pH 5 and 7.5 suggesting in contrast that these metal ions may bind to the same type of sites. It was already demonstrated that  $\text{Pb}^{2+}$  is bound to carboxylic type of groups (Pinheiro *et al.*, 2000). It can then be proposed that it might also be the case for  $\text{Cu}^{2+}$  at pH 5.5.

The fitting of the  $\text{Ca}^{2+}$  data (**Figure 1**) is poor. It is important to give a reasonable description of the binding due to the non-specific interaction and because the Donnan model was proved to be relevant to account for salt effect for HA (Avena *et al.*, 1999). The most likely reason is a poor knowledge of the actual salt concentration. At very low salt levels a small underestimation strongly influences the model outputs. The pH was fixed by adding small amount of KOH and  $\text{KNO}_3$ , this could increase the ionic strength of the solution. If we assume that the ionic strength is higher than expected (i.e. 1.5 mM) a more reasonable description of the  $\text{Ca}^{2+}$  binding is obtained (**Figure 1**).

### **Predicting Ca/Eu and Cu/Eu TRLFS data.**

One of the purposes of modeling is the prediction of free metal ion concentration in solution in the presence of other metal ions for various environment conditions. The direct measurements of all free metal ion concentrations can be difficult and time consuming. Consequently, it is important to check the ability of the NICA-Donnan model to predict the free metal ion concentration in a competitive environment. The free  $\text{Eu}^{3+}$  concentration were determined in TRLFS experiments as a function of the total  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Cu}^{2+}$  concentration and were used to

validate the NICA-Donan parameters (**Figure 3, Table 1**). **Figure 5** presents the free  $\text{Eu}^{3+}$  in solution measured by TRLFS versus the free  $\text{Eu}^{3+}$  calculated by the NICA-Donnan model. Both are in good agreement as the data points cluster along the one to one line meaning that the increasing competitive effects with the increase of the total  $\text{Cu}^{2+}$  or  $\text{Ca}^{2+}$  concentration are accurately predicted.



**Figure 5.** Measured free  $\text{Eu}^{3+}$  concentration versus predicted model values for Eu-Cu and Eu-Ca competitive binding experiments. Error bars correspond to a 10% error on TRLFS experiments.

The model however overestimates the free  $\text{Eu}^{3+}$  in solution for total  $\text{Cu}^{2+}$  concentration higher than 0.08 mM (**Figure 3 and Figure 4**). This could be induced by the lack of data points at higher pH values that are needed to adjust properly the parameters values of the NICA-Donan model corresponding to phenolic type of sites site for both cations. Here,  $\text{Eu}^{3+}$  parameters for phenolic type of groups were taken from Milne *et al.* (2003) without any further adjustment whereas those of  $\text{Cu}^{2+}$  were adjusted. It is known that for high  $\text{Cu}^{2+}$  concentration, its binding is dominated by the phenolic type of groups (Kinniburgh *et al.*, 1996). An underestimation of the  $\log \tilde{K}_{\text{Cu}^{2+}}$  could result because of a stronger  $\text{Cu}^{2+}$  competitive binding in an increase of free  $\text{Eu}^{3+}$  concentration in solution. New data obtained at higher pH under different metal to ligand ratio and  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations are needed to test this hypothesis.

For  $\text{Ca}^{2+}$  competitive experiments, the model describes very well the experimental data even when the ionic strength is controlled by the  $\text{Ca}^{2+}$  salt added in the system ( $0.1 \text{ M} < I < 0.3 \text{ M}$ ) (**Figure 3 and Figure 4**). It confirms that the NICA-Donnan model can describe electrostatic effects when monovalent or divalent cations are used to adjust the ionic strength. The agreement between experimental and calculated speciation therefore validates the NICA-Donnan parameters used for the simulation of competitive binding.

### ***Eu mobility implication***

$\text{Eu}^{3+}$  is strongly bound to Gohy573-HA. Its mobility is determined by the colloidal transport, in particular by NOM. Eu-NOM colloids are less affected in terms of  $\text{Eu}^{3+}$  release in case they are transported through a Ca-rich aquifer (calcareous soil or solution, saline solution) since no desorption is expected because of the lack of competition between  $\text{Eu}^{3+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$ . Nevertheless, variation of colloid stability and particularly of humic colloid size (Caceci et al., 1991; Yates et al., 1999) with Ca and Mg concentration would then be a limiting factor of humic colloid-borne migration of europium. Europium fate can be affected in presence of trace elements like  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  with high affinity for carboxylic type sites and also by  $\text{Cu}^{2+}$  at low pH conditions. In such cases significant amounts of  $\text{Eu}^{3+}$  can be released in solution as free  $\text{Eu}^{3+}$  and be more available for bio-uptake. An even stronger effect can be expected in case  $\text{Al}^{3+}$  is present in solution since both trivalent cations would compete for the same sites.

## REFERENCES

- Alberts, J. J. and Z. Filip (1998). "Metal binding in estuarine humic and fulvic acids: FTIR analysis of humic acid-metal complexes." *Environmental Technology* **19**(9): 923-931.
- Avena, M. J., L. K. Koopal and W. H. van Riemsdijk (1999). "Proton Binding to Humic Acids: Electrostatic and Intrinsic Interactions." *Journal of Colloid and Interface Science* **217**(1): 37.
- Avena, M. J., A. W. P. Vermeer and L. K. Koopal (1999). "Volume and structure of humic acids studied by viscometry pH and electrolyte concentration effects." *Colloids And Surfaces A-Physicochemical And Engineering Aspects* **151**(1-2): 213-224.
- Benedetti, M. D. F., C. J. Milne, D. G. Kinniburgh, W. H. van Riemsdijk and L. K. Koopal (1995). "Metal Ion Binding to Humic Substances: Application of the Non-Ideal Competitive Adsorption Model." *Environmental Science & Technology* **29**: 446-457.
- Benedetti, M. D. F., W. H. van Riemsdijk and L. K. Koopal (1996). "Humic substances considered as a heterogeneous donnan gel phase." *Environmental Science and Technology* **30**(6): 1805-1813.
- Cabaniss, S. E. (1992). "Synchronous Fluorescence-Spectra Of Metal-Fulvic Acid Complexes." *Environmental Science & Technology* **26**(6): 1133-1139.
- Caceci, M. and V. Moulin (1991). Investigations of humic acid samples of different sources by photon correlation spectroscopy. Lecture notes in Earth Sciences, Humic Substances in the Aquatic and Terrestrial Environment, B.Allard, H.Boren & A.Grimwall Eds: 97-104.
- Chung, K. H., W. Lee, Y. Cho, G. S. Choi and C. W. Lee (2005). "Comparison of synchronous and laser-induced fluorescence spectroscopy applied to the Eu(III)-fulvate complexation." *Talanta* **65**(2): 389-395.
- Hering, J. G. and F. M. M. Morel (1988a). "Humic acid complexation of calcium and copper." *Environmental Science and Technology* **22**: 1234-1237.
- Hering, J. G. and F. M. M. Morel (1988b). "Kinetics of trace metal complexation: role of alkaline-earth metals." *Environmental Science and Technology* **22**: 1469-1478.
- Keizer, M. G. and W. H. Van Riemsdijk (1994). A computer program for the Calculation of Chemical Speciation and Transport in Soil-Water Systems (ECOSAT 4.7). Wageningen, Agricultural University of Wageningen.
- Kerndorff, H. and M. Schnitzer (1980). "Sorption of metals on humic acid." *Geochimica et Cosmochimica Acta* **44**: 1701-1708.
- Kinniburgh, D. G., C. J. Milne, M. D. F. Benedetti, J. P. Pinheiro, J. Filius and W. H. van Riemsdijk (1996). "Metal Ion Binding by Humic Acid: application of the NICA-Donnan Model." *Environmental Science & Technology* **30**: 1687-1698.
- Kinniburgh, D. G., W. H. van Riemsdijk, L. K. Koopal, M. Borkovec, M. F. Benedetti and M. J. Avena (1999). "Ion binding to natural organic matter: competition, heterogeneity, stoichiometry and thermodynamic consistency." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **151**(1-2): 147-166.
- Lead, J. R., J. Hamilton-Taylor, A. Peters, S. Reiner and E. Tipping (1998). "Europium binding by fulvic acids." *Analytica Chimica Acta* **239**: 171-180.
- Marang, L., P. Reiller, M. Pepe and M. F. Benedetti (2006). "Donnan membrane approach: From equilibrium to dynamic speciation." *Environmental Science & Technology* **40**(17): 5496-5501.

- Milne, C. J., D. G. Kinniburgh, W. H. van Riemsdijk and E. Tipping (2003). "Generic NICA-Donnan Model Parameters for Metal-Ion Binding by Humic Substances." *Environmental Science & Technology* **37**: 958-971.
- Norden, M., J. H. Ephraim and B. Allard (1993). "The binding of strontium and europium by an aquatic fulvic acid - ion exchange distribution and ultrafiltration studies." *Talanta* **40**: 1425-1432.
- Pinheiro, J. P., A. M. Mota and M. F. Benedetti (1999). "Lead and calcium binding to fulvic acids: Salt effect and competition." *Environmental Science & Technology* **33**(19): 3398-3404.
- Pinheiro, J. P., A. M. Mota and M. F. Benedetti (2000). "Effect of aluminum competition on lead and cadmium binding to humic acids at variable ionic strength." *Environmental Science & Technology* **34**(24): 5137-5143.
- Shin, H. S., S. W. Rhee, B. H. Lee and C. H. Moon (1996). "Metal binding sites and partial structures of soil fulvic and humic acids compared: Aided by Eu(III) luminescence spectroscopy and DEPT/QUAT C-13 NMR pulse techniques." *Organic Geochemistry* **24**(5): 523-529.
- Thomason, J. W., W. Susetyo and L. A. Carreira (1996). "Fluorescence studies of metal humic complexes with the use of lanthanide ion probe spectroscopy." *Applied Spectroscopy* **50**(3): 401-408.
- Tipping, E., C. A. Backes and M. A. Hurley (1988). "The Complexation of Protons, Aluminum and Calcium by Aquatic Humic Substances - a Model Incorporating Binding-Site Heterogeneity and Macroionic Effects." *Water Research* **22**(5): 597-611.
- Torres, R. A. and G. R. Choppin (1984). "Europium(III) and Americium(III) Stability constants with Humic Acid." *Radiochimica Acta* **35**: 143-148.
- Vercouter, T., B. Amekraz, C. Moulin, E. Giffaut and P. Vitorge (2005). "Sulfate complexation of trivalent lanthanides probed by nanoelectrospray mass spectrometry and time-resolved laser-induced luminescence." *Inorganic Chemistry* **44**(21): 7570-7581.
- Vercouter, T., P. Vitorge, N. Trigoulet, E. Giffaut and C. Moulin (2005). "Eu(CO<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>3-</sup> and the limiting carbonate complexes of other M<sup>3+</sup> f-elements in aqueous solutions: a solubility and TRLFS study." *New Journal of Chemistry* **29**(4): 544-553.
- Wolf, M., G. Buckau and S. Geyer (2004). Isolation and characterization of new batches of Gohy-573 humic and fulvic acids. Humic Substances in Performance Assessment of Nuclear Waste Disposal: Actinide and Iodine Migration in the Far-Field. Second Technical Progress Report <<http://bibliothek.fzk.de/zb/berichte/FZKA6969.pdf>>. G. Buckau. Karlsruhe: 111-124.
- Yates, L. M. and R. von Wandruszka (1999). "Effects of pH and metals on the surface tension of aqueous humic materials." *Soil Science Society Of America Journal* **63**(6): 1645-1649.



# COMBINING SPECTROSCOPIC AND POTENTIOMETRIC APPROACH TO CHARACTERIZE COMPETITIVE BINDING TO HUMIC SUBSTANCES: PART 2.

|   |            |
|---|------------|
| <b>Introduction</b>   | <b>153</b> |
| <b>Experimental Section</b>   | <b>154</b> |
| <i>Time-resolved luminescence measurements</i>  | 154        |
| <i>Eu<sup>3+</sup> binding to Gohy573-HA in the presence of Cu<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> at pH 5.5</i> | 155        |
| <i>NICA-Donnan model</i>  | 155        |
| <b>Results and Discussion</b>   | <b>156</b> |
| <i>Evolution of Eu<sup>3+</sup> fluorescence spectra in presence of Ca<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup></i>   | 156        |
| <i>Evolution of the fluorescence lifetime in the case of Cu</i>   | 161        |
| <i>Competition mechanism proposed by the NICA-Donnan model</i>  | 162        |





## Introduction

Humic substances (HS) represent up to 70% of the natural organic matter (Tipping, 2002) and play a key role in metal ion behavior in the environment because of their ability to complex metal ions and thus to partly control metal ion concentrations in soils and aquifers (Buffle, 1988). Knowledge of the complexation of metals by HS is required to understand pollutant behavior in the environment and, particularly in the case of radioactive waste disposal, to understand radionuclide transport from a source to the biosphere. Despite the large number of data available for the complexation of radionuclide by HS, there are scarce data including the competition between cations. It has been shown that classes of metals are in direct competition (Kerndorff et al., 1980; Alberts et al., 1998; Pinheiro et al., 1999), whereas others are not (Tipping et al., 1988; Hering et al., 1988a; Hering et al., 1988b; Pinheiro et al., 2000). Competition mechanisms between classes of cations can only be simulated by two models, NICA-Donnan model and model VI, but model calculations were never checked spectroscopically. In other words are the model binding sites involved in the competition relevant? In the investigations of the interaction mechanism of metal ions and HS, lanthanide fluorescent ions like  $\text{Eu}^{3+}$  are useful probes. The ratio of the  $\text{Eu}^{3+}$  luminescence bands ( $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$  and  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$ ) as well as the relative position of the  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$  transition have been used for the determination of the conditional binding constant of  $\text{Eu}^{3+}$  complexed by HS or inorganic complexes (Moulin et al., 1999; Plancque et al., 2003; Vercoeur et al., 2005). From time resolved luminescence measurements, Kumke *et al.* (2005) show that energy transfer between HS and  $\text{Ln}^{3+}$  is responsible for the observed luminescence decay characteristics. Indeed the sensitization of  $\text{Eu}^{3+}$  luminescence in HS complexes is very effective; it could give information about the site characteristic were  $\text{Eu}^{3+}$  binds to HS. In a companion study, the NICA-Donnan model parameters have been calibrated for  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  when complexed by the Gorleben Humic Acid (Gohy573-HA), and they were used to simulate competitive experiments where free  $\text{Eu}^{3+}$  concentration was measured by Time Resolved Laser Fluorescence Spectroscopy (TRLFS) (Marang et al.). The good agreement between measurements and calculation validates the parameters.

The aim of the present study is to confront the proposed competition mechanism between  $\text{Eu}^{3+}/\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Eu}^{3+}/\text{Cu}^{2+}$  with the experimental spectroscopic data obtained with TRLFS. The excitation of  $\text{Eu}^{3+}$  will be done indirectly using the so called “antenna effect” (Billard et al., 2006)

by exciting the Gohy573-HA. Then the fluorescence spectra obtained by energy transfer is characteristic of the  $\text{Eu}^{3+}$  bound to Gohy573-HA.

## Experimental Section

The humic acid (Gohy573-HA) was extracted from one of the deep groundwaters in the Gorleben area and was provided by Manfred Wolf (GSF). Its isolation, purification and characterisation are described in detail elsewhere (Wolf et al., 2004).

The reagents used were  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (Certiprep, Spex),  $\text{KNO}_3$  (Panreac), and water (Milli Q, Millipore).

### ***Time-resolved luminescence measurements***

*Apparatus:* In the time-resolved laser fluorescence spectroscopy (TRLFS) a wavelength tuneable Nd:YAG/OPO system (Spectra Physics/GWU) operating at 20 Hz was used as excitation light source. The spectra were recorded with an intensified CCD camera (Andor Technology) coupled to a spectrograph (MS257 Model 77700A, Oriel Instruments) as detector. The detector allows a spectral resolution of 0.08 nm. For the time-resolved detection the box car technique was used in which the luminescence signal is collected over a certain time interval (gate width) a certain time (gate delay) after excitation by the laser flash.

*Fluorescence measurements procedure:* All fluorescence measurements were performed at ambient temperature. The gate delay was 10  $\mu\text{s}$  and the gate width was 100  $\mu\text{s}$ . It is a great advantage for the interpretation of such data when the experiment is done in such a way that only one, or a few species, contribute to the fluorescence emission of the solution.  $\text{Eu}^{3+}$  is often excited to 394 nm which corresponds to a resonant absorption transition in the metal ion. The excitation wavelength was chosen as  $\lambda_{\text{exc}} = 356 \text{ nm}$ , where the  $\text{Eu}^{3+}$  signal is negligible under our conditions. Hence, the obtained spectra correspond to  $\text{Eu}^{3+}$  totally bound to Gohy573-HA, excited by an energy transfer from Gohy573-HA to  $\text{Eu}^{3+}$ . The excitation of the  $\text{Eu}^{3+}$  bound occurs much more efficiently through the excitation of the Gohy573-HA followed by an energy transfer. The observed fluorescence corresponds to the  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$  “hypersensitive” transition (around 618 nm), the  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$  transition (around 593 nm), and the  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_0$  (around 580nm).

### ***Eu<sup>3+</sup> binding to Gohy573-HA in the presence of Cu<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> at pH 5.5***

Under our conditions, from thermodynamic calculation, only Eu<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and Cu<sup>2+</sup> ions are the dominant species exist in solution. Competitive experiments between Eu<sup>3+</sup> and Cu<sup>2+</sup> were made with a Gohy573-HA concentration of 20 mg.L<sup>-1</sup> with a total Eu<sup>3+</sup> concentration of 7 μM. The salt concentration was fixed with 1 mM of KNO<sub>3</sub> and the pH fixed at 5.5 ± 0.1, using freshly prepared KOH and HNO<sub>3</sub>. The total Cu<sup>2+</sup> concentration ranged from 1 μM to 0.3 mM.

Competition experiments between Eu<sup>3+</sup> and Ca<sup>2+</sup> were made for a Gohy573-HA concentration of 15 mg L<sup>-1</sup> with a total Eu<sup>3+</sup> concentration of 5 μM with the pH fixed at 5.5 ± 0.1. The [Ca]<sub>total</sub> ranged from 1 μM to 0.1 M when [Ca]<sub>total</sub> < 0.3 mM the background electrolyte was fixed with 1 mM KNO<sub>3</sub> and for 0.3 ≤ [Ca]<sub>total</sub> (mM) ≤ 20, it was fixed with 0.1 M KNO<sub>3</sub>. When [Ca]<sub>total</sub> > 20 mM the ionic strength was fixed by the calcium salt added in the system.

### ***NICA-Donnan model***

Chemical calculations were made using ECOSAT speciation program (Keizer et al., 1994), which includes both speciation with inorganic ligands and the NICA-Donnan model (Kinniburgh et al., 1999) that describes metals and protons complexation with humic substances. The NICA-Donnan accounts for NOM chemical heterogeneity, competition during binding, and ionic strength effects. The NICA-Donnan parameters for Eu<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and Cu<sup>2+</sup> are given in **Table 1**.

**Table 1.** Parameters used for the  $\text{Eu}^{3+}$  speciation bound to Gohy573-HA calculation by the NICA-Donnan model. The intrinsic heterogeneity parameters  $p$  for Gohy573-HA are  $p_1 = 0.8$  and  $p_2 = 0.41$  and site density  $Q_1 = 2.63$  and  $Q_2 = 3.08$ .

| <b>Metal Ion Binding</b> |       |                    |       |                    |
|--------------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|
|                          | $n_1$ | $\log \tilde{K}_1$ | $n_2$ | $\log \tilde{K}_2$ |
| $\text{H}^+$             | 0.8   | 4.11               | 0.65  | 8.92               |
| $\text{Cu}^{2+}$         | 0.6   | 2.85               | 0.34  | 7                  |
| $\text{Ca}^{2+}$         | 0.78  | -1.37              | 0.75  | -0.43              |
| $\text{Eu}^{3+}$         | 0.6   | 1.8                | 0.36  | 3.43               |

## Results and Discussion

### ***Evolution of $\text{Eu}^{3+}$ fluorescence spectra in presence of $\text{Ca}^{2+}$ and $\text{Cu}^{2+}$***

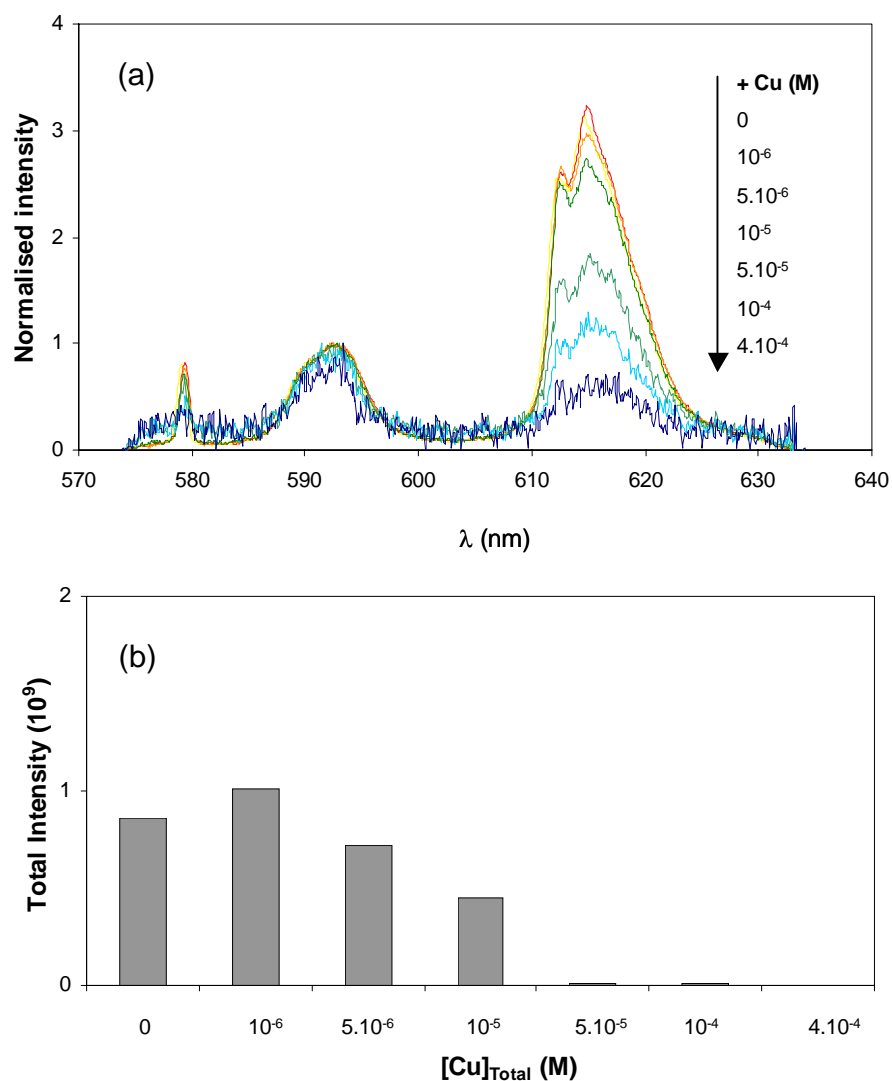
It has been first checked that the  $\text{Eu}^{3+}$  fluorescence in aqueous solution is not quenched by the presence of high concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Cu}^{2+}$ . This has also been verified by other authors (Sakamoto et al., 1991; Sakamoto et al., 1994; Manseki et al., 1998).

The evolutions of the  $\text{Eu}^{3+}$  fluorescence spectra with the total concentration of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  are presented on **Figure 1** and **Figure 2**. The original spectra are characteristic of an  $\text{Eu}^{3+}$ -HA complex where the peak ratio ( ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2 / {}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$ ) is around 3.2. The fine structure due to the degenerescence of the  ${}^7\text{D}_0 \rightarrow \text{F}_2$  is evidenced by a shoulder at 613 nm. The excitation spectra obtained at  $\lambda_{\text{exc}} = 356$  nm are characteristic of the complexed  $\text{Eu}^{3+}$  via an energy transfer (Kumke et al., 2005), while the free  $\text{Eu}^{3+}$  is not detected under these conditions. This energy transfer can be due to a resonance phenomenon or to an electronic exchange mechanism. As the distance between the ligands and  $\text{Eu}^{3+}$  is relatively short, an exchange mechanism could be favored. However, in the case of humic substances, the relation between the complexation sites and the chromophores implied in the energy transfer has not been demonstrated unequivocally: the

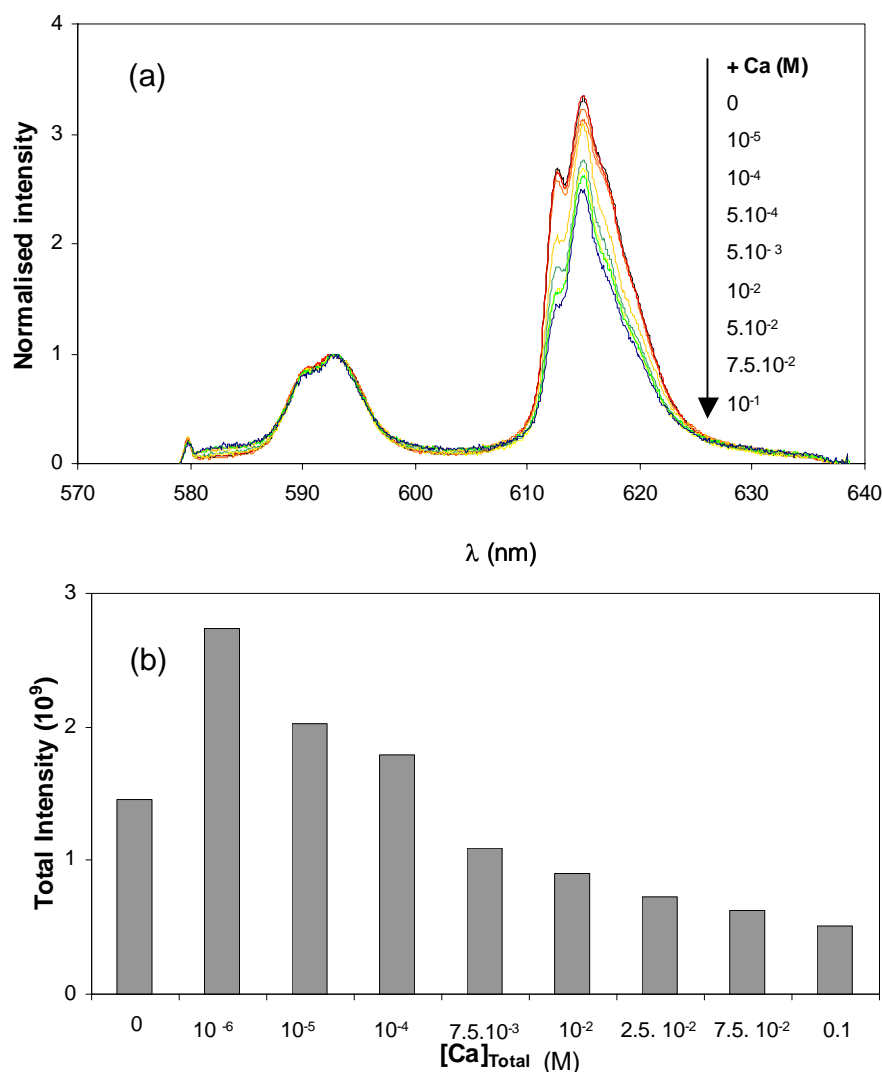
resonance phenomenon cannot be ruled out. The energy transfer would only be effective if  $\text{Eu}^{3+}$  is directly in interaction with the HA and at a short distance to the chromophores implied in the transfer.

The modification of the  $\text{Eu}^{3+}$  fluorescence spectrum in presence of  $\text{Cu}^{2+}$  is presented on **Figure 1a**. Despite of the high noise to signal ratio observed for the highest  $\text{Cu}^{2+}$  concentration, the “secondary” peak at 613 nm can still be discerned. When  $[\text{Cu}]_{\text{total}} < 50 \mu\text{M}$ , there is no modification of the fluorescence spectra,  $\text{Eu}^{3+}$  environment seems to be influenced by similar type of groups. Conversely, the peak ratio ( ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2 / {}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$ ) of  $\text{Eu}^{3+}$  spectrum is decreasing when the  $\text{Cu}^{2+}$  concentration increases (50  $\mu\text{M}$  to 0.4 mM), gradually approaching the one of the aqueous  $\text{Eu}^{3+}$ . The  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_0$  transition is also decreasing, which indicates that  $\text{Eu}^{3+}$  complexed by Gohy573-HA under these conditions recovers its centro symmetry.

The total fluorescence intensity also decreases when  $\text{Cu}^{2+}$  concentration increases (**Figure 1b**). It can be related with the decrease in  $\text{Eu}^{3+}$ - Gohy573-HA proportion due to the competition with  $\text{Cu}^{2+}$ . On other systems, it has been shown that a quenching of  $\text{Eu}^{3+}$  fluorescence is induced by  $\text{Cu}^{2+}$  when they are bound to sites related to aromatic structures (Sakamoto et al., 1991; Sakamoto et al., 1994; Manseki et al., 1998). This quenching obviously only weakly affects the peak ratio ( ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2 / {}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$ ) (Sakamoto et al., 1991; Sakamoto et al., 1994). Up to now the static or kinetic origin of this quenching is not clear. The  $\text{Eu}^{3+}$  spectrum for the highest  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations could be related with the  $\text{Eu}^{3+}$ - Gohy573-HA fraction which is not complexed closely to  $\text{Cu}^{2+}$ . The energy transfer from the Gohy573-HA chromophores to this different environment is much less effective and the fluorescence intensity is much weaker (**Figure 1b**). For these pH values,  $\text{Cu}^{2+}$  is bound by proton low affinity sites (Marang et al.), which are considered as carboxylic like. The strong modification of the spectra and the strong quenching of the  $\text{Eu}^{3+}$  fluorescence validates the fact that  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Eu}^{3+}$  compete for the same type of sites and that  $\text{Eu}^{3+}$  is mostly complexed by carboxylic type groups. This finding is supported by previous spectroscopic observations of Thomason *et al.*(1996) and Shin *et al.*(1996).



**Figure 1.** Fluorescence spectra of a solution of  $\text{Eu}^{3+}$  ( $7 \mu\text{M}$ ) and HA with a concentration of  $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  at pH 5.5 (a) and the intensity of the fluorescence (b). The total  $\text{Cu}^{2+}$  concentration ranges from  $1 \mu\text{M}$  to  $0.4 \text{ mM}$ .



**Figure 2.** Fluorescence spectra of a solution of  $\text{Eu}^{3+}$  ( $5 \mu\text{M}$ ) and HA with a concentration of  $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  at pH 5.5 (a) and the intensity of the fluorescence (b). The total  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ranges from  $10 \mu\text{M}$  to 0.1 M.

The increase of the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in solution implies a modification of both the fluorescence spectrum and the total fluorescence intensity of  $\text{Eu}^{3+}$ -Gohy573-HA complexes (**Figure 2**). The “secondary” peak at 613 nm within the  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$  transitions decreases relatively to the 615 nm “main” peak. Conversely, the increase of the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration do not induce a modification of the  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$  nor in the  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_0$  transitions. The competition with  $\text{Ca}^{2+}$  ions implies therefore a change in the  $\text{Eu}^{3+}$  environment within the Gohy573-HA structure. As said earlier,  $\text{Eu}^{3+}$  is mainly complexed by carboxylic type groups at pH 5.5. The increase of the ionic



strength (i.e.  $[\text{Ca}]_{\text{total}} < 0.3 \text{ mM}$  the background electrolyte was fixed with  $1 \text{ mM KNO}_3$  and for  $0.3 \leq [\text{Ca}]_{\text{total}} (\text{mM}) \leq 20$ , it was fixed with  $0.1 \text{ M KNO}_3$ ) does not modify the spectra. This lack of modification is interpreted by the less efficient energy transfer to  $\text{Eu}^{3+}$  when it is electrostatically bound to Gohy573-HA. Two hypotheses can be proposed to account for spectroscopic observations: either the complexation of  $\text{Eu}^{3+}$  occurs on different sites due to the metal ion competition (from carboxylic type of groups to phenolic type of groups), or it is evolving within the same type of sites through a rearrangement. Even if both hypothesis would correspond to the model calculations, it is not possible to choose between them since the quantum ratio of these species are not known. Further experiment would be necessary at higher pH values in order to favor these phenolic type of sites.

It is noteworthy that the  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations increase from  $1 \text{ }\mu\text{M}$  to  $0.1 \text{ mM}$  leads to higher  $\text{Eu}^{3+}$ -Gohy573-HA total fluorescence intensity (**Figure 2b**) compared to total intensity value in absence of  $\text{Ca}^{2+}$ . Moreover, the shape of the spectra can be directly compared. Under these conditions, it has been shown that the proportion of  $\text{Eu}^{3+}$ -Gohy573-HA complex is not affected (Marang et al.). The increase of the intensity can be related to the influence of alkaline earth metals on the structure of HS. Cabaniss (1992) has shown that the fluorescence of a fulvic acid increases in the presence of  $\text{Mg}^{2+}$ , suggesting that  $\text{Mg}^{2+}$  influences HS structure. Moreover, it has been shown that the variation of the size of the humic acid aggregates is closely related to  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (Caceci et al., 1991). Hence, it seems that alkaline earth ions influence the HS structure without modifying the environment of the chromophores that are implied in the energy transfer from HS to  $\text{Eu}^{3+}$ .

For higher  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}} > 0.1 \text{ mM}$ ) the competition is more effective. The fluorescence intensity decrease and is related to the decrease of the amount of  $\text{Eu}^{3+}$  bound to Gohy573-HA. A comparable feature was already observed in the case of  $\text{Dy}^{3+}$  in competition with  $\text{Ca}^{2+}$  using Aldrich humic acid (Moulin et al., 1992). For the highest  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations a gradual increase of the background noise at the shorter wavelength is observed, which can be related to diffusion with an increase of the size of the HA aggregates (Caceci et al., 1991).

### ***Evolution of the fluorescence lifetime in the case of Cu***

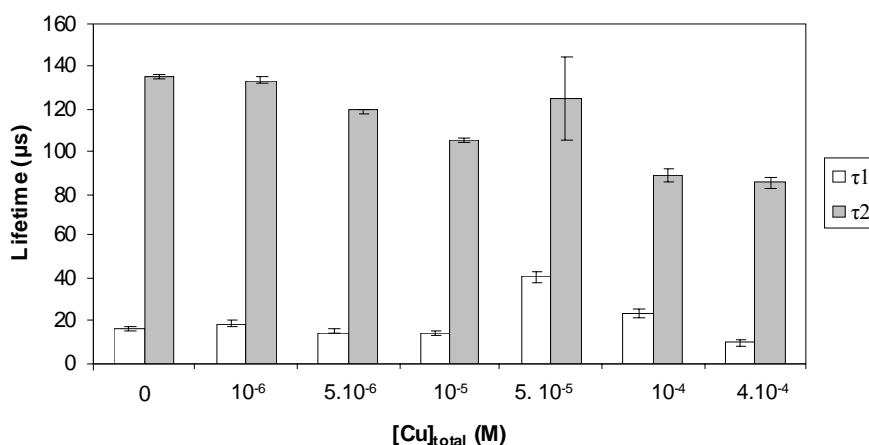
Fluorescence lifetimes acquired during the Cu<sup>2+</sup>/ Eu<sup>3+</sup> competition experiments are reported in **Figure 3**. All fluorescence decays were fitted between 10 and 300 μs delay with a bi-exponential decay.

The bi-exponential decay can be described by:

$$F = \sum_{i=1}^n F_i^0 \tau_i \exp\left(-\frac{D}{\tau_i}\right) \left(1 - \exp\left(-\frac{L}{\tau_i}\right)\right)$$

With F the fluorescence, D the gate delay, L the gate width,  $\tau_1$  and  $\tau_2$  the lifetime.

Correlation coefficient is always over  $r^2 > 0.99$  and the uncertainties of the fits were determined using the Excel macro in (De Levie, 2001). A clear tendency can be seen in **Figure 3** with the exception of  $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{total}} = 50 \mu\text{M}$ , where the uncertainty of the fit is the highest and may be disregarded. A bi-exponential decay is closely related with the energy transfer from a triplet state of an aromatic chromophores to the <sup>5</sup>D<sub>0</sub> level of Eu<sup>3+</sup> and back transfer from the <sup>5</sup>D<sub>0</sub> level to the triplet state (Kumke et al., 2005). Here it can be seen that, with the exception of 50 μM Cu<sup>2+</sup>, the first lifetime  $\tau_1$  is essentially constant between 10 and 20 μs without any tendency, and that the second lifetime  $\tau_2$  decreases from 135 to 85 μs with increasing  $[\text{Cu}]_{\text{total}}$ . One can remind that the Eu<sup>3+</sup> lifetime in pure water is 110 μs (Horrocks et al., 1979). These lifetimes could not be used to determine a hydration number as the use of empirical relations needs a calibration for each system (D<sub>2</sub>O / H<sub>2</sub>O) (Horrocks et al., 1979; Takahashi et al., 2000), which was not performed here. Nevertheless, the decreasing fluorescence lifetime suggests that the number of water molecules around Eu<sup>3+</sup> increases with increasing Cu<sup>2+</sup> concentration in solution. We postulate that a different chemical environment for Eu<sup>3+</sup> during competition with Cu<sup>2+</sup> changes the peak ratio and the fluorescence lifetime. As these parameters are undoubtedly changed during the competition experiments, the change in chemical environment can be validated.



**Figure 3.** Evolution of the fluorescence lifetimes obtained for the experimental data given in Figure 1. All fluorescence decays were fitted with a bi-exponential decay.

### ***Competition mechanism proposed by the NICA-Donnan model***

In a previous study (Marang et al.),  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  Gohy573-HA parameters have been validated by comparing NICA-Donnan prediction and competitive experiments between  $\text{Eu}^{3+} / \text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Eu}^{3+} / \text{Cu}^{2+}$  using TRLFS to measure free  $\text{Eu}^{3+}$  concentration (Marang et al.). These parameters (**Table 1**) are here used to propose a competitive mechanism between these cations. The NICA-Donnan prediction are done with the same experimental conditions (Gohy573-HA and Eu concentration, pH) as those used for TRLFS indirect excitation of  $\text{Eu}^{3+}$  and with a ionic strength of 0.1 M for  $\text{Ca}^{2+}$  competitive prediction and 0.001 M for  $\text{Cu}^{2+}$ . **Figure 4a and Figure 5a** show the evolution of the experimental ratio  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2 / {}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$  (615 nm/593 nm) as a function of the total  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations in solution.

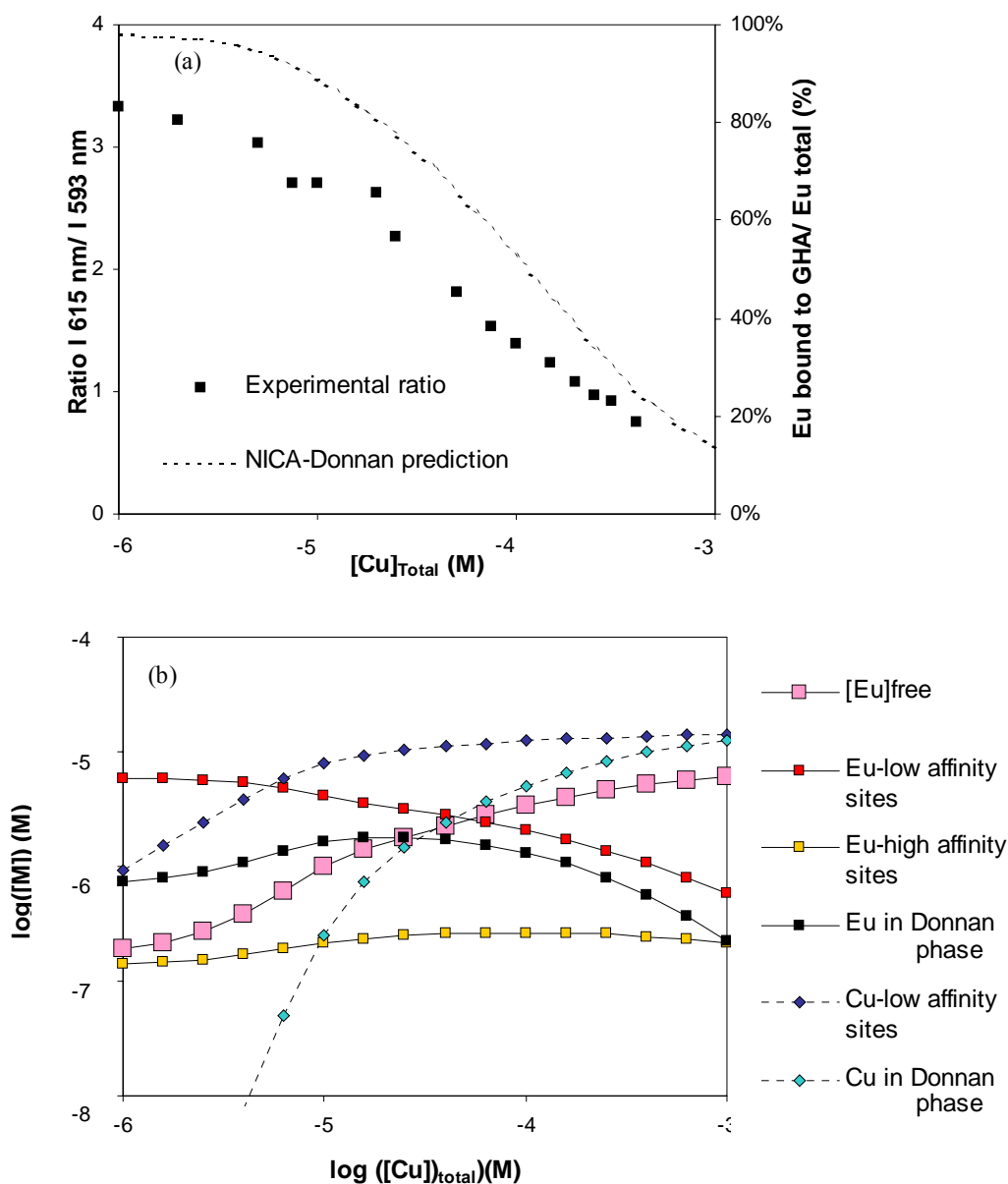
For  $\text{Cu}^{2+}$  competitive experiments, the ratio decreases from 3.25 to 0.75 for a total  $\text{Cu}^{2+}$  concentration ranging from 1  $\mu\text{M}$  to 0.4 mM. The NICA-Donnan model predicts also the decrease of  $\text{Eu}^{3+}$  complexed to Gohy573-HA from 98% to 26% (**Figure 4a**).

For 1  $\mu\text{M}$   $< [\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}} < 1\text{mM}$ , the ratio is constant. Then for higher  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, it decreases to 2.6 for a total  $\text{Ca}^{2+}$  concentration of 0.1 M. The NICA-Donnan model predicts that for 1  $\mu\text{M}$   $< [\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}} < 1\text{mM}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$  complexed to Gohy573-HA concentration is constant then it decreases and accounts only 30 % of total Eu for a total Ca concentration of 0.1 M (**Figure 5a**).

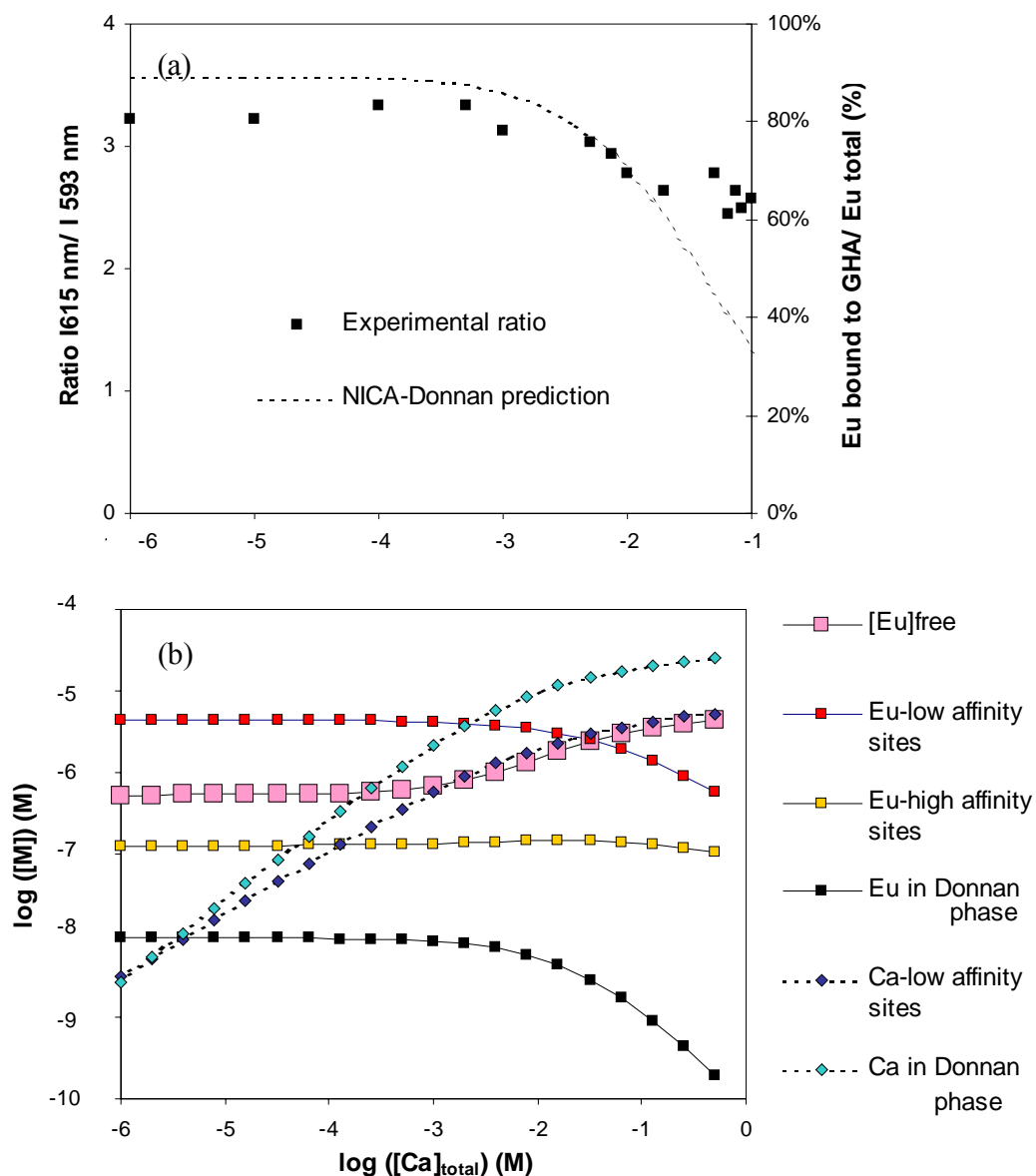
The evolution of the ratio of the transition  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2/{}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$  closely follows the changes in the calculated amount of  $\text{Eu}^{3+}$  bound to Gohy573-HA. The modification of the fluorescence spectra are therefore an expression of the competition between metal ions.

**Figure 4b and Figure 5b** present the evolution of each cation speciation (complexation to carboxylic and phenolic type of sites and in the Donnan phase). For the lowest concentrations of  $\text{Cu}^{2+}$ , *i.e.* 1  $\mu\text{M}$ , and for an ionic strength of 1 mM, 85% of  $\text{Eu}^{3+}$  is complexed to carboxylic type of sites (*i.e.* carboxylic type groups), and 14% is located in the Donnan phase (**Figure 4b**). For a higher ionic strength (0.1 M), in the case of  $\text{Ca}^{2+}$  competition, 96% of  $\text{Eu}^{3+}$  is still complexed to carboxylic type of sites (**Figure 5b**). In **Figure 4b and Figure 5b**, the difference in the initial amount of  $\text{Eu}^{3+}$  in the Donnan phase is the result of the different salt concentration used in both experiments. A larger Donnan concentration is expected to low salt level because of a higher Donnan volume (Benedetti et al., 1996; Saito et al., 2005). Conversely, the proportion of  $\text{Eu}^{3+}$  complexed to phenolic type groups is minor (**Figure 4b et Figure 5b**).

For the lower  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations,  $\text{Cu}^{2+}$  binds essentially on carboxylic type of sites as can be seen on **Figure 4b** where the  $\text{Cu}^{2+}$  binding to phenolic type of sites can be neglected and were not reported for the sake of clarity. The  $\text{Cu}^{2+}$  complexed to carboxylic type of sites is increasing up to a plateau and as  $\text{Cu}^{2+}$  increases in solution most of the binding occurs in the Donnan phase. The  $\text{Eu}^{3+}$  bound to carboxylic type groups are then expelled into the Donnan phase and as  $\text{Eu}^{3+}$  free in solution. For  $[\text{Cu}]_{\text{total}} > 0.1 \text{ mM}$ , the proportion of  $\text{Eu}^{3+}$  in the Donnan phase decreases because of the large increase of the  $\text{Cu}^{2+}$  in solution leading to a stronger competition in the Donnan phase. On the other hand, for  $\text{Eu}^{3+}$  the contribution of the phenolic type of sites is always minor. Here again, the confrontation with the TRLSF spectra is consistent with the proposed scenario, the  $\text{Eu}^{3+}$  spectrum is totally different from the  $\text{Ca}^{2+}$  case and indicates that a direct competition for the same type of sites occurs in the case of  $\text{Cu}^{2+}$ .  $\text{Eu}^{3+}$  chemical environment is gradually evolving towards a situation where it recovers its centro symmetry and does not seem to be specifically bound. This new environment corresponds to the Donnan phase, where  $\text{Eu}^{3+}$  is not specifically bound to Gohy573-HA and surrounded by water molecules in the Donnan phase. An energy transfer between HS to  $\text{Eu}^{3+}$  can still occurred since HS chromophores are close.



**Figure 4.** Ratio of the intensity at 615 nm and 593 nm and % Eu<sup>3+</sup> bound to Gohy573-HA as a function of the total copper concentration (a). Concentration of Eu<sup>3+</sup> free in solution, Eu<sup>3+</sup> and Cu<sup>2+</sup> bound to the low affinity type of sites, Eu<sup>3+</sup> and Cu<sup>2+</sup> bound to the high affinity type of sites and in the Donnan phase calculated by the NICA-Donnan model (I= 1mM KNO<sub>3</sub>) as a function of the total copper concentration (b).



**Figure 5.** Ratio of the intensity at 615 nm and 593 nm and % Eu<sup>3+</sup> bound to Gohy573-HA as a function of the total calcium concentration (a). Concentration of Eu<sup>3+</sup> free in solution, Eu<sup>3+</sup> and Ca<sup>2+</sup> bound to the low affinity type of sites, Eu<sup>3+</sup> and Ca<sup>2+</sup> bound to the high affinity type of sites and in the Donnan phase calculated by the NICA-Donnan model ( $I = 0.1 \text{ M KNO}_3$ ) as a function of the total calcium concentration (b).

As for the fluorescence spectra, the mechanism based on the NICA-Donnan calculation for  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Eu}^{3+}$  competition is different. For the lower  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations,  $\text{Ca}^{2+}$  is essentially bound in the Donnan phase (**Figure 5b**), and the higher the total  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, the higher the proportion of  $\text{Ca}^{2+}$  in the Donnan phase. Nevertheless, the fraction which is bound to carboxylic type of sites becomes significant and can compete with  $\text{Eu}^{3+}$  for the occupation on these sites. The proportion of  $\text{Eu}^{3+}$  complexed to Gohy573-HA decreases around  $[\text{Ca}]_{\text{total}} = 1$  mM. This mechanism seems to be consistent with the TRLFS observations as when  $[\text{Ca}]_{\text{total}} \leq 1$  mM the fluorescence spectra stay essentially unchanged, the change in fluorescence spectrum when  $[\text{Ca}]_{\text{total}} > 1$  mM can be explained from the NICA-Donnan calculations.  $\text{Eu}^{3+}$  stays complexed to the carboxylic type of groups during the competition with  $\text{Ca}^{2+}$  (**Figure 5b**) and the decrease of the intensity is due to the increase of free  $\text{Eu}^{3+}$  concentration in solution. The modification of the transition at 615 nm is only due to the modification of HS structure. The rearrangement of the carboxylic type of sites proposed after the analysis of the spectra can not be observed in the NICA-Donnan prediction, since all the carboxylic type of groups are considered as one type of sites.

This exercise still needs some verification, in particular the design of further experiments at higher pH where the phenolic type of sites could be activated, especially for  $\text{Cu}^{2+}$  (Kinniburgh et al., 1996), and where the remaining uncertainty on the binding to this type of sites for lanthanides could be resolved.

This study provides a better understanding of the nature of  $\text{Eu}^{3+}$  binding sites to humic substances. In pH acid range,  $\text{Eu}^{3+}$  competition toward divalent cations such as  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  occurs primarily to the carboxylic type of groups.  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Al}^{3+}$  will have the same behaviour since it has been shown that their complexation occurs also in the carboxylic type of groups (Pinheiro et al., 2000; Weber et al., 2006).

## REFERENCES

- Alberts, J. J. and Z. Filip (1998). "Metal binding in estuarine humic and fulvic acids: FTIR analysis of humic acid-metal complexes." *Environmental Technology* **19**(9): 923-931.
- Benedetti, M. D. F., W. H. van Riemsdijk and L. K. Koopal (1996). "Humic substances considered as a heterogeneous donnan gel phase." *Environmental Science and Technology* **30**(6): 1805-1813.
- Billard, I., G. Montavon, S. Markai and C. Galindo (2006). "Experimental evidence for the influence of the excitation wavelength on the value of the equilibrium constant as determined by Time-Resolved Emission Spectroscopy (TRES)." *Radiochimica Acta* **94**(5): 275-282.
- Buffle, J. (1988). *Complexation Reactions in Aquatic Systems*, Ellis Horwood Series in Analytical Chemistry.
- Cabaniss, S. E. (1992). "Synchronous Fluorescence-Spectra Of Metal-Fulvic Acid Complexes." *Environmental Science & Technology* **26**(6): 1133-1139.
- Caceci, M. and V. Moulin (1991). Investigation of humic acid samples of different sources by photon correlation spectroscopy., B.Allard, H.Boren & A. Grimvall Eds.
- De Levie, R. (2001). "How to use Excel in analytical chemistry and in general scientific data analysis."
- Hering, J. G. and F. M. M. Morel (1988a). "Humic acid complexation of calcium and copper." *Environmental Science and Technology* **22**: 1234-1237.
- Hering, J. G. and F. M. M. Morel (1988b). "Kinetics of trace metal complexation: role of alkaline-earth metals." *Environmental Science and Technology* **22**: 1469-1478.
- Horrocks, W. D. and D. R. Sudnick (1979). "Lanthanide Ion Probes of Structure in Biology - Laser-Induced Luminescence Decay Constants Provide a Direct Measure of the Number of Metal-Coordinated Water-Molecules." *Journal of the American Chemical Society* **101**(2): 334-340.
- Keizer, M. G. and W. H. Van Riemsdijk (1994). A computer program for the Calculation of Chemical Speciation and Transport in Soil-Water Systems (ECOSAT 4.7). Wageningen, Agricultural University of Wageningen.
- Kerndorff, H. and M. Schnitzer (1980). "Sorption of metals on humic acid." *Geochimica et Cosmochimica Acta* **44**: 1701-1708.
- Kinniburgh, D. G., C. J. Milne, M. D. F. Benedetti, J. P. Pinheiro, J. Filius and W. H. van Riemsdijk (1996). "Metal Ion Binding by Humic Acid: application of the NICA-Donnan Model." *Environmental Science & Technology* **30**: 1687-1698.
- Kinniburgh, D. G., W. H. van Riemsdijk, L. K. Koopal, M. Borkovec, M. F. Benedetti and M. J. Avena (1999). "Ion binding to natural organic matter: competition, heterogeneity, stoichiometry and thermodynamic consistency." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **151**(1-2): 147-166.
- Kumke, M. U., S. Eidner and T. Kruger (2005). "Fluorescence quenching and luminescence sensitization in complexes of Tb<sup>3+</sup> and Eu<sup>3+</sup> with humic substances." *Environmental Science & Technology* **39**(24): 9528-9533.
- Kumke, M. U., S. Eidner and T. Kruger (2005). "Fluorescence quenching and luminescence sensitization in complexes of Tb<sup>3+</sup> and Eu<sup>3+</sup> with humic substances." *Environmental Science and Technology* **39**(24): 9528-9533.
- Manseki, K., M. Kumagai, M. Sakamoto, H. Sakiyama, Y. Nishida, A. Matsumoto, Y. Sadaoka, M. Ohba and H. Okawa (1998). "Copper(II)-lanthanide(III) complexes of symmetric



- dinucleating macrocycle with two phenolate bridges." *Bulletin Of The Chemical Society Of Japan* **71**(2): 379-383.
- Marang, L., P. Reiller, S. Eidner, M. U. Kumke and M. F. Benedetti "Combining spectroscopic and potentiometric approaches to characterize competitive binding to Humic Substances: Part 1." **in preparation**.
- Moulin, C., J. Wei, P. V. Iseghem, I. Laszak, G. Plancque and V. Moulin (1999). "Europium complexes investigations in natural waters by time-resolved laser-induced fluorescence." *Analytica Chimica Acta* **396**(2-3): 253.
- Moulin, V., J. Tits, C. Moulin, P. Decambox, P. Mauchien and O. de Ruty (1992). "Complexation behaviour of humic substances towards actinides and lanthanides studied by time-resolved laser-induced spectrofluorimetry." *Radiochimica Acta* **58/59**: 121-128.
- Pinheiro, J. P., A. M. Mota and M. F. Benedetti (1999). "Lead and calcium binding to fulvic acids: Salt effect and competition." *Environmental Science & Technology* **33**(19): 3398-3404.
- Pinheiro, J. P., A. M. Mota and M. F. Benedetti (2000). "Effect of aluminum competition on lead and cadmium binding to humic acids at variable ionic strength." *Environmental Science & Technology* **34**(24): 5137-5143.
- Plancque, G., V. Moulin, P. Toulhoat and C. Moulin (2003). "Europium speciation by time-resolved laser-induced fluorescence." *Analytica Chimica Acta* **478**(1): 11-22.
- Saito, T., S. Nagasaki, S. Tanaka and L. K. Koopal (2005). "Electrostatic interaction models for ion binding to humic substances." *Colloids And Surfaces A-Physicochemical And Engineering Aspects* **265**(1-3): 104-113.
- Sakamoto, M., M. Hashimura, K. Matsuki, A. Matsumoto and H. Okawa (1991). "Fluorescence Quenching Of Europium(Iii) By The Interaction With Copper(Ii) Or Nickel(Ii) Complex Of N,N'-Disalicylidene-1,3-Propanediamine." *Chemistry Letters*(6): 1007-1010.
- Sakamoto, M., K. Yamamoto, A. Matsumoto, Y. Nishida and H. Okawa (1994). "Effect Of Some D-Transition Metal-Complexes Of Salen-Type Ligands And Acetylacetone On Fluorescence Of Europium(Iii) And Terbium(Iii)." *Bulletin Of The Chemical Society Of Japan* **67**(10): 2707-2711.
- Shin, H. S., S. W. Rhee, B. H. Lee and C. H. Moon (1996). "Metal binding sites and partial structures of soil fulvic and humic acids compared: Aided by Eu(III) luminescence spectroscopy and DEPT/QUAT C-13 NMR pulse techniques." *Organic Geochemistry* **24**(5): 523-529.
- Takahashi, Y., A. Tada, T. Kimura and H. Shimizu (2000). "Formation of outer- and inner-sphere complexes of lanthanide elements at montmorillonite-water interface." *Chemistry Letters*: 700-701.
- Thomason, J. W., W. Susetyo and L. A. Carreira (1996). "Fluorescence studies of metal humic complexes with the use of lanthanide ion probe spectroscopy." *Applied Spectroscopy* **50**(3): 401-408.
- Tipping, E. (2002). *Cation binding by humic substances*, Cambridge Environmental Chemistry Cambridge University Press.
- Tipping, E., C. A. Backes and M. A. Hurley (1988). "The Complexation of Protons, Aluminum and Calcium by Aquatic Humic Substances - a Model Incorporating Binding-Site Heterogeneity and Macroionic Effects." *Water Research* **22**(5): 597-611.
- Vercouter, T., P. Vitorge, N. Trigoulet, E. Giffaut and C. Moulin (2005). " $\text{Eu}(\text{CO}_3)_3^{3-}$  and the limiting carbonate complexes of other  $\text{M}^{3+}$  f-elements in aqueous solutions: a solubility and TRLFS study." *New Journal of Chemistry* **29**(4): 544-553.

- Weber, T., T. Allard, E. Tipping and M. F. Benedetti (2006). "Modeling Iron Binding to Organic Matter." *Environmental Science and Technology* **40** (24): 7488-7493.
- Wolf, M., G. Buckau and S. Geyer (2004). Isolation and characterization of new batches of Gohy-573 humic and fulvic acids. *Humic Substances in Performance Assessment of Nuclear Waste Disposal: Actinide and Iodine Migration in the Far-Field. Second Technical Progress Report* <<http://bibliothek.fzk.de/zb/berichte/FZKA6969.pdf>>. G. Buckau. Karlsruhe: 111-124.



## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

|  |            |
|--|------------|
| <b>1. Développement de techniques de spéciation</b>  | <b>171</b> |
| <b>2. Complexation des radionucléides par les SH</b> | <b>173</b> |
| <b>3. Etude de la compétition entre cations</b>      | <b>174</b> |
| <b>4. Prédiction du modèle NICA-Donnan</b>           | <b>175</b> |

Dans le cadre de la prévision du devenir des radionucléides (RN) dans l'environnement, l'intérêt s'est porté sur les interactions de RN tels que le cobalt, l'euporium et l'uranium (VI) avec les substances humiques (SH). Le but de ce travail était d'aller vers une meilleure compréhension des interactions entre RN et SH ainsi que la prédiction de l'influence des SH sur la spéciation des RN. Le modèle NICA-Donnan permet de décrire ces interactions en tenant compte de l'hétérogénéité des SH, des effets électrostatiques et de la compétition entre cations. Le modèle avait été calibré avec un jeu de données extrêmement limité dans le cas des RN (Milne et al., 2003). En effet, parmi l'ensemble de techniques de spéciation, peu d'entre elles sont adaptées à l'étude des interactions RN-SH, en particulier, à la mesure de la concentration en métal libre en solution. Dans le cadre de ce travail, nous avons développé et optimisé des techniques de spéciation afin d'acquérir de nouveaux jeux de données, d'étudier l'influence de la compétition sur la spéciation des RN et enfin de tester la capacité du modèle NICA-Donnan à prédire le comportement des RN.

### 1. Développement de techniques de spéciation

Le premier but de cette étude était de développer et de valider des techniques de spéciation adaptées à l'étude des interactions RN-SH par la mesure du métal libre en solution. Nous avons développé la technique Flux Donnan Membrane (FDM), approche dynamique de la DMT. Contrairement à la DMT, la FDM permet d'acquérir des données en un temps relativement court et pour une large gamme de concentration en métal libre. Nous avons montré que des calibrations expérimentales du transport de l'ion métallique dans le système de la FDM peuvent être utilisées pour obtenir la concentration en métal libre lorsque le flux est contrôlé soit par la diffusion en solution, soit par la diffusion dans la membrane. Ces deux

situations sont fonction de la force ionique, de la concentration totale en ligand et en métal ainsi qu'en fonction de la charge du cation. (**Chapitre 1**).

Après la validation de la procédure expérimentale, la FDM a été utilisée afin d'obtenir des données de complexation pour  $\text{Co}^{2+}$  (**Chapitre 1**),  $\text{UO}_2^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  (**Chapitre 2**). Dans le cas de  $\text{Mg}^{2+}$ , nous avons montré qu'il est essentiel de tenir compte de la labilité du complexe étudié lors de l'utilisation d'une technique de spéciation dynamique. En effet l'augmentation de la concentration en SH (passage d'un flux contrôlé par la diffusion en solution à un flux contrôlé par la diffusion dans la membrane) permet de mesurer la concentration en métal libre lorsque le complexe métal-SH est labile (**Chapitre 2**).

L'utilisation de la FDM est limitée pour des métaux ayant une faible solubilité et de fortes interactions avec la membrane échangeuse de cations comme l'uranium (VI) à des pH acides (**Chapitre 2**).

- L'utilisation de la FDM avec d'autres types de membrane échangeuse de cations ouvrirait des perspectives intéressantes. En effet, les interactions entre les RN et la membrane pourraient être diminuées en utilisant une membrane avec des groupements moins complexants et avec une densité de charge inférieure.
- Le développement de la FDM a permis de diminuer la limite de détection, il est donc possible de mesurer de très faible concentration en métal libre. Il pourrait être très intéressant d'installer le système FDM *in situ*, comme par exemple dans un puits au sein d'aquifères afin de mesurer la variation de la concentration en uranium libre en solution. La comparaison entre la mesure de la concentration en uranium libre au sein d'aquifères avec la mesure de la concentration en uranium libre à la sortie d'une fissure de la roche entourant ces aquifères permettrait d'obtenir des informations sur le piégeage de l'uranium par le milieu entourant ces aquifères.

Les interactions uranium (VI)-SH ont été également étudiées à partir d'un acide humique insolubilisé (AHI). Cette étude a permis de valider que l'AHI est bien représentatif du comportement des SH. En effet les interactions entre l'uranium (VI) et l'acide humique de Gorleben et celles avec AHI sont cohérentes entre elles (**Chapitre 2**).

- Afin de valoriser cette approche expérimentale (utilisation d'un AHI) développée initialement par Weber *et al.* (2006), il serait intéressant de le comparer à la matière

organique naturelle immobilisée ou adsorbée sur des surfaces minérales. En effet la diminution du nombre de sites lors du processus d'insolubilisation pourrait être représentative d'un processus environnemental.

## 2. Complexation des radionucléides par les SH

Les deux techniques de spéciation ont permis d'obtenir un grand nombre de données de qualité sur la proportion de RN complexés par les SH. Ces résultats ont montré que la complexation de ces RN est très dépendante du pH, plus le pH augmente plus les SH complexent les RN. Lorsque les complexes avec les espèces inorganiques deviennent majoritaires et lorsque ces complexes sont chargés négativement, une diminution de la complexation des SH est observée (**Chapitre 2**). Les SH complexent fortement  $\text{Eu}^{3+}$  (**Chapitre 3**), et donc par analogie les actinides (III), ainsi que  $\text{UO}_2^{2+}$  (**Chapitre 2**).  $\text{Co}^{2+}$  est plus faiblement complexé par les SH (**Chapitre 1**). D'une manière générale, la spéciation et le transport de  $\text{Eu}^{3+}$  et  $\text{UO}_2^{2+}$  pourraient donc être facilités par la présence de SH pour des concentrations supérieures à  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ . Dans le cas de  $\text{Co}^{2+}$ , la spéciation et le transport ne seraient modifiés que pour des concentrations supérieures à  $50 \text{ mg.L}^{-1}$ . Ces nouveaux jeux de données ont été analysés à l'aide du modèle NICA-Donnan et nous a permis de proposer de nouveaux paramètres pour décrire le comportement des RN dans le milieu naturel (**Chapitre 1, 2 et 3**).

La complexation des RN par les SH peut donc avoir une influence sur leur devenir, mais quand est – il lorsque les SH sont en interaction avec d'autres composants du milieu environnemental ?

- La complexation par les SH, ainsi que l'adsorption sur des surfaces minérales, jouent un rôle important dans la spéciation des RN. Cependant les interactions entre RN et SH en présence de surfaces minérales font toujours l'objet de nombreux débats. En effet l'utilisation de modèles additifs qui consistent à faire une combinaison linéaire des courbes modélisées obtenues pour les systèmes binaires métal/surface, métal/SH et surface/SH ne permet pas de reproduire de manière satisfaisante les données expérimentales métal/SH/surface (Vermeer et al., 1999; Christl et al., 2001). Pour expliquer cet écart entre modélisation et expérimentation, le fractionnement des SH à la surface minérale est avancé (Meier et al., 1999; Hur et al., 2003; Reiller et al., 2006). L'étude des interactions SH-surfaces minérales est

donc essentielle à la compréhension du devenir et du transport des RN dans l'environnement. Afin de progresser dans ce domaine, il est à présent crucial d'obtenir des données quantitatives sur l'effet des interactions SH-surfaces minérales, sur la fonctionnalité de la matière organique naturelle ainsi que sur le devenir et le transport des RN dans l'environnement.

- Quelle est l'influence de la MON sur la mobilité des RN ? Parmi le nombre croissant de recherches pour mettre en évidence et quantifier le transport des métaux, la majorité de ces recherches est basée sur des expérimentations en laboratoire sur des colonnes de sols mais rares sont les études *in situ*. Au cours de ces expérimentations en laboratoire, il a été montré que le transport des RN est facilité par la présence de substances humiques. Il est à présent nécessaire de comprendre si ces études sont représentatives du milieu environnemental. En effet l'étude des eaux collectées sur des sols *in situ* permettrait de mieux rendre compte de facteurs pouvant influencer le transport comme les interactions entre les différents compartiments environnementaux, les conditions climatiques, la présence de chemin d'écoulements préférentiels ou encore les activités humaines.

### 3. Etude de la compétition entre cations

Un autre but de cette thèse était d'étudier la compétition entre cations et de comprendre de quelle manière elle se déroule et dans quels cas il est nécessaire de la prendre en compte lors de la modélisation des interactions RN-SH.

Les études réalisées en combinant approche spectroscopique et approche potentiométrique ont permis de proposer un mécanisme de compétition entre cations (**Chapitre 3**). Dans un premier temps, nous avons montré que  $\text{Eu}^{3+}$  est complexé majoritairement de manière spécifique aux SH et essentiellement sur les sites de basse affinité pour les protons. La compétition avec un cation complexé non spécifiquement, tels que  $\text{Ca}^{2+}$ , n'affecte pas son mode de complexation. En revanche un cation se complexant spécifiquement aux SH, tels que  $\text{Cu}^{2+}$  affecte la spéciation de  $\text{Eu}^{3+}$  complexé qui se retrouve expulsé des sites de basse affinité pour les protons car  $\text{Cu}^{2+}$  se complexent également sur ces mêmes sites ;  $\text{Eu}^{3+}$  se retrouve dans la phase de Donnan (**Chapitre 4**). Cette étude a montré qu'il est essentiel de tenir compte des deux types de complexation spécifiques et non spécifiques (interactions électrostatiques) afin de décrire correctement la compétition entre cations.

- Le mécanisme de compétition a pu être proposé à partir d'expériences réalisées par SLRT en excitant  $\text{Eu}^{3+}$  par un transfert d'énergie via les SH. Ces études ont mis en évidence une inhibition de la luminescence de  $\text{Eu}^{3+}$  en présence de  $\text{Cu}^{2+}$ . Il serait donc intéressant de comprendre le déroulement de ce processus photochimique afin d'approfondir le mécanisme de compétition entre cations ainsi que la compréhension des interactions métal-SH.

Comme nous l'avons vu précédemment, la spéciation et le transport des RN ( $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{UO}_2^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$ ) sont influencés par la présence de MON. D'après les études de compétition, nous avons pu montrer que le transport de ces complexes RN-MON ne serait pas modifié par leur passage dans des zones où la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  est élevée (**Chapitre 2 et 3**). Par contre  $\text{Mg}^{2+}$  se complexe plus spécifiquement que  $\text{Ca}^{2+}$  (**Chapitre 2**). Son influence est importante sur les cations qui se complexent faiblement aux SH comme  $\text{Co}^{2+}$  (**Chapitre 2**). Il est donc nécessaire de distinguer l'effet du  $\text{Ca}^{2+}$  et du  $\text{Mg}^{2+}$  dans la modélisation du devenir des RN. En revanche la présence de cations se complexant également spécifiquement et en particulier sur les mêmes types de sites que les RN tels que  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$ , peuvent conduire à la désorption des RN. En présence de ces cations, les RN seraient donc plus biodisponibles car leur concentration en métal libre augmenterait en solution (**Chapitre 3**).

#### 4. Prédiction du modèle NICA-Donnan

A partir d'une calibration en laboratoire, le modèle NICA-Donnan est capable de prédire l'influence de la MON sur la spéciation des RN. Nous avons validé la prédiction du logiciel ECOSAT contenant le modèle NICA-Donnan à partir de deux études : une étude sur l'effet de la compétition du  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$  sur la spéciation de  $\text{Eu}^{3+}$  (étude en laboratoire, **Chapitre 3**) et une étude sur la spéciation de l'uranium dans deux eaux souterraines (analyses de données de la littérature *in situ*, **Chapitre 2**). La prédiction du logiciel de spéciation est en accord avec les données expérimentales pour l'étude en laboratoire. Afin de vérifier la capacité du modèle à décrire le milieu environnemental, nous avons alors testé la prédiction de la spéciation de l'uranium dans des eaux souterraines. Nous avons modélisé deux eaux souterraines dont le pourcentage de COD réactif est connu. Dans la première eau souterraine étudiée par Ranville et al. (Jackson et al., 2005) (DOC peu réactif), le logiciel ECOSAT arrive à prédire correctement la spéciation de l'uranium (pas d'interaction entre l'uranium et la MON). D'après cette première étude, la MON ne faciliterait pas le transport de l'uranium (VI) dans



des eaux souterraines. Nous avons voulu alors tester si une réactivité plus élevée de la COD pourrait avoir une influence importante. Dans le cas de l'eau souterraine de Gorleben (COD très réactif), la spéciation de l'uranium calculée n'est pas en adéquation avec celle mesurée (Zeh et al., 1997) (**Chapitre 2**). En effet, le logiciel ECOSAT prédit qu'il n'y a aucune interaction entre l'uranium et la MON alors qu'*in situ* 70% de l'uranium sont sous la forme d'un complexe colloïdal uranium-MON. Même la prise en compte de la réactivité de l'uranium (IV) amènerait à des paramètres irréalistes. Le fait que le modèle ne soit pas en accord avec les données obtenues *in situ* montre que la forte réactivité du COD n'est pas responsable de ces fortes interactions.

- Afin de mieux comprendre le rôle de la MON sur le devenir des RN, en particulier dans l'environnement, il serait nécessaire d'étudier les autres phénomènes RN-SH qui pourraient induire de fortes interactions. Les complexes formés au sein des aquifères de Gorleben pourraient être dus par exemple à la bioréduction de l'uranium (VI) en uranium (IV) en présence de MON (Gu et al., 2003; Dong et al., 2006) ou encore à la précipitation de nano-phases d'uranium en dehors des domaines de stabilité macroscopique comme cela a été montré dans le cas du fer (Allard et al., 2004). Ces processus pourraient avoir une influence importante sur la spéciation de l'uranium. Afin de distinguer entre ces différents processus, une étude plus détaillée des échantillons collectés *in situ*, en particulier la spéciation de l'uranium en interaction avec la MON, serait nécessaire.
  
- Pour des eaux dont le pH et les concentrations en carbonate sont inférieures à celles des eaux de Gorleben, différentes études (Crançon et al., 2003; Jackson et al., 2005) ont montré que la complexation de l'uranium par la MON est importante. Or dans ces études, il n'y a pas d'information sur la réactivité du COD. Afin de décrire correctement ces données expérimentales et donc en général le devenir des RN dans l'environnement, il est indispensable d'approfondir les études sur la relation entre le COD mesuré et la concentration en SH.
  
- Les modèles sont capables de prédire l'influence de la MON sur la spéciation des RN mais pas encore le transport et en particulier le rôle des substances humiques. La raison pour laquelle le transport des RN dans une colonne de sols ne pourrait pas

être prédit pourrait venir du fait que dans ce type de modèle, la cinétique n'est absolument pas prise en compte. Afin de tenir compte de ces effets dans la prédiction du transport, des études en laboratoire sur la cinétique de dissociation RN-SH sont nécessaires.

## REFERENCES

- Allard, T., N. Menguy, J. Salomon, T. Calligaro, T. Weber, G. Calas and M. F. Benedetti (2004). "Revealing forms of iron in river-borne material from major tropical rivers of the Amazon Basin (Brazil)." *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **68**(14): 3079-3094.
- Christl, I. and R. Kretzschmar (2001). "Interaction of copper and fulvic acid at the hematite-water interface." *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **65**(20): 3435-3442.
- Crançon, P. and J. van der Lee (2003). "Speciation and mobility of uranium(VI) in humic-containing soils." *Radiochimica Acta* **91**(11): 673-679.
- Dong, W. M., G. B. Xie, T. R. Miller, M. P. Franklin, T. P. Oxenberg, E. J. Bouwer, W. P. Ball and R. U. Halden (2006). "Sorption and bioreduction of hexavalent uranium at a military facility by the Chesapeake Bay." *Environmental Pollution* **142**(1): 132-142.
- Gu, B. and J. Chen (2003). "Enhanced microbial reduction of Cr(VI) and U(VI) by different natural organic matter fractions." *Geochimica et Cosmochimica Acta* **67**(19): 3575.
- Hur, J. and M. A. Schlautman (2003). "Molecular weight fractionation of humic substances by adsorption onto minerals." *Journal of Colloid and Interface Science* **264**(2): 313.
- Jackson, B. P., J. F. Ranville, P. M. Bertsch and A. G. Sowder (2005). "Characterization of colloidal and humic-bound Ni and U in the "dissolved" fraction of contaminated sediment extracts." *Environmental Science & Technology* **39**(8): 2478-2485.
- Meier, M., K. Namjesnik-Dejanovic, P. A. Maurice, Y.-P. Chin and G. R. Aiken (1999). "Fractionation of aquatic natural organic matter upon sorption to goethite and kaolinite." *Chemical Geology* **157**(3-4): 275.
- Milne, C. J., D. G. Kinniburgh, W. H. van Riemsdijk and E. Tipping (2003). "Generic NICA-Donnan Model Parameters for Metal-Ion Binding by Humic Substances." *Environmental Science & Technology* **37**: 958-971.
- Ranville, J. F., M. J. Hendry, T. N. Reszat, Q. Xie and B. D. Honeyman "Quantifying uranium complexation by groundwater dissolved organic carbon using asymmetrical flow field-flow fractionation." *Journal of Contaminant Hydrology* **In Press**, **Corrected Proof**.
- Reiller, P., B. Amekraz and C. Moulin (2006). "Sorption of Aldrich humic acid onto hematite: Insights into fractionation phenomena by electrospray ionization with quadrupole time-of-flight mass spectrometry." *Environmental Science & Technology* **40**(7): 2235-2241.
- Vermeer, A. W. P., J. K. McCulloch, W. H. Van Riemsdijk and L. K. Koopal (1999). "Metal ion adsorption to complexes of humic acid and metal oxides: Deviations from the additivity rule." *Environmental Science & Technology* **33**(21): 3892-3897.
- Weber, T., T. Allard, E. Tipping and M. F. Benedetti (2006). "Modeling Iron Binding to Organic Matter." *Environmental Science and Technology* **40** (24): 7488-7493.
- Zeh, P., K. R. Czerwinski and J. I. Kim (1997). "Speciation of uranium in Gorleben groundwaters." *Radiochimica Acta* **76**(1-2): 37-44.