



22506



Agence de l'eau
Rhin-Meuse

environnement



ENSAIA - INRA

Laboratoire Sols et Environnement

J. L. MOREL

- C. PAYET

Tel : 03.83.59.58.65

Fa : 03.83.59.57.92

Direction de

la Recherche

Service

Microbiologique et Ecotoxicologie

M. JAUZEIN

MJ JOURDAIN

A. BISPO

Tel : 03.83.50.36.00

Fax : 03.83.50.36.99

AGENCE DE L'EAU RHIN-MEUSE

IDENTIFICATION DES SOURCES DE TOXICITE
DANS LES BOUES INDUSTRIELLES

Phase 2

Numéro du marché : 97

MA S072

Date du marché

: 21 janvier 1998

Durée du marché : 8

mois

Mars 1998

RH 98-03

MJD/rb



SOMMAIRE

1. OBJET DU RAPPORT	4
2. INTERETS DES TESTS DE PHYTOTOXICITE.....	5
2.1. ROLE DES VEGETAUX DANS LES ECOSYSTEMES TERRESTRES
2.2. INTERET DES TESTS BIOLOGIQUES DE PHYTOTOXICITE
3. FRACTIONNEMENT DES BOUES	6
3.1. INTERET DU FRACTIONNEMENT	6
3.2. METHODES DE FRACTIONNEMENT
3.2.1. <i>Données bibliographiques</i>	6
3.2.2. <i>Fractionnement des polluants dissous dans le lixiviat.</i>	6
3.2.3. <i>Fractionnement de polluants dissous dans un extrait organique de la boue.</i>	7
3.2.4. <i>Limites de ces méthodes</i>	8
3.3. METHODE DE FRACTIONNEMENT PROPOSEE	8
3.4. TESTS BIOLOGIQUES ET BLANCS	12
3.4.1. <i>Définition des blancs.</i>	12
3.4.2. <i>Choix des essais biologiques</i>	12
3.5. VOLUMES A CONSIDERER	13
3.6. ETAPE DE CONFIRMATION	14
4. PERSPECTIVES	16
5. BIBLIOGRAPHIE.....	17

Liste des tableaux

TABLEAU 1. LISTE DES FRACTIONS OBTENUES ET FAMILLES DE POLLUANTS PREDOMINANTES	11
TABLEAU 2. BLANCS UTILISES POUR CHAQUE FRACTION	12
TABLEAU 3. QUANTITE REQUISE POUR LA REALISATION DES TESTS DE PHYTOTOXICITE	13
TABLEAU 4. RECAPITULATIF DES QUANTITES DE SOL ET DE VOLUME DE LIXIVIAT GENERE..	14
TABLEAU 5. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES ENVISAGEES SUR LES DIFFERENTS EXTRAITS OBTENUS..	16

Liste des figures

FIGURE 1. PROTOCOLE DE FRACTIONNEMENT DES POLLUANTS DES BOUES..9
FIGURE 2. PROTOCOLE DE FRACTIONNEMENT DU LIXIVIAT..9
FIGURE 3. PROTOCOLE DETAILLE DU FRACTIONNEMENT	15

1. Objet du rapport

Le rapport se rapporte à la phase 2 du marché 97 MA SO72 notifié le 21 janvier 1998 entre l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse et l'IRH Environnement et son co-traitant l'ENSAIA-INRA Laboratoire Sols et Environnement, ayant pour objet " L'étude sur l'identification des sources de toxicité dans les boues industrielles ".

L'étude porte sur l'intérêt des tests de phytotoxicité dans les boues résiduaires et sur une méthode d'identification des origines de la toxicité. Cette étude est subdivisée en trois phases.

- **La phase 1** est une analyse de l'applicabilité des essais de phytotoxicité aux boues, elle comprend les points suivants :

1) une analyse critique de l'emploi de tests de phytotoxicité sur des boues résiduaires à partir de consultations bibliographiques et des compte-rendus opératoires d'une campagne de mesures menée en 1996 sur 37 boues d'épuration d'origine industrielle du bassin Rhin-Meuse comportant les analyses en micropolluants et des tests de phytotoxicité (ISO/CD 11269-2 sur *Hordeum vulgare* et *Lepidum sativum*),

La réalisation de prélèvements et d'analyses sur cinq boues choisies par l'Agence de l'Eau (parmi les 37 boues de la campagne de 1996) comprenant des analyses chimiques (éléments traces minéraux et micropolluants organiques - HPA et PCB) et des essais de phytotoxicité, d'une part germination et croissance sur orge et cresson (ISO/CD 11269-2) et d'autre part les tests d'élongation racinaire de la laitue (NF X 31-203).

2) une formulation des recommandations lors de la réalisation des tests de phytotoxicité.

- **La phase 2** a pour but de définir un protocole d'identification des sources de toxicité.

- **La phase 3** est l'applicabilité du protocole décrit dans la phase 2 aux 5 boues industrielles analysées dans la phase 1.

Le présent rapport est consacré à la description du protocole d'identification des sources de toxicité.

2. Intérêts des tests de phytotoxicité

2.1. Rôle des végétaux dans les écosystèmes terrestres

Les végétaux constituent le premier maillon de la chaîne alimentaire terrestre : ils transforment lors de la photosynthèse l'énergie solaire et les constituants minéraux en constituants organiques alors assimilables par le reste des organismes vivants. De plus, lors de cette opération, les végétaux libèrent également l'oxygène nécessaire à la vie terrestre.

En plus de ces rôles nourriciers, les plantes constituent des habitats remarquables nécessaires à la reproduction et à l'abri de nombreuses espèces (insectes invertébrés, oiseaux, vertébrés...). Elles assurent également un rôle très important dans la structuration et la préservation des sols : le système racinaire permet notamment l'aération du sol alors qu'un couvert végétal assure une protection efficace contre l'érosion.

Les plantes sont donc primordiales :

- au bon déroulement des cycles biogéochimiques,
- à la nutrition et la protection des organismes vivants, et,
- au maintien des fonctions des sols.

L'ensemble de ces fonctions rendent obligatoire l'évaluation de l'impact des polluants sur les végétaux.

2.2. Intérêt des tests biologiques de phytotoxicité

Les boues industrielles sont des matrices complexes qui peuvent contenir des polluants en nombre et en quantités variables. Le danger phytotoxique de ces boues ne peut pas être évalué par la seule analyse chimique. L'analyse chimique ne permet pas de déterminer la quantité de polluants " phytodisponibles " mais elle évalue la quantité de polluants présents extractibles. Les végétaux ont la capacité de transférer les éléments traces métalliques ou les micropolluants organiques d'un compartiment solide (sol, boue..) vers les racines et les parties aériennes, présentant ainsi un risque de contamination de la chaîne alimentaire. A ce titre, les végétaux constituent un bon indicateur de la biodisponibilité des polluants dans les matrices solides.

De plus, l'analyse chimique est le plus souvent orientée vers une ou des familles de polluants (pesticides, métaux, HPA, PCB...), ce qui conduit à sous-estimer ou à négliger d'autres polluants potentiellement présents mais non recherchés (liste non exhaustive). La caractérisation écotoxique permet d'estimer la toxicité globale des polluants présents dans la matrice. Cette caractérisation est possible à travers la réalisation de tests de phytotoxicité.

Ces tests de phytotoxicité renseignent sur la toxicité globale de la boue mais ne permettent pas de spécifier la nature du ou des polluants responsables de l'impact mesuré mais contribuent à orienter les mesures à prendre en aval (destination de la boue,...).

Cependant, les besoins d'intervenir en amont pour réduire la toxicité de la boue impliquent une connaissance du ou des polluants responsables de la toxicité pour modifier éventuellement le process ou le traitement de la filière.

3. Fractionnement des boues

3.1. Intérêt du fractionnement

Afin d'expliciter la nature des polluants responsables de la toxicité, une première méthode consiste à comparer les résultats de l'analyse physico-chimique avec les résultats de phytotoxicité et de déterminer à partir de l'effet constaté, la nature des polluants. Cette méthode nécessite d'avoir recours aux tests biologiques de phytotoxicité et aux analyses physico-chimiques, et elle peut donc s'avérer longue et coûteuse.

L'alternative envisagée est de fractionner les polluants de la boue pour les discriminer dans différentes fractions. Chaque fraction est alors testée indépendamment et comparée à la toxicité initialement mesurée sur la boue non fractionnée. Cette démarche permet de limiter l'identification et la quantification des fractions toxiques et renseigne sur les produits majoritairement responsables de la toxicité. Cette connaissance plus précise des polluants toxiques présents dans la boue peut être utilisée lors de la définition d'actions correctives.

3.2. Méthodes de fractionnement

3.2.1. Données bibliographiques

Sur les matrices comme les boues, deux alternatives sont possibles :

- effectuer une lixiviation à l'eau et fractionner le lixiviat,
- effectuer une extraction organique de la boue et fractionner cet extrait.

Dans le premier cas de fractionnement, les polluants sont solubilisés dans l'eau et dans le second cas, les polluants sont dans un solvant organique.

3.2.2. Fractionnement des polluants dissous dans le lixiviat

Ces méthodes sont principalement utilisées pour déterminer la toxicité et la génotoxicité d'effluents (méthode TIE, US EPA, 1989), de percolats de décharge ou de sédiments... Deux techniques sont principalement employées :

- extraction liquide/liquide par solvants organiques,
- adsorption des micropolluants sur résine synthétique suivie d'une élution par des solvants organiques.

- Ces extractions sont réalisées soit sur l'échantillon brut, soit après ajustement du pH à des valeurs neutres, acides ou basiques (3, 7, 9). Ces extractions sélectives, qui permettent la séparation des micropolluants selon leur polarité et leurs caractéristiques physico-chimiques, renseigneront sur la contribution relative des différentes fractions à la toxicité. La fraction neutre contiendra des composés organiques apolaires comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques, la fraction acide des micropolluants ionisables à caractère acide de type phénols et acides organiques, et la fraction alcaline des composés à caractère basique tels que les amines.

Les solvants employés par les auteurs sont pour la plupart apolaires ; de sorte que les opérations d'extraction réalisées au pH généralement neutre des milieux hydriques privilégient l'extraction des micropolluants apolaires, tandis que celle des micropolluants polaires (organiques ou minéraux) ne sera que partielle. L'acidification ou l'alcalinisation de l'échantillon, qui peut remédier à ce problème, présente aussi des inconvénients en induisant des modifications physico-chimiques de certains micropolluants ; par exemple leur hydrolyse.

Une des limites de l'extraction par solvants est qu'elle ne permet pas toujours d'opérer avec des volumes importants d'échantillons. En revanche, c'est une méthode facilement applicable à l'étude des échantillons solides tels que les boues.

- Lorsque le taux de contamination est très faible, l'utilisation d'une technique de concentration des micropolluants par adsorption sur résine ou charbon actif est préférée, en raison de la facilité à traiter de grands volumes d'échantillon (plusieurs dizaines de litres). Toutefois, la filtration sur résine pour les eaux turbides expose au risque de colmatage et a une perte possible des composés toxiques liés aux particules.

Pour pallier aux faibles quantités de micropolluants généralement présents dans les milieux analysés, les facteurs de concentration appliqués sont très élevés. Cependant, les rendements d'extraction sont rarement précisés par les auteurs, bien que le résultat des essais et leur interprétation soient directement liés % à ce paramètre.

Lorsque ces fractionnements sont réalisés sur colonne C₁₈ ou gel de silice, le lixiviat peut être préalablement ajusté à différents pH (en général 3, 7, 9) afin de limiter l'ionisation des polluants organiques et d'augmenter leur rétention sur ces colonnes.

Les polluants fixés sont alors désorbés de la colonne par l'utilisation d'un ou de différents solvants ou mélanges de solvants (Svenson *et al.*, 1996).

- Les extraits obtenus par extraction liquide/liquide ou par extraction liquide/solide constituent les fractions à tester. Ces fractions organiques sont bien souvent très toxiques. (utilisation de solvants comme le pentane, l'hexane, le dichlorométhane...) et doivent être évaporés et repris dans des solvants moins toxiques comme le méthanol ou le DMSO (Diméthyl sulfoxyde) avant d'être évalués par les tests de phytotoxicité.

32.3. Fractionnement de polluants dissous dans un extrait organique de la boue

Deux méthodes sont là encore possibles :

- extraction liquide/liquide à différents pH,
- extraction liquide/solide, puis désorption des polluants.

- ◆ Le principe de l'extraction liquide/liquide est identique à celui précédemment exposé et nécessite différents ajustements de pH en vue de séparer les polluants en fonction de leur ionisation (Mueller, 1991 ; Ho, 1993, 1994).
- ◆ La rétention de polluants dans une colonne C₁₈ ou gel de silice peut également être envisagée pour permettre l'élution ultérieure à l'aide de différents solvants ou mélanges de solvants (Ho, 1993-1994 ; Boxall, 1995).

3.2.4. Limites de ces méthodes

Les extractions liquide/liquide ne sont pas assez sélectives et même en imposant un pH donné, certains polluants ionisables peuvent par exemple, migrer vers des fractions neutres. Les différentes fractions peuvent donc se recouvrir et un même polluant peut être présent dans plusieurs fractions. Il est alors primordial de connaître exactement les polluants à rechercher pour ajuster le pH des extractions liquide/liquide afin de limiter ces recouvrements ce qui est impossible dans le cas de matrices complexes où les polluants ne sont pas obligatoirement connus a priori.

De plus, ces modifications de pH peuvent provoquer des réactions d'hydrolyse, modifiant le contenu des phases en présence (dégagement de gaz lors de l'ajout de la solution acide ou basique dans l'ampoule à décantier).

Ces étapes sont longues et ne peuvent être utilisées pour traiter des volumes importants de lixiviats ou d'extraits.

Ces recouvrements existent également dans le cas des extractions liquide/solide. L'analyse des différentes fractions obtenues après élution de la phase C₁₈ (Boxall, 1995) montre que certains polluants sont présents dans des fractions à priori de polarité différentes (Anthracène, Pyrène,...).

De plus, les polluants retenus par la colonne C₁₈ ne sont pas obligatoirement élués par la suite. Certains peuvent être difficiles à extraire de la colonne. Des taux de recouvrement peuvent être calculés quand des polluants recherchés sont connus. Ce type de séparation est envisageable pour des quantités importantes de lixiviats ou d'extraits mais nécessite d'avoir recours à une étape de filtration pour empêcher le colmatage des colonnes mais avec le risque d'éliminer des polluants liés aux matières en suspension ou aux colloïdes.

3.3. Méthode de fractionnement proposée

D'autres méthodes existent comme celle de Doi (1989) dans laquelle la toxicité due aux polluants minéraux (métaux, cyanures, chlorure, . . .) est séparée de celle due aux polluants organiques par des passages sur résine cationique, anionique, sur des charbons actifs et du gel de silice. Dans ce protocole, les fractions organiques collectées ne sont cependant pas fractionnées.

La méthode proposée permet de séparer les polluants organiques polaires et moyennement polaires, des polluants organiques apolaires. De plus, elle permet également d'évaluer la toxicité due aux polluants minéraux. La démarche est explicitée par les figures 1 et 2.

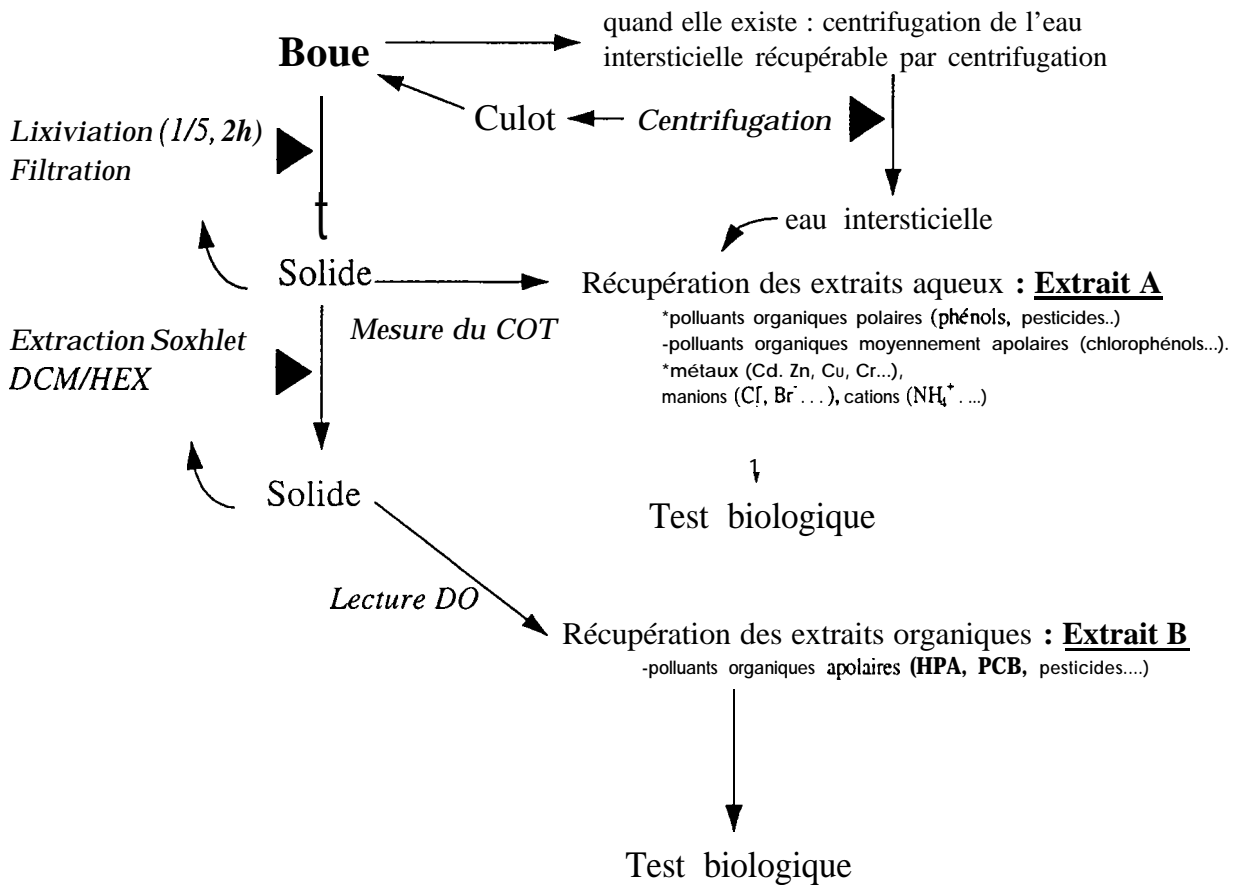


Figure 1. Protocole de fractionnement des polluants des boues

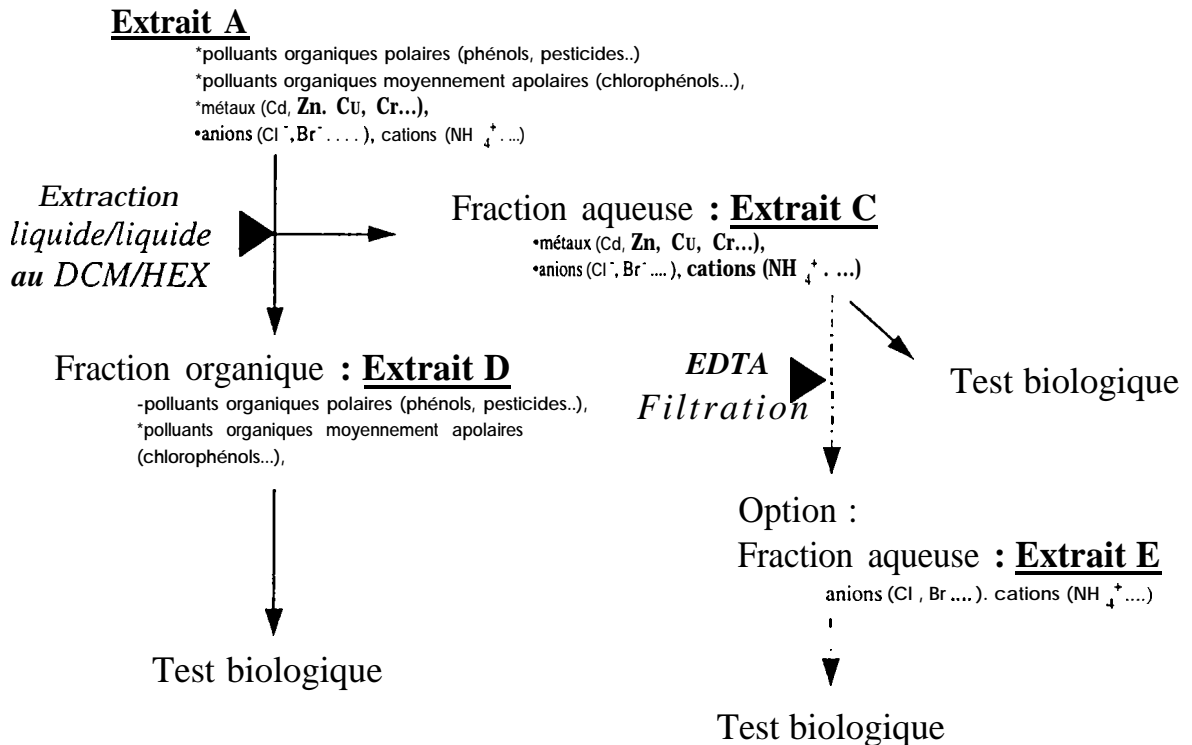


Figure 2. Protocole de fractionnement du lixiviat

La boue est donc extraite en deux temps :

1. La première étape discrimine les polluants solubles dans l'eau des polluants apolaires.

- Une lixiviation¹ permet de séparer les polluants mobilisables à l'eau (molécules organiques polaires, métaux lourds, anions, cations...). Cette lixiviation est répétée un minimum de 6 fois jusqu'à épuisement du carbone organique total (COT) dans le lixiviat. Ces lixiviats sont mélangés et constituent l'extrait A, directement évalué par les tests biologiques.
- Le résidu solide de la boue est ensuite extrait par soxhlet pendant 12 h à l'aide d'un mélange 50/50 de Dichlorométhane/Hexane (DCM/HEX) afin de récupérer les molécules organiques apolaires (HPA, PCB, pesticides...) (les molécules organiques polaires ayant été déjà extraites).

Ces étapes de lixiviation seront tripliquées afin de connaître la variabilité de l'étape d'extraction. Celle-ci sera estimée par rapport à des paramètres globaux respectivement le pH, le COT et la densité optique.

2. La seconde étape discrimine les polluants organiques solubles des polluants minéraux solubles

- Une partie du lixiviat est extraite par une extraction liquide/liquide (au DCM/HEX) qui sépare les polluants organiques des polluants minéraux. Ces derniers restent dans la fraction aqueuse (extrait C) alors que les polluants organiques migrent dans le solvant organique (extrait D).
- Afin d'éliminer les traces de solvant dans l'extrait C, un bullage dans l'azote peut s'avérer nécessaire avant tout test biologique.

Cette méthode en deux étapes permet d'évaluer :

- la toxicité mobilisable à l'eau (figure 1, extrait A), puis de la fractionner (figure 2, extraits C et D)
- la toxicité organique potentielle de la boue (figure 1, extrait B).

Ces étapes d'extraction liquide/liquide seront tripliquées afin de connaître la variabilité de l'étape d'extraction. Celle-ci sera estimée par rapport à des paramètres globaux comme le pH, le COT et la densité optique.

La variabilité des étapes de préparation (lixiviation et extractions liquide/liquide) étant estimée, les différents extraits seront combinés afin de fournir un volume suffisant pour la réalisation des tests de phytotoxicité.

¹ La lixiviation sera réalisée avec un rapport solide/liquide de 1/5, pendant 2h. Le cumul des 6 fractions sera égal à celui de la lixiviation NF X31-210 conduite 3 fois à savoir 1/30.

Le tableau 2 reprend les extraits réalisés et les familles de polluants susceptibles d'être présents.

	Méthode d'obtention de l'extrait	Nature de l'extrait	Nature des polluant présents
Extrait A	Lixiviations aqueuses successives de la boue	Aqueux	<ul style="list-style-type: none"> • Polluants organiques polaires et moyennement apolaires • Métaux lourds • Anions • Cations
Extrait B	Extraction organique soxhlet au DCM/HEX du culot obtenu après lixiviation	Organique	Polluants organiques apolaires
Extrait C	Phase aqueuse obtenue après extraction L/L de l'extrait A dégazée à l'azote	Aqueux	<ul style="list-style-type: none"> • Métaux lourds • Anions • Cations
Extrait D	Phase organique obtenue après extraction L/L de l'extrait A	Organique	Polluants organiques polaires

DCM/HEX : Dichlorométhane/Hexane
Extraction L/L : Extraction Liquide/Liquide

Tableau 1. Liste des fractions obtenues et familles de polluants prédominantes

Finalement, une dernière option pourrait être de fractionner l'extrait C à l'aide par exemple, d'une chélation à l'EDTA pour éliminer du lixiviat les métaux et évaluer ainsi par différence leur toxicité (figure 2).

Ces fractions étant susceptibles d'évoluer, elles seront conservées à 4°C après obtention et la durée séparant leur préparation du test devra être inférieure à 1 semaine.

L'ensemble de ces fractions permet de caractériser les molécules organiques et minérales responsables de la toxicité éventuellement mesurée. Cette méthode permet de s'affranchir de l'utilisation des colonnes (C18, gel de silice...) et des étapes d'ajustement de pH limitant ainsi la perte des polluants dans les colonnes, les recouvrement éventuels de familles de polluants et les transformations des polluants suite à l'emploi d'acides ou de bases. De plus, l'emploi de lixiviations et d'extractions successives permet d'obtenir des volumes plus importants de lixiviats ou d'extraits pouvant ensuite être divisés pour le fractionnement ultérieur ou les tests biologiques. Les différentes fractions organiques ou aqueuses obtenues après extraction liquide/liquide posent le problème des blancs permettant d'évaluer la toxicité inhérente à la préparation des fractions.

3.4. Tests biologiques et blancs

Lors de la comparaison et de l'expression des résultats, les valeurs de toxicité mesurées doivent être relativisées par rapport à la toxicité des solvants et des extraits (extraits organiques et lixiviats) dans les mêmes conditions.

3.4.1. Définition des blancs

Les blancs doivent subir le même traitement que l'échantillon évalué afin d'estimer la toxicité inhérente au protocole opératoire. Le tableau 3 regroupe les démarches possibles pour l'obtention de blancs en fonction de la fraction considérée.

	Méthode d'obtention de l'extrait	Nature de l'extrait	Préparation du blanc
Extrait A	Lixiviations aqueuses successives de la boue	Aqueux	Lixiviation de sable préalablement rincé à l'acide
Extrait B	Extraction organique soxhlet au DCM/HEX du culot obtenu après lixiviation	Organique	Calcination (550°C) d'une partie du culot obtenu après lixiviation et extraction organique (DCM/HEX)
Extrait C	Phase aqueuse obtenue après extraction L/L de l'extrait A après dégazage à l'azote	Aqueux	Extraction L/L d'eau distillée
Extrait D	Phase organique obtenue après extraction L/L de l'extrait A	Organique	Récupération de l'extrait organique de l'extraction L/L de l'eau distillée
Extrait E (Option)	Phase organique obtenue chélation EDTA de l'extrait C	Aqueux	Chélation de l'eau distillée obtenu après extraction L/L

Tableau 2. Blancs utilisés pour chaque fraction

Ces blancs permettront de relativiser les toxicités mesurées. Bien évidemment, un contrôle de la toxicité des solvants utilisés pour les tests biologiques (méthanol et/ou DMSO) sera également effectué.

3.4.2. Choix des essais biologiques

- **L'essai d'inhibition de croissance racinaire sur laitue** sera réalisé sur **substrat inerte sableux** (conformément à la norme X31-203, ISO 11269-1 de mai 1994) pour éviter toute interaction entre les polluants de la boue testée et la matrice de référence (support de culture). Les essais seront effectués en chambre culturale (Conviron). Les conditions environnementales de l'essai seront collectées et rapportées dans le rapport d'essai (température, humidité, éclairage...). Des témoins positifs (Chlorure mercurique) et négatifs (eau distillée) seront intégrés dans les essais ainsi que les blancs préalablement définis (tableau 3). Les données brutes (longueur de la racine la plus longue pour chaque végétal dans les différents pots) seront reportées ainsi qu'un calcul déterminant la LOEC, la NOEC, la CE₅₀ et la CE₁₀ (logiciel Toxcalc5).

La fraction à tester (lixiviat ou extrait) sera alors incorporée au sable à différentes dilutions et homogénéisée. Après pré-germination des graines sur filtre (sortie de la radicule) celles-ci seront transférées sur les pots expérimentaux et mises en culture.

Pour les essais sur les :

- *lixiviats, la gamme de concentration sera réalisée par l'apport de différentes quantités du lixiviat sur le support sableux de culture. L'arrosage sera ensuite réalisé avec de l'eau osmosée,*
- *extraits organiques, la gamme de concentration sera réalisée par l'apport de différentes quantités d'extrait puis évaporation du solvant. L'arrosage sera ensuite réalisé avec de l'eau osmosée.*

Les dates de début et de fin de test ainsi que la date d'obtention des fractions testées seront consignées et devront respecter un délai inférieur à une semaine.

3.5. Volumes à considérer

Lors d'essai préliminaires pour des tests de germination et de croissance, les quantités de sable utilisées étaient de 200 g et l'humidité des échantillons était ajustée avec 250 ml d'eau osmosée (ce, pour 20 graines). En considérant ces données, et en se plaçant dans le cas d'une faible toxicité des lixiviats (la gamme de dilution débutera donc avec 250 ml de lixiviat, quantité maximale apportée pour 200 g de sable) les quantités suivantes nécessaires à la réalisation de la gamme de dilution sont présentées dans le tableau 4.

Gamme de dilution (en %)	Quantité requises (en ml / 200g de sable)
100	250
90	225
80	180
70	126
60	75.6
Volume total (minimal)	860
Volume pour 3 réplicats	2600

Tableau 3. Quantité requise **pour** la réalisation des tests de phytotoxicité

Les quantités requises sont, pour un minimum de 3 réplicats par concentration de 2600 ml pour l'extrait A mais également pour l'extrait C (obtenu après extraction liquide/liquide de l'extrait A) et pour l'extrait optionnel E, **soit un total de 7800 ml**, auxquels il convient d'ajouter 1000 ml pour chaque extrait, pour la réalisation d'analyses physico-chimiques complémentaires lors de l'étape de confirmation soit **un total de 10800 ml (environ 11 l de lixiviat)**.

Les lixiviats sont produits lors de l'étape de lixiviation, répétés 6 fois avec des rapports massiques 1/5 et tripliqués pour une même boue. Le tableau 5 présente le détail du calcul permettant d'obtenir les volumes nécessaires.

Masse de sol	150 g
Volume maximal récupéré	750 ml
Nombre de lixiviations	6
Volume maximal généré par rélicat	4500 ml
Nombre de réplicats	3
Volume maximal généré	13500 ml

Tableau 4. Récapitulatif des quantités de sol et de volume de lixiviat généré

Les quantités d'eau générées par la lixiviation de 150 g de boue (soit 4500 ml) peuvent paraître importantes mais sont nettement inférieures à celles rencontrées sur le terrain. En effet, en considérant un épandage de 3 t de matière sèche à l'hectare et une pluviométrie de 800 mm par an, le volume d'eau apporté sur 150 g de boue correspond à 40 l (soit 10 fois plus).

Lors des extractions par soxhlet et liquide/liquide (respectivement extraits B et D), les volumes de Dichloromethane/Hexane ne peuvent en aucun cas être aussi importants, ce d'une part pour éviter la dilution des produits extraits et d'autre part dans un souci de protection de l'environnement et de la santé. Un volume maximal de 1000 ml est alors raisonnable pour les différents extraits.

Un volume minimal de 10 ml de solvant est suffisant pour permettre l'homogénéisation de 200 g de sable. Il doit être considéré comme la dernière dilution à envisager. Le volume nécessaire en considérant 5 concentrations testées, avec un facteur de progression maximal de 2 est de 310 ml, soit pour 3 réplicats **un total** de 930 ml. Il faut un volume minimal de 1000 ml pour le soxhlet et l'extraction liquide/liquide (les 70 ml étant conservées pour l'analyse). La figure 3 récapitule les différentes étapes de fractionnement.

3.6. Etape de confirmation

Cette étape optionnelle peut être réalisée :

- sur la base de la toxicité des polluants identifiés après analyses chimiques (CPG-SM, Chromatographie ionique, ICP...). Il faut alors avoir recours à des bases de données (Terrabase et/ou DOSE) précisant l'impact des polluants identifiés sur la flore,
- par des étapes optionnelles de fractionnement comme l'extrait E obtenu après chélation à l'EDTA de l'extrait C (tableau 1).

Les volumes obtenus suite aux lixiviations et extractions successives devront alors être suffisants pour pratiquer une ou les deux analyses. Cependant se pose ici le problème de la conservation des échantillons (Ho, 1993). Ils seront conservés à 4°C avant toute analyse ou test ultérieur.

Les analyses à effectuer sur les différents extraits sont récapitulées dans le tableau 6.

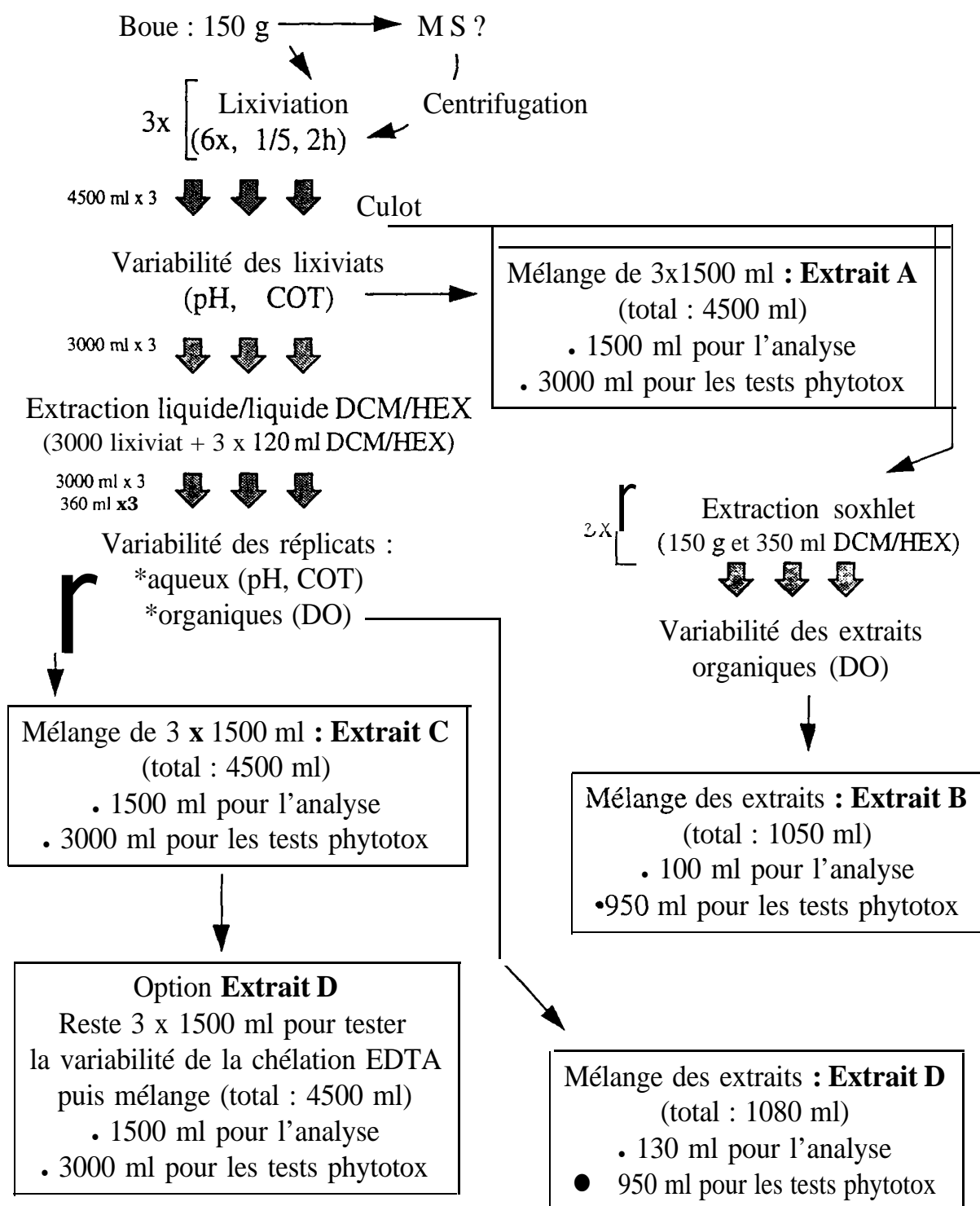


Figure 3. Protocole détaillé du fractionnement

	Nature des polluants	Détection			
		GC/SM	HPLC/barette	GC/ECD I	C P
Extrait A	polluants organiques polaires et moyennement apolaires Métaux lourds anions cations	X	X	X	X
Extrait B	Polluants organiques apolaires	X	X	X	
Extrait C	Métaux lourds anions cations				X
Extrait D	Polluants organiques polaires	X	X	X	
Extrait E	extrait C sans les métaux anions cations				X
TOTAL		3	3	3	3

Tableau 5. Analyses physico-chimiques envisagées sur les différents extraits obtenus.

Soit pour 1 prélèvement de boue sur le plan analytique.

3 GC/SM
3 HPLC/barette
3 GC/ ECD
3 ICP

4. Perspectives

Le protocole de fractionnement sera appliqué aux cinq boues choisies par l'Agence de l'Eau.

5. Bibliographie

Boxall Alistair B. and Maltby Lorraine, 1995. The characterization and toxicity of sediment contaminated with road runoff. *Wat. Res.* Vol. 29, n° 9, pp 2043-2050.

Doi J. 1989. Complex mixtures. *Handbook of Ecotoxicology*. Calow P. pp 289-310.

Ho Kay T.Y and Quinn James G., 1993. Physical and chemical parameters of sediment extraction and fractionation that influence toxicity, as evaluated by Microtox. *Envir. Toxicol. and Chem.*, Vol. 12, pp 615-625.

Ho Kay T.Y., 1994. The influence of sediment extraction fractionation methods on Bioassay results. *Environ. Toxicol. and Water Quality*. Vol. 9, pp 145-154.

Middaugh D.P, Mueller J.G., Thomas R.L, Lantz S.E, Hemmer M.H., Brooks G.T and Chapman P.J, 1991. Detoxification of pentachlorophenol and creosote contaminated groundwater by physical extraction : chemical and biological assessment. *Environ. Contam. Toxicol.* Vol. 21, pp 233-244.

Mueller Lantz S.E, Blattman B.O, Chapman P.J., 1991. Bench scale evaluation of alternative biological treatment processes for the remediation of pentachlorophenol and creosote contaminated materials : solid phase biodegradation. *Env. Sci. Techn.* Vol. 25, pp 1045-1055.

Swenson Anders, Norin Harald and Hynning Per-Ake, 1996. Toxicity-directed fractionation of effluents using the bioluminescence of *Vibrio fischeri* and gas chromatography/mass spectroscopy. Identification of the toxic components. *Envir. Toxicology and Water Quality*, Vol. 11, pp 277-284.

US EPA/600/6-91/003, 1991. Methods for aquatic toxicity identification evaluations. Phase 1 : toxicity characterization procedures.

ISO 11269-1 X 31-203, mai 1994. Détermination des effets des polluants sur la flore du sol. Partie 1 : Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.

Partie 2 : Méthode sur le mesurage des effets de produits chimiques sur les plantes supérieures. Effets des substances chimiques sur l'émergence et la croissance des plantes supérieures.