



HAL
open science

Contribution à l'élaboration d'une méthodologie pour évaluer les dangers et les risques liés aux matériaux solides contaminés

Antonio Bispo

► **To cite this version:**

Antonio Bispo. Contribution à l'élaboration d'une méthodologie pour évaluer les dangers et les risques liés aux matériaux solides contaminés. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Lorraine, 1998. Français. NNT : 1998INPL077N . tel-01750741

HAL Id: tel-01750741

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750741v1>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

136019 033 6

Institut National Polytechnique de Lorraine
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie
et des Industries Alimentaires
Laboratoire Sols et Environnement
associé à l'Institut National de la Recherche Agronomique

98INPL0170

IRH Environnement
Département Recherche

[M] 1998 BIS PO, A.

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

THESE

présentée en vue d'obtenir le titre de

Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine

en

Sciences Agronomiques

par

Antonio BISPO

Contribution à l'élaboration d'une méthodologie pour évaluer les dangers et les risques liés aux matériaux solides contaminés

Soutenue publiquement le 9 Octobre 1998 devant la Commission d'Examen :

Jury :

Michel SARDIN, Directeur de Recherche CNRS, ENSIC/INPL	Président
Gabriel BITTON, Professeur, Université de Floride	Rapporteur
Paule VASSEUR, Professeur, Université de Metz	Rapporteur
Peter HANSEN, Professeur, Université de Berlin	Examineur
Michel JAUZEIN, Directeur de la Recherche, IRH Environnement	Examineur
Jean Louis MOREL, Professeur, ENSALA-INRA/INPL	Examineur
Denis SAVANNE, Ingénieur, Ademe	Examineur

Remerciements

Cette recherche s'est déroulée dans le cadre d'une convention CIFRE (N° 130/95), liant le Laboratoire Sols et Environnement associé à l'Institut National de la Recherche Agronomique de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires, dirigé par Jean-Louis MOREL, et le département Recherche de IRH Environnement, dirigé par Michel JAUZEIN.

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux directeurs de thèse auprès desquels j'ai pu trouvé conseil, soutien, écoute et inventivité. Ils ont été mes guides, l'un du côté de la recherche universitaire et l'autre du côté de la recherche appliquée, donnant à ce travail une double orientation. Michel JAUZEIN a suivi au quotidien l'avancement des travaux, à l'IRH Environnement. Jean Louis MOREL a été l'œil neuf, qui apporte un éclairage inattendu sur les résultats. Qu'ils soient remerciés pour leur aide et leur confiance.

J'exprime mes sincères remerciements à Paule VASSEUR qui, bien qu'occupée par ses nombreuses responsabilités, a accepté de commenter et de juger ce travail. Qu'elle soit remerciée pour l'honneur qu'elle me fait d'accepter d'être rapporteur de cette thèse.

J'exprime ma gratitude à Gabriel BITTON, qui a su me faire passer, lors de son enseignement à l'ENSAIA, sa passion pour la recherche en toxicologie de l'environnement. Je le remercie de l'honneur qu'il me fait de juger ce travail en tant que rapporteur.

Je remercie Denis SAVANNE, Ingénieur ADEME, coordinateur du programme national « Ecotoxicité des sols et des déchets », d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse. Il a suivi ce travail en y apportant des remarques constructives et a contribué à en améliorer le contenu.

Je remercie également Michel SARDIN et Peter HANSEN de participer au jury, et d'y apporter leurs compétences.

Ce travail, réalisé dans le cadre d'une convention CIFRE, a été co-financée par l'ANRT et par IRH Environnement. Je remercie ces deux structures et plus particulièrement, Jean-Claude BOEGLIN, Directeur Général de IRH Environnement au début de la thèse, et Yves BERNHEIM, actuel Président Directeur Général, de m'avoir fait confiance.

Mes remerciements vont également à Isabelle FEIX, Ingénieur ADEME, pour les idées échangées et à René GOUBIER, de l'équipe Sites et Sols pollués de l'ADEME pour la possibilité qu'il m'a offerte de compléter ma formation lors d'un séjour au Ministère de l'Environnement et de la Faune de Québec. Au contact de Aristide BOUCHARD, Claude THELLEN, Raynald CHASSE, Louis MARTEL, Christian BASTIEN et Anne-Marie LAFORTUNE, j'ai pu approfondir les notions de danger et de risque pour les écosystèmes, et compléter mes connaissances en écotoxicologie.

Au cours de ces années, j'ai bénéficié du soutien chaleureux et amical de l'ensemble du personnel de IRH Environnement. J'ai trouvé auprès d'eux aide logistique et matérielle, assistance technique, critiques constructives et stimulation. Je tiens tout d'abord à remercier

Marie-José JOURDAIN, responsable du laboratoire de Microbiologie et d'Ecotoxicologie, pour son soutien permanent, ses conseils avisés et sa disponibilité. Sa fraîcheur d'esprit et son inventivité ont contribué à améliorer la qualité de ce travail. J'exprime également toute ma gratitude à Yves BARTHEL, Nathalie FISCHER et Nathalie MAUGUE, techniciens du laboratoire de Microbiologie et d'Ecotoxicologie pour leur aide quotidienne et leurs conseils. De même, mes remerciements les plus vifs vont à Clara RODRIGUEZ et à Jean-Louis HAAG dont l'expérience, l'amitié et les encouragements m'ont accompagné au long de ce travail. J'adresse mes plus sincères remerciements à tous les autres membres du service Recherche : Rachel BRIN, Evelyne CHILLET, Frédéric CUNY, Gérard d'AMBROSIO, Gérard GRAPIN, Guy JONCA, François SIEBERT, Hugues SOYER et Alain VAUTRIN. Ils ont enrichi ma formation par leurs connaissances et leurs compétences. Je voudrais également associer aux remerciements Monique de SILVESTRI, David GEHANT et Pierre WETTERHOLD pour l'aide technique qu'ils m'ont apportée au cours de ce travail.

Malgré mon éloignement, les membres du Laboratoire Sols et Environnement ont toujours su m'intégrer dans leur groupe. Qu'ils en soient remerciés. J'exprime toute mon amitié à Guillaume ECHEVARRIA, Eric LICHTFOUSE, Corinne PERRIN-GANIER, Michel SCHIAVON, Christophe SCHWARTZ et Denis VEIN, pour leur amitié et leur soutien. De même, il m'est agréable de remercier Madeleine LEROUVILLOIS pour sa sympathie, sa bonne humeur et sa disponibilité.

Qu'il me soit permis d'associer à ces remerciements toutes les personnes non citées qui, d'une façon ou d'une autre, ont participé à mes travaux et les ont suivis.

Finalement, je tiens à exprimer ma reconnaissance à mes parents, mon frère et à l'ensemble de ma famille pour m'avoir toujours soutenu et encouragé au cours de ces dernières années. Mes derniers remerciements vont à Isabelle qui a supporté (au sens propre et figuré) cette aventure. C'est à eux que je dédie ce travail.

Sommaire

1. INTRODUCTION ET PROBLÉMATIQUE.....	5
2. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	7
2.1 LES MOLÉCULES POLLUANTES PRINCIPALEMENT RECHERCHÉES.....	7
2.1.1 <i>Cas des sols</i>	7
2.1.2 <i>Cas des déchets</i>	8
2.2 ETAT ET DEVENIR DES POLLUANTS DANS LES MATRICES SOLIDES COMPLEXES.....	9
2.3 EFFET DES POLLUANTS SUR LES ORGANISMES.....	11
2.4 CARACTÉRISATION DU DANGER TOXIQUE.....	14
2.5 L'ÉCOTOXICOLOGIE : DÉFINITIONS ET APPROCHES GÉNÉRALES.....	15
2.5.1 <i>Définitions</i>	15
2.5.2 <i>L'écotoxicologie au laboratoire</i>	16
2.6 L'ÉCOTOXICITÉ APPLIQUÉE AUX MATRICES SOLIDES.....	17
2.6.1 <i>L'approche directe</i>	17
2.6.2 <i>L'approche indirecte : mise en évidence au laboratoire de la mobilité des polluants</i>	25
2.7 EXTRACTIONS PAR LIXIVIATION : LES DIFFÉRENTS CHOIX TECHNIQUES.....	30
2.7.1 <i>Le type et la granulométrie de l'échantillon</i>	30
2.7.2 <i>La nature du solvant de lixiviation</i>	31
2.7.3 <i>Choix des conditions de lixiviation (volume d'extractant, durée et mode d'agitation)</i>	32
2.7.4 <i>Prétraitement du lixiviat avant la réalisation du test biologique</i>	32
2.7.5 <i>Les tests biologiques de toxicité (biotests) utilisés sur les lixiviats ou les extraits</i>	33
2.8 CONCLUSION ET OBJECTIFS.....	35
3. CHOIX DES MATÉRIAUX ET DES TESTS BIOLOGIQUES UTILISÉS DANS LE CADRE DE LA RECHERCHE.....	39
3.1 CHOIX DES MATÉRIAUX.....	39
3.1.1 <i>Contamination au laboratoire d'un échantillon de terre</i>	39
3.1.2 <i>Définition et prélèvements des échantillons issus de sites en friche (terres souillées) ou de sites de production (déchets)</i>	42
3.2 CHOIX DES TESTS BIOLOGIQUES DE TOXICITÉ.....	44
3.2.1 <i>Choix de la batterie de tests biologiques</i>	44
3.2.2 <i>Test Microtox® en phase solide</i>	47
3.2.3 <i>Intégration des réponses des tests biologiques</i>	48
3.3 CONCLUSION.....	49
4. MOBILITÉ DES POLLUANTS ET EXPRESSION DE LEUR TOXICITÉ EN FONCTION DES CONDITIONS DE LIXIVIATION ET DE LA NATURE DU TEST BIOLOGIQUE.....	50
4.1 EFFET DES CONDITIONS DE LIXIVIATION ET DE PRÉTRAITEMENT DE L'ÉCHANTILLON SUR LA MOBILITÉ DES POLLUANTS ET L'EXPRESSION DE LEUR TOXICITÉ.....	50
4.1.1 <i>Effet du rapport massique solide/liquide et de la durée d'extraction</i>	50
4.1.2 <i>Effets de la filtration des lixiviats aqueux et de la nature du solvant de lixiviation</i>	54
4.2 INFLUENCE DU TEST BIOLOGIQUE ET DE LA MÉTHODE D'EXPOSITION SUR LA RÉPONSE TOXIQUE.....	57
4.2.1 <i>Sensibilité des essais biologiques aux polluants extraits</i>	57
4.2.2 <i>Réaction du test Microtox® lors de l'exposition à des éléments traces métalliques</i>	59
4.2.3 <i>Effet de la méthode d'exposition</i>	60
4.3 DISCUSSION.....	61
4.3.1 <i>Impact des conditions de lixiviation et de prétraitement de l'échantillon sur la mobilité et la toxicité des polluants</i>	61
4.3.2 <i>Influence de la nature du test biologique, de la durée et de la méthode d'exposition, sur l'expression de la toxicité</i>	65
4.4 CONCLUSION.....	67

5. MOBILITÉ ET TOXICITÉ DES POLLUANTS DANS LES ÉCHANTILLONS DE TERRE ET DE DÉCHETS CONTAMINÉS	69
5.1 MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	69
5.1.1 Description du test MetPLATE®/MetPAD®.....	69
5.1.2 Les protocoles de lixiviation et d'extraction.....	69
5.1.3 Conduite des essais.....	71
5.2 RÉSULTATS.....	72
5.2.1 pH des lixiviats obtenus.....	72
5.2.2 Toxicité et génotoxicité de la fraction extractible à l'eau des matrices industrielles.....	73
5.2.3 Toxicité des échantillons en phase solide.....	74
5.2.4 Toxicité des terres et des déchets liée aux fractions moins solubles.....	76
5.3 DISCUSSION.....	78
5.3.1 Validation du protocole de caractérisation du danger.....	78
5.3.2 Caractérisation de la toxicité des échantillons testés.....	85
5.3.3 Nature des polluants responsables de la toxicité et comportement à long terme des matériaux évalués.....	89
5.4 CONCLUSION.....	93
6. COMPORTEMENT DES POLLUANTS ET DEVENIR DE LA TOXICITÉ EN ESSAIS DYNAMIQUES	94
6.1 MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	94
6.1.1 Caractéristiques et remplissage des colonnes.....	94
6.1.2 Fonctionnement et suivi des colonnes.....	96
6.1.3 Analyses physico-chimiques.....	98
6.1.4 Tests biologiques de toxicité et de génotoxicité.....	99
6.2 RÉSULTATS.....	99
6.2.1 Essais en colonne lysimétrique.....	99
6.2.2 Essais de dégradation en colonne.....	102
6.3 DISCUSSION.....	107
6.4 CONCLUSION.....	110
7. DISCUSSION GÉNÉRALE	111
7.1 RAPPEL DES CHOIX.....	111
7.2 MOBILITÉ ET EXPRESSION DE LA TOXICITÉ DES POLLUANTS DANS LES MATÉRIAUX SOLIDES.....	112
7.2.1 Facteurs affectant la mobilité des polluants en conditions statiques et modifiant l'expression de leur toxicité.....	113
7.2.2 Mobilité et toxicité des polluants en conditions dynamiques.....	113
7.2.3 Importance du test biologique et de la méthode d'exposition sur l'expression de la toxicité.....	114
7.3 CARACTÉRISATION DU DANGER LIÉ AUX MATÉRIAUX UTILISÉS.....	115
7.4 PRÉVOIR LE DANGER À LONG TERME.....	117
7.5 UTILISATION DES OUTILS DE CARACTÉRISATION DE LA MOBILITÉ ET DE LA TOXICITÉ DES POLLUANTS.....	118
7.5.1 Cadre d'utilisation des outils de caractérisation de la mobilité et de la toxicité des matériaux solides contaminés.....	118
7.5.2 Utilisation des outils de caractérisation de la mobilité et de la toxicité des polluants.....	119
7.6 CONCLUSION.....	120
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	122
RÉSUMÉ	136
ABSTRACT	137

PREFACE

Cette recherche s'est déroulée dans le cadre d'une convention CIFRE (N° 130/95), liant le Laboratoire Sols et Environnement (associé INRA) de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA), le département Recherche de IRH Environnement et l'ANRT.

Les travaux effectués ont eu pour cadre les programmes nationaux de recherche sur l'écotoxicité des sols et des déchets, financés et coordonnés par l'ADEME. Ces programmes ont permis de regrouper 15 laboratoires dans un objectif commun : adapter et/ou développer des outils pour évaluer le danger et le risque écotoxique liés aux sols et aux déchets.

Le travail de recherche réalisé s'intéresse principalement à l'utilisation couplée des caractérisations physico-chimiques et des protocoles d'évaluation de la mobilité des polluants avec des tests biologiques capables de mesurer, dans des conditions standardisées, leurs effets toxiques potentiels. Ainsi, ce travail ne prend en compte la mobilité et l'effet des polluants qu'à travers l'utilisation de tests d'écotoxicité aquatique, les tests terrestres ayant été abordés par d'autres laboratoires.

I. Introduction et problématique

Dans quelques centaines d'années, il n'y aura plus sur terre que des lignées de mauvaises herbes, de mouches, de blattes et d'étourneaux, se développant pour occuper un environnement modifié (surtout désertifié) dans le sillage d'une évolution humaine, culturellement inadaptée à l'environnement.

T. L. Erwin

1. Introduction et problématique

Les activités de production industrielle et agricole et l'expansion urbaine sont à l'origine, en France, de plus de 900 sites et de 20 000 ha de friches industrielles répertoriés comme potentiellement pollués, sans tenir compte des sites de faible surface (ADEME, 1994, Lecomte, 1998). Une telle situation, ayant conduit à des contaminations importantes du sol et du sous-sol, est le résultat de conditions de production et de modalités de gestion des déchets sans prise en compte de l'impact sur l'environnement. Le sol était alors considéré comme un "système épurateur" sans faille. La prise de conscience, relativement récente, de sa capacité limitée à accumuler, transformer et dégrader les substances polluantes a été accélérée par la mise en évidence de contaminations naissantes de la ressource en eau. Non seulement le sol n'épure plus les pollutions mais il les libère, constituant une menace à long terme pour l'alimentation en eau potable.

Hérités du passé, les sols pollués doivent faire l'objet d'une gestion particulière et susciter le développement de méthodes de diagnostic et d'élimination des pollutions appropriées. En particulier, il est nécessaire de disposer d'outils permettant d'apprécier les dangers et les risques liés aux sites contaminés et aux déchets solides pour, d'une part, aider à la décision en matière de gestion des sites et, d'autre part, éviter les nouvelles contaminations. Quantifier le risque revient à estimer la probabilité (et l'incertitude liée) qu'un dommage ait lieu. Le risque est défini par deux composantes, le danger (présence de molécules toxiques pouvant entraîner des effets négatifs sur des organismes vivants) et l'exposition des cibles à ce danger. Si les modalités d'évaluation des dangers et des risques entraînés par les substances pures sont désormais bien définies (Directive européenne 93/67/EEC), elles restent très floues pour les matériaux solides contaminés (terres polluées, déchets...). La mobilité et la toxicité des polluants sont des composantes essentielles pour l'estimation des dangers et risques. Aussi, dans ce travail, nous nous sommes fixés comme objectif de mieux définir ces notions pour les polluants contenus dans les matériaux solides, de se doter d'outils pour les appréhender et d'établir une démarche et des méthodes pour leur caractérisation dans l'espace et dans le temps.

Dans un premier chapitre, une analyse de la littérature permet de dresser la liste des méthodes disponibles pour l'étude de la mobilité et de la toxicité des polluants contenus dans des matrices solides (échantillons de terre, sédiments, déchets, boues...) et d'en discuter l'intérêt dans le cadre de l'écotoxicologie terrestre.

Le deuxième chapitre décrit et justifie les matériaux utilisés (échantillons modèles contaminés au laboratoire par des micropolluants métalliques et/ou organiques et échantillons prélevés sur sites) et les choix techniques réalisés (méthodes d'extraction, tests biologiques).

Compte tenu de la variété des protocoles recensés pour la caractérisation de la mobilité des polluants, le troisième chapitre étudie, sur les échantillons modèles, l'effet des conditions de lixiviation sur la mobilité des polluants (capacité à être transférés du milieu solide à la phase liquide, ici l'eau) et l'expression de la toxicité. De même, il présente l'importance du choix du test biologique et de la voie d'exposition sur la mesure de la toxicité. Finalement, un protocole de caractérisation de la mobilité et de la toxicité des pollutions dues aux matériaux solides contaminés est proposé sur la base de cette première étape.

Le quatrième chapitre évalue le protocole précédent sur quatre matériaux industriels prélevés sur des sites industriels en friche (collecte d'échantillons de terre) et en production (collecte de déchets). Cette étape de validation sur des matériaux collectés est nécessaire pour améliorer et préciser les limites du protocole de caractérisation de la mobilité et de la toxicité. A l'issue de cette phase de travail, des hypothèses sont formulées quant à l'utilisation et à l'interprétation des données issues de ce protocole de caractérisation du danger. Elles concernent notamment la prévision sur le long terme du relargage et de la toxicité des polluants.

Le cinquième chapitre étudie par des essais de percolation la lixiviation dynamique des polluants et la toxicité générée sur le long terme. Il appréhende également le devenir de la toxicité en fonction des conditions de dégradation des matériaux.

Enfin, le dernier chapitre discute des connaissances acquises au cours de ce travail et fait le point sur la quantification, dans l'espace et dans le temps, du transfert des polluants des matériaux solides vers les milieux environnementaux et les organismes vivants. Il précise également l'impact des polluants sur ces organismes. Finalement, une démarche globale intégrant l'ensemble des outils développés est proposée. Elle permet l'évaluation des dangers et des risques associés aux matrices solides contaminées.

II. Synthèse bibliographique

Nous sommes des nains assis sur des épaules de géants.

B. Pascal

2. Synthèse bibliographique

Lors du dernier recensement des sites et sols contaminés (Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement, 1997a), 81 % des sites identifiés comme contaminés présentaient également une contamination de la ressource en eau. Les molécules contaminant les sols (et par extension les déchets) peuvent être transférées, via l'air ou l'eau, d'un compartiment environnemental à un autre. Le déplacement des polluants vers l'air et les nappes, susceptible de générer une contamination diffuse et durable, est à l'origine de la prise de conscience du risque sanitaire lié aux matériaux solides contaminés. Si ces risques ne sont actuellement¹ envisagés que vis à vis de l'homme et de son approvisionnement en eau (BRGM et Ministère de l'Environnement, 1995), ces deux cibles ne sont pas les seules à considérer. En effet, les écosystèmes aquatiques sont également concernés par la migration des polluants. De même, les organismes telluriques peuvent également être exposés aux polluants par ingestion de particules contaminées et par contact direct.

Les outils biologiques précédemment développés pour évaluer le danger des substances pures puis, permettre le contrôle et de gestion de la qualité des eaux (OCDE, 1981, Bitton et Dutka, 1986, Blaise *et al.*, 1988, Ramade, 1992, Wong et Dixon, 1995) doivent désormais être étendus à l'évaluation de la toxicité des matériaux solides comme les sols, les sédiments et les déchets, ceci afin de déterminer leurs impacts sur les systèmes aquatiques et terrestres.

La synthèse bibliographique réalisée précise les approches écotoxicologiques pouvant être réalisées dans le cadre de l'étude du danger lié aux polluants des matrices solides et liste le choix des techniques disponibles pour leur caractérisation écotoxique. Cependant, afin de situer les difficultés liées à la caractérisation du danger des matrices solides, un rappel sur la nature, l'état et la mobilité des polluants dans les matrices solides s'impose. De même, une présentation sommaire des méthodes actuelles de caractérisation du danger des déchets et des sols contaminés sera réalisée. Celle-ci soulignera l'insuffisance des caractérisations analytiques et introduira la notion d'écotoxicologie.

2.1 Les molécules polluantes principalement recherchées

L'industrie, l'armée, l'agriculture et les agglomérations urbaines émettent dans l'environnement de nombreux composés minéraux ou organiques de toxicité variable. Ainsi, en 1992, on estimait que plus de 500 nouvelles molécules étaient mises sur le marché chaque année et qu'au total environ 120 000 molécules minérales ou organiques de synthèse faisaient l'objet d'un usage commercial dans le monde. Toutes ces molécules et ces éléments ne peuvent être recherchés de manière exhaustive dans chaque matrice solide contaminée. La définition des molécules à identifier et quantifier est alors dictée par la nature et l'origine de l'échantillon (échantillon de terre ou déchet, type d'industrie..).

2.1.1 Cas des sols

Concernant la pollution des sols, Tarradellas et Bitton (1997) distinguent deux catégories de polluants, les macropolluants et les micropolluants :

⇒ les macropolluants (comme l'azote et le phosphore) sont définis comme des

¹ Une réflexion est en cours pour prendre en considération les risques pour les écosystèmes.

éléments naturellement présents dans le milieu considéré mais dont les concentrations excessives par rapport à celles habituellement rencontrées, génèrent une dégradation du milieu. Les réactions métaboliques impliquant habituellement ces molécules ne sont pas modifiées mais leur cinétique est différente.

⇒ les micropolluants sont définis comme des éléments ou des molécules naturelles ou anthropogéniques capables de modifier et d'altérer les réactions biochimiques, ce, dès de faibles concentrations.

Les micropolluants (organiques ou inorganiques) les plus couramment rencontrés lors de pollutions du sol sont précisés par le tableau 1 (Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement, 1997a).

Nature des polluants	% (756 sites)
Hydrocarbures (alcane, alcènes..)	49
Plomb	20
Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (Naphtalène, Benzo(a)pyrène..)	19
Solvants halogénés (Dichlorométhane, Trichloréthylène..)	15
Chrome	15
Zinc	15
Cyanure	12
Cuivre	11
Arsenic	10
Nickel	8
Polychlorobiphényles (ou terphényles) (206 congénères)	7
Solvants non halogénés (Alcools, Cétones..)	7
Cadmium	7
Mercur	6

Tableau 1. Nature des polluants les plus couramment rencontrés lors des audits de site (Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement, 1997a)

D'autres polluants comme les pesticides (DDT, aldrine...), les résidus d'explosifs (TNT...), les matières plastifiantes (phtalates..) et les phénols sont à ajouter à cette liste (Lecomte, 1998, Tarradellas et Bitton, 1997). La présence de ces molécules polluantes est principalement liée à la nature des activités industrielles, agricoles, urbaines et militaires qui sont à l'origine de la contamination du site.

2.1.2 Cas des déchets

Sur les 7 millions de tonnes de déchets industriels spéciaux (DIS) estimés par l'ADEME en 1995, plus de 50% étaient générés par l'industrie chimique, la production et la transformation de métaux et par l'industrie du charbon. Les micropolluants alors présents dans ces déchets sont un reflet de ces industries, à savoir, des micropolluants inorganiques, des hydrocarbures (légers ou lourds), des solvants, et diverses autres molécules organiques qui sont fonction de la nature de la production réalisée.

La liste des polluants majoritaires présents dans les déchets est comparable à celles des polluants les plus fréquemment rencontrés lors de la contamination des sols. Cette similitude

s'explique par les anciennes pratiques industrielles d'élimination des déchets (anciennes décharges de déchets sans réduction des nuisances, dépôts sans contrôle de déchets, de produits chimiques ou de carburants, déversement, infiltrations de liquides de production...).

Finalement, les molécules les plus fréquemment recherchées lors d'analyses de sols ou de déchets sont :

- ⇒ les micropolluants inorganiques (arsenic, cuivre, chrome, cadmium, nickel, plomb, zinc...),
- ⇒ les hydrocarbures (coupes d'essences, de fuel, les aromatiques..),
- ⇒ les phénols (mono ou pluri substitués)
- ⇒ les polychlorobiphényles et,
- ⇒ les pesticides, si une contamination d'origine agricole est suspectée.

2.2 Etat et devenir des polluants dans les matrices solides complexes

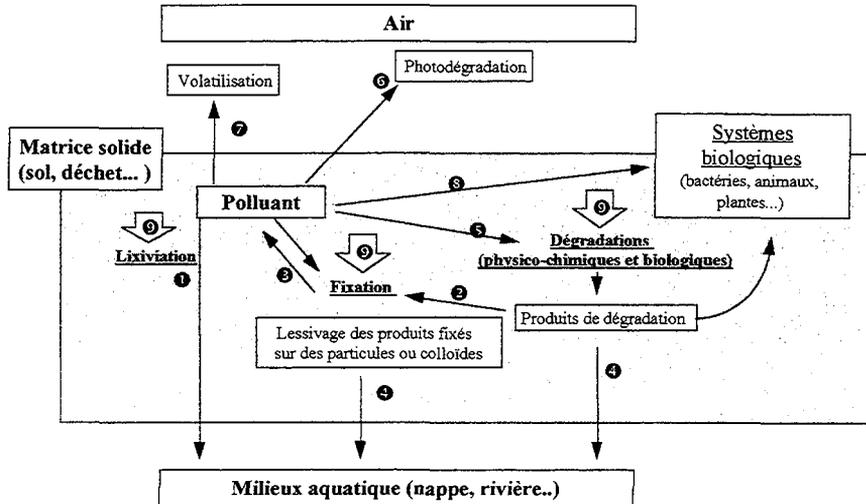
Les matrices solides comme les sols ou les déchets sont des matériaux complexes composés par de nombreux constituants, aux propriétés physiques et chimiques différentes. Ils sont donc généralement très hétérogènes et difficiles à caractériser. Cependant, il est généralement possible de distinguer les compartiments suivants :

- ⇒ l'atmosphère de la matrice,
- ⇒ la solution aqueuse (plus ou moins importante suivant les matrices solides),
- ⇒ les constituants minéraux, de granulométries variées,
- ⇒ la matière organique, non décomposée ou en décomposition,
- ⇒ la biomasse (bactéries, champignons, protozoaires, végétaux, insectes, vers...).

Ces différents compartiments présentent des capacités variables d'interaction avec les polluants. Leur proportion relative et leur nature vont régir la répartition des polluants dans les différentes phases. Cette répartition dépend également des *propriétés physico-chimiques des molécules polluantes* et de *facteurs externes* aux matrices et aux polluants comme le climat (température, humidité, précipitations...), ou l'activité biologique (Andreux *et al.*, 1995). Ainsi, les polluants des matrices solides complexes comme les sols et les déchets peuvent être :

- ⇒ présents dans la phase gazeuse (composés volatils...),
- ⇒ solubilisés dans la phase aqueuse (dissous ou adsorbés, complexés à des constituants solides comme des matières organiques en suspension ou sous forme colloïdale)
- ⇒ adsorbés ou complexés à la surface des constituants minéraux ou organiques des phases solides,
- ⇒ absorbés par la matière organique des phases solides,
- ⇒ transformés et dégradés partiellement ou totalement (dynamique biogéochimique), sous la forme d'autres substances chimiques dérivées.

Toutes ces formes sont en équilibre et peuvent au gré de nombreux facteurs (climatiques, composition du milieu, activité biologique...) être modifiées et générer suivant les cas une augmentation (production de métabolites plus solubles...) ou une réduction (liaison des polluants, minéralisation...) de la mobilité et de la toxicité (Bollag et Loll, 1983, Bollag et Myers, 1992). La figure 1 résume les différents devenir d'un polluant dans les matrices complexes.



 Action des systèmes biologiques

- ❶ L'importance de la lixiviation, du transfert en solution par percolation ou du ruissellement dépend
 - du climat,
 - de la nature de la matrice (ex : pour un sol = $f(\text{structure, texture, porosité}...)$),
 - du type de polluant (solubilité dans l'eau).
- ❷ La fixation ou la rétention des polluants dépend :
 - des constituants de la matrice et notamment :
 - ~ de la quantité et de la nature de matières organiques,
 - ~ de la quantité et de la nature des argiles minérales.
 - des paramètres chimiques de la matrice solide : caractère acido-basique, oxydo-réducteur...
 - du type de polluant (solubilité, hydrophobicité, capacité à créer des liaisons ioniques...).
 - du climat...
- ❸ A la suite de modifications du milieu (diminution du pH, biodégradation, production de biosurfactants...) ou suite à des déplacements d'équilibres, les polluants fixés peuvent être relargués.
- ❹ Les produits fixés ou générés par la dégradation peuvent être entraînés vers la nappe, liés par des particules ou des colloïdes. C'est notamment le cas de la matière organique soluble qui facilite le transport des polluants peu solubles dans l'eau.
- ❺ Dans le cas des polluants organiques, la dégradation des polluants est principalement due à l'intervention des micro-organismes (bactéries et champignons). L'importance de la dégradation physico-chimique dépend du type de polluants, des conditions de milieu, de la nature de sa liaison avec la matrice.....
- ❻ La photodégradation a un rôle restreint car le rayonnement solaire pénètre assez peu dans les matrices solides mais doit être prise en compte suivant les climats considérés et en surface du sol ou des eaux de surface.
- ❼ La volatilisation dépend de la nature du polluant et de la température. Son action est très vite limitée lorsque le polluant est lié aux constituants de la matrice solide.
- ❽ Les différents facteurs définis précédemment régulent la disponibilité des polluants vis à vis des êtres vivants et donc leur toxicité.
- ❾ Les systèmes biologiques (plantes, bactéries...) jouent également un rôle sur la mobilité des polluants. Ils peuvent augmenter (création de molécules plus polaires) ou réduire (biosorption, accumulation, formation de molécules réactives avec les constituants de la matrice) la disponibilité des polluants.

Figure 1. Schéma de synthèse sur le devenir des polluants dans les matériaux solides

2.3 Effet des polluants sur les organismes

Les différentes molécules contenues dans ces matrices solides peuvent altérer la qualité de l'air, de l'eau et du sol, mais à plus grande échelle l'environnement et la santé. Les organismes vivants (aériens, aquatiques et telluriques) vont alors être exposés à ces substances toxiques selon des voies différentes qui dépendent de leur habitat et de leur comportement (déplacement, nutrition...). La réponse de ces organismes aux polluants intervient à plusieurs niveaux biologiques d'organisation. Les modifications observées peuvent être de nature :

- *biochimique* et *physiologique* (surexpression d'enzymes, modification des cycles endocriniens, apparition d'adduits sur ADN...),
- *individuelle* (destruction d'organes, troubles du comportement, ralentissement de la croissance...),
- « *populationnelle* » (mortalité d'individus, réduction de la reproduction, dérive génétique...),
- *communautaire* (perte de la biodiversité, modification des relations trophiques et symbiotiques...),
- *globale* (dysfonctionnement d'un écosystème suite à une eutrophisation, rupture des cycles biogéochimiques...).

Au niveau individuel, la réponse d'un organisme à une concentration croissante de polluant ou à une exposition plus importante, pour à une même concentration, peut être schématisée par la figure 2 (adaptée de Depledge, 1994 cité par Lagadic *et al.*, 1997 et de Hatch 1962 cité par Kroes, 1995).

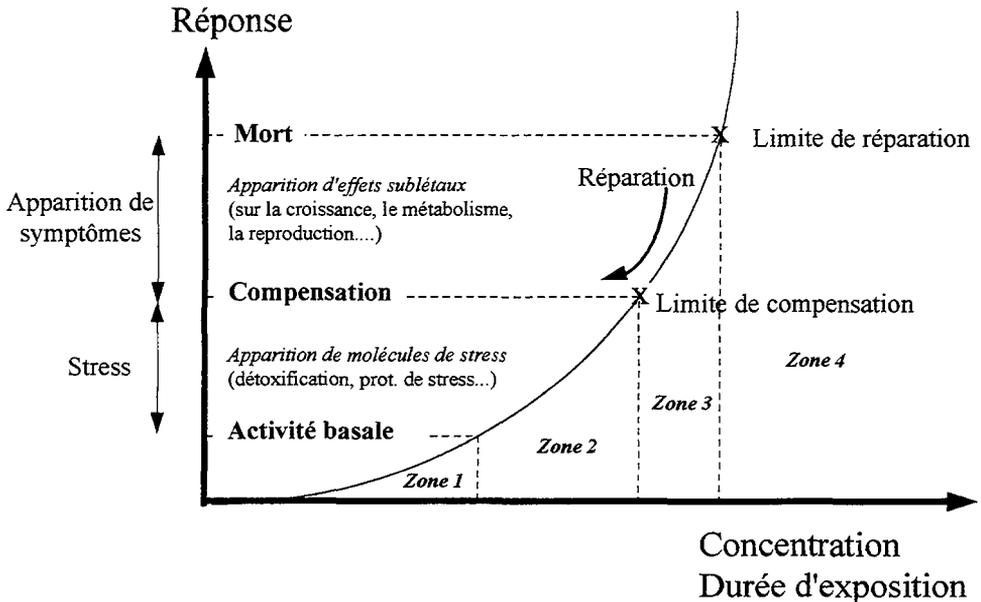


Figure 2. Représentation schématique de la réponse d'un organisme à des concentrations croissantes de polluant ou à une durée d'exposition croissante (adapté de Depledge, 1994 dans Lagadic *et al.*, 1997 et de Hatch, 1962 dans Kroes, 1995)

Sur cette figure, différentes zones peuvent être identifiées :

- zone 1 : la concentration et/ou la durée d'exposition sont faibles ou compensées par l'activité de base de l'organisme (homéostasie). Les " systèmes de compensation " (enzymes, molécules complexantes...) suffisent à tamponner et éliminer les effets des polluants. *Aucune réponse macroscopique, métabolique ou moléculaire de l'organisme testé n'est détectable.*

- zone 2 : la concentration et/ou la durée d'exposition augmentent, l'activité de base est alors insuffisante pour compenser l'effet des polluants. Il y a surexpression de gènes (Bergé et Pasteur, 1997), d'enzymes (cytochromes P450), de protéines (méthallothionéines...) pour augmenter l'activité de base et limiter l'effet des polluants. Cette production peut également s'accompagner d'apparition de nouvelles molécules (non exprimées lors de l'activité de base) indiquant un stress mais n'ayant pas de rôle dans la compensation des effets. Ces deux types de réponse constituent d'une part, les biomarqueurs de compensation produits pour contrer l'effet des polluants, et d'autre part, les biomarqueurs de non-compensation issus de l'exposition aux polluants mais sans but métabolique (Lagadic *et al.*, 1997). *Les concentrations et la durée d'exposition sont insuffisantes pour provoquer des une réponse macroscopique mais les effets des polluants sont observables à l'échelle moléculaire ou métabolique.*

- zone 3 : au delà de durées d'exposition plus longues ou de concentrations plus importantes, la compensation générée par l'augmentation du métabolisme n'est plus suffisante. Des réponses sublétales sont détectées et quantifiées à l'échelle de l'individu (effets sur la croissance, le développement, le comportement, la reproduction...). Si l'exposition cesse, une réparation plus ou moins importante permet de diminuer ou supprimer l'atteinte (suivant le niveau d'atteinte).

- zone 4 : si l'exposition ne cesse pas ou si la concentration augmente, le point limite de réparation est dépassé. Les effets des polluants deviennent trop importantes pour être tolérées par l'organisme, la mort est alors irrévocable.

Le passage d'une zone à l'autre est fonction non seulement de la concentration et de la durée d'exposition, mais également de l'individu lui-même (âge, sexe...). De plus, ces transitions ne sont pas obligatoirement liées aux franchissements de seuils, et peuvent être plus ou moins continues.

Les différentes réponses de l'organisme décrites concernent le métabolisme et les fonctions vitales mais d'autres sont également quantifiables au niveau du génome. Le matériel génétique peut également subir des dommages suite à une exposition. Ces altérations du matériel génétique (effets génotoxiques) peuvent parfois entraîner des mutations dont certaines sont à l'origine du phénomène de cancérisation et peuvent conduire à la fragilisation des espèces. De plus, le fait que les modifications ainsi induites soient héréditaires si elles affectent les cellules germinales, confère à ces altérations un intérêt particulier. Ces altérations peuvent être :

- des mutations ponctuelles ou géniques (modification de quelques séquences de nucléotides, substitution ou addition ou délétion de bases, altération de la séquence de l'ADN),
- des mutations chromosomiques (aberrations structurales : cassure, inversion ou translocation du matériel chromosomique),
- des mutations génomiques (aberrations du nombre de chromosomes).

Pour faire face aux nombreux effets précédemment exposés (moléculaires, cellulaires, individuels...), il est nécessaire de caractériser les matrices solides pour préciser les dangers et les risques inhérents à ces matériaux.

2.4 Caractérisation du danger toxique

Cette caractérisation repose essentiellement sur une démarche analytique chimique qui consiste à identifier et mesurer la concentration totale (caractérisation analytique) ou d'une fraction lixiviable des composés incriminés (caractérisation comportementale¹) (figure 3) et à comparer les concentrations détectées à des seuils réglementaires.

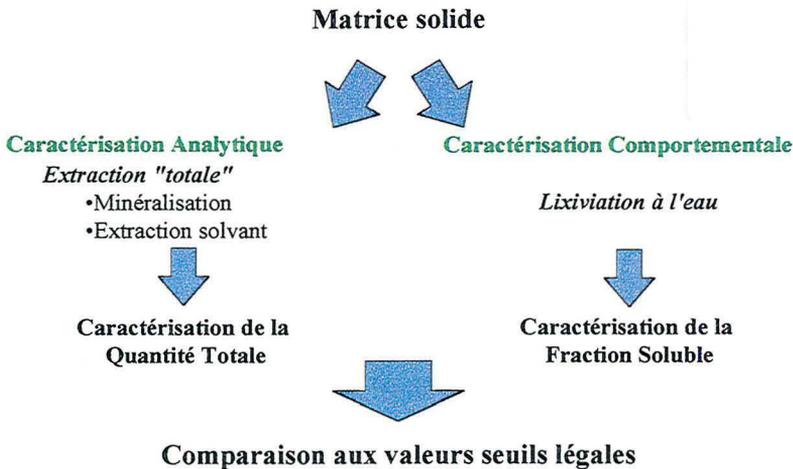


Figure 3. Démarche analytique de caractérisation des matrices solides (Bispo et al., 1996)

Cette approche, basée en grande partie sur l'extraction des polluants puis leur quantification présente des limites :

- la caractérisation analytique totale (minéralisation ou extraction par solvant) libère des fractions non accessibles aux êtres vivants, et modifie la forme chimique du polluant. Ainsi, elle ne rend pas compte de l'état des molécules dans la matrice solide (complexées, adsorbées, libres...),
- la caractérisation comportementale (ici la lixiviation à l'eau) mobilise une partie des fractions directement disponibles aux êtres vivants, mais certains organismes peuvent être exposés à des fractions polluantes peu solubles (ingestion de particules terreuses),
- les extractions « totales » employées sont, le plus souvent, spécifiques d'un polluant et chaque protocole doit être adapté en fonction du composé recherché (*on trouve ce que l'on cherche...*).

¹ Le comportement des matériaux vis à vis de la lixiviation constitue une partie de la caractérisation comportementale, il conviendrait également de caractériser le devenir des polluants suite à la dégradation des matériaux.

Ainsi, les caractérisations chimiques des fractions polluantes fournissent une liste de substances polluantes, précisent leurs concentrations totales ou lixiviables mais ne renseignent en aucun cas sur les effets toxiques des composés seuls ou en combinaison avec d'autres (synergie, antagonisme, potentialisation). Elles sont donc relativement inadaptées pour l'analyse des effets écotoxicologiques. Ces données restent néanmoins nécessaires car elles constituent la base réglementaire actuelle de caractérisation, et utiles car elles constituent des informations fondamentales en terme de danger potentiel.

Il est nécessaire de compléter ces données analytiques¹ par des informations sur les effets écotoxicologiques des polluants contenus dans les matrices solides contaminées, pour qualifier et quantifier leurs impacts sur les organismes vivants, aux différents niveaux d'organisation identifiés (de la molécule à l'écosystème).

2.5 L'écotoxicologie : définitions et approches générales

L'écotoxicologie est une discipline relativement récente née dans les années soixante et dont la définition originale est attribuée à Truhaut (1977). Depuis cette date, de nombreuses autres définitions ont été proposées. L'historique de cette science est proposé et discuté par Rivière (1997a). Il conclue que l'abondance de ces définitions rend confuse et difficile la détermination des objectifs de cette science.

2.5.1 Définitions

A son origine, Truhaut définit l'écotoxicologie comme *"la branche de la toxicologie qui étudie les effets toxiques provoqués par les substances naturelles ou les polluants d'origine synthétique sur les constituants des écosystèmes animaux, y compris l'Homme, végétaux et micro-organismes, dans un contexte intégré"*. C'est une spécialisation dérivée des recherches toxicologiques sur les plantes, les animaux, et les microorganismes, sa fonction étant d'intégrer les données chimiques, toxicologiques et écologiques en vue de détecter, analyser et prédire les problèmes environnementaux (Eijsackers, 1994).

Elle est également définie comme dérivée, non pas de la toxicologie, mais de *l'écologie*, elle a alors *"pour objet de préciser les modalités et mécanismes de la contamination des divers écosystèmes et de la biosphère par les principales catégories de polluants toxiques, leur circulation et leurs transformations biogéochimiques dans ces derniers, enfin leurs effets biocénotiques ainsi que les perturbations qu'ils induisent dans les processus écologiques fondamentaux en particulier dans ceux qui assurent la productivité biologique des écosystèmes et de la biosphère"* (Ramade, 1992). Cette définition recouvre l'étude des polluants (chimiques et physiques) de l'émission, à l'impact... Dans les deux cas, l'écotoxicologie est à l'interface de la chimie environnementale, de l'écologie et de la toxicologie (figure 4).

¹ Concernant les déchets dangereux, cette démarche intégrant la caractérisation analytique chimique et des essais écotoxicologiques est actuellement à l'étude dans le cadre de la classification des déchets dangereux (critère H14, directive européenne N°91-689, 1991, transcrite en droit français par le décret 97-517, 1997).

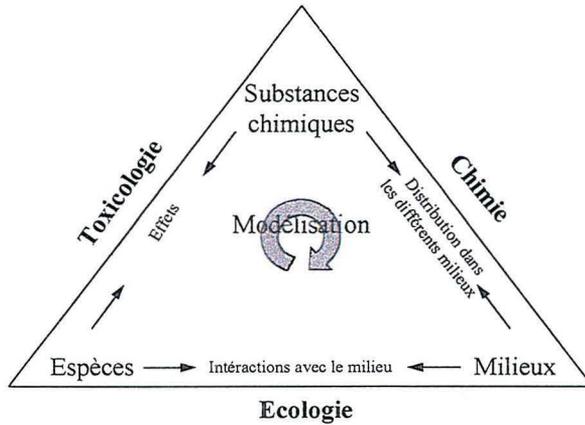


Figure 4. L'écotoxicologie : une discipline pluridisciplinaire (d'après Van Leeuwen, 1995)

En écotoxicologie, la réponse au stress des populations et des communautés a plus d'importance que celle des individus. Cependant, les études de toxicité chronique sur des systèmes plurispécifiques en conditions naturelles ne sont pas encore développées, l'approche pratique nécessite de procéder par étape, en débutant par des tests mono-spécifiques de laboratoire et en établissant des relations concentration-effet dans des limites bien définies (OCDE 1981).

2.5.2 L'écotoxicologie au laboratoire

L'évaluation au laboratoire de la toxicité des polluants utilise des tests mono-spécifiques (sur une seule espèce) et consiste à mesurer la réponse d'organismes sélectionnés et homogènes lors de leur exposition à des polluants (substances pures, effluents, sols contaminés...). Une courbe concentration-réponse est ainsi établie par exposition des organismes à des quantités croissantes de polluants (figure 5).

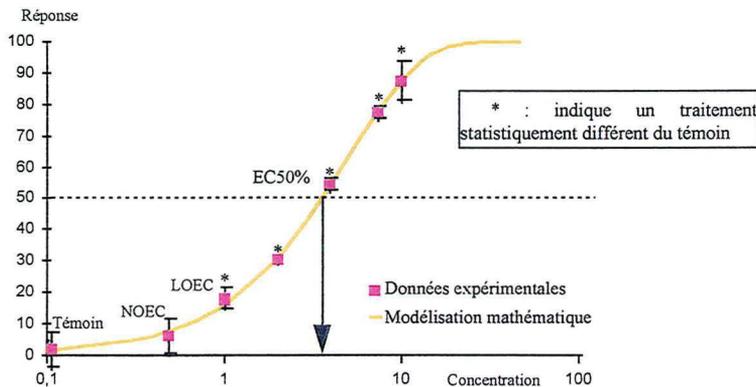


Figure 5. Courbe théorique « Concentration-Réponse »

Il alors possible de résumer la relation entre la concentration et la réponse par les différents descripteurs toxicologiques suivants :

- *NOEC (No Observed Effect Concentration)* : concentration la plus forte testée n'entraînant aucun effet.
- *LOEC (Lowest Observed Effect Concentration)* : concentration la plus faible testée produisant un effet.
- *CEx (Concentration Effectrice produisant x % d'effet par rapport à un témoin)* : concentration estimée (calculée à l'aide de différents modèles de régression) qui engendre x % d'effet. L'estimateur le plus employé est la CE_{50} (concentration en % qui provoque 50% de l'effet mesuré). Ce descripteur est obtenu à partir de la définition de la courbe dose-réponse et non plus à partir de tests statistiques.

Les essais de laboratoire permettent alors d'identifier et de quantifier les effets :

- *moléculaires, cellulaires, génétiques, endocriniens* détectés après exposition d'un organisme à de faibles concentrations de polluants par des mesures d'activités enzymatiques (Walker, 1995), le dosage de protéines de stress (Lagadic *et al.*, 1997), amplifications géniques (Bergé et Pasteur, 1997), rupture des cycles endocriniens (Dickerson *et al.*, 1997, Ankley *et al.*, 1998).
- *chroniques*, détectés après l'exposition d'un organisme à de faibles concentrations de polluants, sur des durées supérieures à 10% de son cycle de vie, par le suivi de la croissance, la reproduction.
- *aigus*, détectés après l'exposition d'un organisme à de fortes concentrations de polluants, sur des durées inférieures à 10% du cycle de vie, par la mesure de la mortalité, de la croissance...

Les essais conduits au laboratoire permettent d'estimer les relations entre l'exposition aux polluants d'un organisme et sa réponse. Ainsi, seul le volet correspondant à l'étude des impacts biologiques des polluants est étudié. Il convient alors de restreindre le terme écotoxicologie au seul terme écotoxicité. Ces études préalables au laboratoire sont nécessaires (mais insuffisantes) pour évaluer les impacts potentiels des polluants sur un ensemble plus vaste d'espèces. En effet, compte tenu de la variabilité intra et/ou inter spécifique (Slooff *et al.*, 1983, Van Straalen, 1994), il est hasardeux d'extrapoler à une communauté ou un écosystème les données obtenues à l'aide de tests biologiques monospécifiques de laboratoire, ce, même si des modèles ont été développés (Stephan, 1986, Kooijman, 1987, Van Straalen et Denneman, 1989, Lokke, 1994).

Jusqu'à présent, l'écotoxicité a été principalement développée dans le domaine de la qualité des milieux aquatiques mais reste encore limitée pour les matrices solides.

2.6 L'écotoxicité appliquée aux matrices solides

Dans cette partie, seront détaillés les tests actuellement utilisés pour caractériser la toxicité des matrices solides. Deux approches peuvent être distinguées : l'approche indirecte utilisant une étape d'extraction, les tests étant ensuite appliqués à la phase liquide récupérée, et l'approche directe où l'organisme est mis directement en contact avec le milieu solide contaminé.

2.6.1 L'approche directe

L'approche consiste à opérer directement sur la phase solide en utilisant des bactéries, des champignons, des protozoaires, des algues, des invertébrés, des plantes ou des mammifères. Avant d'aborder la description de ces différents tests, une discussion concernant la définition du témoin et de la matrice de dilution est incontournable.

En effet, en écotoxicité aquatique, le témoin sans effet ou le diluant est l'eau ultra-pure. En écotoxicité terrestre, le choix du témoin reste un problème fondamental non résolu et est sujet à de nombreuses controverses. Différentes options ont été proposées : utilisation de sable ou d'une autre substance inerte (laine de silice, mousses, billes de verre, argex, arisol...), de terre artificiellement reconstituée (Substrat ISO, Recommandation OCDE N°207, 1984, contenant 10% de sphaignes, 20 % de kaolinite, 70 % de sable industriel, pH ajusté avec du carbonate de calcium) ou encore de terre issue d'un sol exempt de toute pollution et le plus proche possible du sol contaminé étudié (sol jumeau). Le choix peut se justifier en fonction :

- de l'objectif du travail (étude de sols contaminés, de substances pures, comparaison de tests...). Si l'étude se fixe pour objectif de caractériser le danger d'un déchet ou d'une substance pure, la matrice de dilution doit interagir le moins possible avec les polluants étudiés : une matrice inerte (sable...) est alors préférable. Si au contraire, l'objectif est l'étude du danger lié à l'épandage d'un déchet ou d'un amendement, il est préférable de réaliser cette caractérisation avec la terre sur laquelle il va être épandu.
- du test à réaliser. Certains tests, de par leur durée (tests chroniques) et l'organisme utilisé nécessitent l'emploi d'une terre ou d'une matrice dans laquelle il pourra puiser des substances nutritives : l'emploi d'une matrice totalement inerte n'est donc pas possible.

Cette réflexion est nécessaire avant d'utiliser une matrice de dilution avec un test biologique car ce choix peut modifier les résultats et leur interprétation (interaction entre le polluant et la matrice de dilution ou toxicité induite par la matrice inerte par manque de nutriments..) (Jauzein *et al.*, 1998).

La plupart des tests biologiques ont été développés pour évaluer l'impact des substances pures sur les organismes du sol, aussi la description de ces tests s'appuiera essentiellement sur les applications développées pour l'étude de l'impact des polluants sur les sols. Cependant, ces tests sont généralement transposables à la thématique des déchets.

a) Les tests sur la microflore

La microflore (bactéries et champignons) représente en nombre et en diversité la population la plus importante du sol. Ainsi, Reichle (1977, dans Eijsackers 1994) estime que 85,4% de la biomasse d'un sol de forêt est composée par des bactéries et Torsvik *et al.* (1990) montrent par des techniques d'extraction et recombinaison de l'ADN que le nombre total de bactéries d'un échantillon de sol peut atteindre plus de 10^{10} cellules/g de sol, représentées par 4000 génomes différents. Dans les sols, la microflore assure (i) le renouvellement des éléments nutritifs par minéralisation des débris organiques, (ii) la cohésion de la structure du sol, et (iii) la dégradation des polluants. La microflore constitue la principale capacité métabolique et catalytique des sols (Doran et Linn, 1994). L'ensemble de ces activités entretient la fertilité des sols et justifie l'intérêt porté à ces organismes dans le cadre d'études écotoxicologiques. Les

tests biologiques développés pour l'étude de l'impact des substances pures sur la microflore des sols peuvent être divisés en 2 catégories : ceux utilisant les bactéries indigènes et ceux utilisant un ajout de bactéries.

➤ *Tests biologiques utilisant la microflore indigène du sol*

Les effets mesurés sur les microorganismes peuvent être évalués au niveau (Torstensen, 1997) :

- ◇ des populations (dénombrements, identifications,...),
- ◇ des interactions avec des organismes supérieurs (symbioses rhizosphériques..)
- ◇ des activités globales (respiration, fixation de l'azote..),
- ◇ de l'individu (activités enzymatiques, modifications biochimiques et génétiques..).

Ainsi, l'impact des polluants sur :

- les populations est évalué par l'estimation de la microflore totale après dilution et inclusion en milieu approprié (gélose nutritive..) avant une mise en culture. Les colonies formées par les cellules extraites du sol peuvent être isolées et identifiées. Cette méthode repose sur l'extraction des microorganismes de l'échantillon, la nature du milieu de culture et les conditions d'incubation. Ces étapes sont limitantes : il est impossible de définir un protocole d'extraction, un milieu de culture et des conditions d'incubation propices à la récupération et au développement de l'ensemble des cellules bactériennes. Cette méthode sous estime donc les populations bactériennes : il a été démontré qu'en utilisant cette méthode sur les sols seules 10% des espèces bactériennes pouvaient être étudiées (Torsvik *et al.*, 1990). De plus, le nombre de cellules extraites et/ou identifiées n'est pas obligatoirement relié à leur activité : ce dénombrement global renseigne sur la capacité d'un sol à entretenir une activité microbienne mais apporte souvent peu d'informations car les espèces qui disparaissent sous l'action des polluants sont assez vite remplacées par des espèces résistantes opportunistes ce qui a pour conséquence de ne pas faire obligatoirement varier le nombre total de microorganismes. Il est plus judicieux, dans la mesure du possible, de dénombrer et de suivre, espèce par espèce, la dynamique les populations présentes ou des espèces indicatrices. Les *espèces indicatrices* proposées sont les bactéries responsables du cycle biogéochimique de l'azote comme *Azotobacter* et le groupe des Rhizobiaceae (Vallaey *et al.*, 1997). Ces *suivis spécifiques* peuvent être réalisés après extraction, par inclusion dans des géloses sélectives¹ (sans carbone, sans azote..), par observation en microscopie optique/électronique (après coloration) ou à l'aide d'outils moléculaires comme des sondes ADN marquées (Vallaey *et al.*, 1997, Nannipieri *et al.*, 1997). Cependant, ces dernières techniques requièrent un savoir-faire et un équipement qui limitent leur utilisation en routine.
- les interactions entre la microflore et organismes supérieurs sont estimées par le suivi de l'installation de symbioses rhizosphériques dues aux bactéries fixatrices d'azote (Wetzel et Werner, 1995) ou aux champignons mycorrhizogènes (Leyval *et al.*, 1994, 1995).

¹ Les paramètres limitants sont alors identiques à ceux rencontrés lors du dénombrement total...

- les activités globales des sols sont estimées à travers la mesure de la respiration, la nitrification....

La *respiration* reste le paramètre le plus utilisé et son estimation par dosage du CO₂ dégagé ou de l'oxygène consommé a été normalisée (ISO 14240-1,-2, 1997). Cependant, cette activité est très difficile à interpréter car :

- ◇ la respiration n'est pas spécifique à une population (elle est réalisée par l'ensemble de la microflore),
- ◇ les polluants présents ont sélectionné une microflore résistante qui peut avoir des intensités respiratoires identiques à celles de sols peu ou non contaminés,
- ◇ les polluants organiques étant dégradables, la respiration peut alors être amplifiée,
- ◇ les cellules mortes suite à l'intoxication constituent une source de carbone facilement assimilable aux cellules adaptées, provoquant une respiration accrue.

Cependant la respiration peut être un indicateur pertinent quand la toxicité est due à des éléments traces métalliques (Vanhala et Ahtiainen, 1994) ou pour évaluer le devenir de polluants organiques marqués dans les sols par le suivi du ¹⁴CO₂ dégagé et des produits dérivés (pesticides...) (Schiavon, 1988a, 1988b).

La *fixation d'azote atmosphérique* par les bactéries libres ou les symbioses rhizosphériques est un paramètre plus sensible et plus spécifique que la respiration car réalisée par un nombre restreint d'organismes. Cette activité est un indicateur précieux de la santé de la microflore et est actuellement en voie de normalisation.

D'autres activités globales comme la *dénitrification*, l'*ammonification* et la *nitrification* sont aussi utilisées pour évaluer la bonne santé d'un sol. Ces indicateurs sont cependant moins employés bien qu'ayant une importance fondamentale dans le fonctionnement des sols.

Enfin, une nouvelle méthode se développe pour appréhender l'activité d'un consortium de microorganismes (Rutgers *et al.*, 1997). Cette méthode "*Biolog fingerprints*" utilise des microplaques 96 puits (Biolog) contenant chacun un substrat carboné permettant de caractériser l'activité métabolique d'un ensemble d'individus. Elle fournit l'*empreinte métabolique* d'un échantillon de sol qui peut ensuite être suivie lors d'ajout de polluants au système ou comparée à d'autres échantillons.

D'autres mesures sont également employées comme la *charge ATP* (quantité d'ATP obtenue après extraction du sol) rendant compte de la biomasse active totale (Vanhala et Ahtiainen, 1994), les *modifications moléculaires* (modification de l'ADN extractible, de la composition membranaire des cellules et des populations exposées aux pollutions....) (Nannipieri *et al.*, 1997 et Vallaeys *et al.*, 1997).

- les individus peuvent être mesurés par la quantification d'activités enzymatiques spécifiques, de la charge énergétique, des variations biochimiques ou génétiques.

La mesure d'*activités enzymatiques* consiste à incorporer au sol un composé test (colorant...) et à suivre sa dégradation. La vitesse de dégradation et la quantité de substance dégradée dépendent de "l'état de santé" du sol par comparaison à un témoin. Des revues bibliographiques de l'ensemble de ces activités ont été réalisées par Rossel *et*

al. (1997), Torstensson (1997) et Alef et Nannipieri (1995). Parmi les plus utilisées, nous citerons les activités uréase (sensible aux métaux, Jung *et al.* 1995, communication personnelle de G. Bitton), deshydrogénase (peu spécifique car réalisée par un grand nombre d'enzymes) et les estérases (Haigh et Rennie, 1994, Leszczynska et Oleszkiewicz, 1996, Nannipieri *et al.*, 1997).

➤ *Tests biologiques utilisant les bactéries ajoutées*

Ces tests reposent sur l'ajout de bactéries à un échantillon de sol. L'activité de ces bactéries est ensuite évaluée après une durée d'exposition donnée. Actuellement, trois tests sont commercialisés : il s'agit des tests Microtox[®] en phase solide, MetPLATE[®] et Toxi-chromotest[®]. D'autres tests se développent actuellement à l'aide de bactéries du sol (*Pseudomonas fluorescens*.), génétiquement modifiées auxquelles le gène *lux* (responsable de la luminescence) a été introduit (Palmer *et al.*, 1998).

- Le test Microtox[®] en phase solide (ou test de contact) est une variante du test en phase liquide (voir chapitre 2.7.5.) dans lequel la bactérie marine bioluminescente (*Vibrio fischeri*) est exposée pendant 20 minutes à une suspension de sol qui est ensuite filtrée, la luminescence des bactéries récupérées dans le surnageant est alors lue avec le photomètre prévu pour le test en phase liquide (Brouwer *et al.*, 1990, Tay *et al.*, 1992, Microbics, 1995a, Svenson *et al.*, 1996).

- Le test MetPLATE[®] est basé sur l'inhibition de la β -galactosidase spécifiquement par les métaux (Bitton *et al.*, 1992b, 1992c, 1994, 1996). Il mesure l'activité de l'enzyme d'une souche modifiée d'*E. coli* mise en présence d'un échantillon de terre humidifié (rapport massique 1:1). Après incubation avec un substrat coloré, une filtration permet de mesurer par densité optique le changement de couleur de la solution de sol et, de quantifier l'inhibition. Ne réagissant qu'aux métaux, il constitue un test sélectif.

- Le test de génotoxicité Toxi Chromotest[®] a également été adapté aux échantillons solides (Kwan et Dutka, 1992, Kwan, 1993). Il repose sur une lecture photométrique après dégradation d'un colorant par une souche d'*E. coli*.

Des essais ont également été conduits avec *Bacillus cereus*, suivis d'une mesure de l'activité deshydrogénase de l'échantillon (Gunkel *et al.*, 1993).

➤ *Conclusion et perspectives pour les essais bactériens*

Les tests microbiologiques et enzymatiques sont pour la plupart miniaturisables, automatisables et pratiques pour des essais de routine. Ils présentent beaucoup de souplesse comparativement aux autres tests et, dans une optique de caractérisation écotoxicologique rapide, peuvent constituer un indicateur pertinent de la réponse des organismes de niveaux supérieurs (plantes par exemple) (Hosy, 1994).

Toutefois, il est nécessaire d'harmoniser les conditions de mesure des activités (pH, substrat, température...) afin de comparer les résultats provenant de différents tests. Enfin, les activités enzymatiques peuvent être délicates à interpréter car de nombreux enzymes peuvent être responsables des dégradations observées sur les substances tests (tests peu spécifiques) et les enzymes libres du sol peuvent rester actifs alors que l'organisme est déjà mort. Il convient donc d'utiliser différents indicateurs : l'évaluation de la toxicité d'un sol pourrait par exemple comporter un essai microbiologique (dénombrement, respiration...) et un ou plusieurs essais enzymatiques (Vanhala et Ahtiainen, 1994). Les résultats pouvant ensuite être groupés au sein d'indices d'activité (Beck, 1984 dans Nannipieri *et al.*, 1997). Les nouvelles techniques

moléculaires (reconnaissance de l'ADN, génie génétique..) semblent prometteuses mais nécessitent d'être simplifiées pour être employées en routine, sur un grand nombre d'échantillons.

b) Les tests sur protozoaires

Ces organismes sont peu employés dans l'étude des sols contaminés alors que leur rôle est primordial dans la régulation des populations microbiennes ou fongiques, la minéralisation de la matière organique et la chaîne alimentaire tellurique. Cette faible utilisation s'explique par la technicité et le savoir faire nécessaires à leur dénombrement et identification (fixation, coloration, imprégnation...). Des tests commercialisés sont disponibles pour les eaux (Prototox kit[®], Persoone, 1991) mais aucun test n'existe pour les sols.

Toutefois, des travaux sont menés sur les protozoaires du sol (*Tetrahymena pyriformis*, *Colpoda steinii*...). Ils concernent l'étude de la dynamique des populations et des communautés sur le terrain, et la morphologie et la physiologie de souches définies. Ainsi, les espèces de protozoaires, leur abondance et leur proportions relatives dans les sols sont indicatrices de l'impact de substances à caractère polluant (pesticides, engrais, hydrocarbures...) (Foissner, 1987, Petz et Foissner, 1989, Aecht et Foissner, 1993, Forge *et al.*, 1993). D'autres études s'intéressent à l'impact des substances pures sur les individus (temps de génération, modifications structurales...) (Grolière et Dupy-Blanc, 1985) ou à l'accumulation de polluants comme le parathion et le DDT (Gregory *et al.*, 1969, cité par Foissner, 1987).

c) Tests sur les invertébrés du sol ou microfaune du sol

Sont regroupés sous cette appellation, de nombreux organismes appartenant à des groupes taxonomiques différents. Leur rôle est divers dans le fonctionnement de l'écosystème sol : ils jouent un rôle dans (i) la genèse et le maintien de la structure du sol (stabilisation des agrégats de sol, aération du sol, création d'une macroporosité, brassage des horizons de sol..), (ii) la dégradation de la litière du sol (morcellement des débris organiques rendant possible les attaques fongiques et bactériennes), (iii) la chaîne alimentaire terrestre et aérienne (proies pour vertébrés supérieurs..) (ADEME, 1996, Doran et Linn, 1994).

Les invertébrés les plus couramment utilisés pour les tests d'écotoxicité sont :

- les Arthropodes comme les isopodes (*Porcellio scaber*, *Oniscus asellus*...) (Van Brummelen, 1994a, Crouau, 1996), les collemboles (*Folsomia candida*, *Orchesella cincta*...) (Van Brummelen, 1994b, Crouau, 1996), les acariens (Jagers, 1994, Van Straalen et Van Gestel, 1993), ou les araignées (Heimbach, 1994),
- les Annélides comme les lombricidés : (*Eisenia fetida*, *E. andrei*) (OCDE 207, 1984, AFNOR X31-250, 1984, AFNOR X31-251, 1994, Bouché, 1994) ou les enchytréidés (*Enchytraeus crypticus*, *E. minutus*, *E. albinus*) (Notenboom, 1997, Römbke *et al.*, 1994),
- les Mollusques (*Helix aspersa*, *Arion ater*) (Gomot et Gomot, 1996, 1997),
- les Coléoptères (Martinet, 1997)

Les paramètres classiquement mesurés sont la survie, la croissance et la reproduction. Des analyses biochimiques, apportant des informations plus précoces sur l'état de santé des organismes exposés sont également utilisées, comme la présence d'adduits à l'ADN (Walsh *et al.*, 1995), la clastogénèse (Verschaeve et Gilles, 1995), la bioaccumulation de polluants organiques (Tarradellas *et al.*, 1982) ou métalliques (Abdul Rida et Bouché, 1994).

La durée d'exposition de l'organisme au polluant est variable et dépend du paramètre choisi. Les tests aigus sont généralement effectués sur une période de 7 à 14 jours (OCDE 207, 1984), alors que les tests chroniques basés sur le suivi de la croissance et de la reproduction peuvent nécessiter plus de 4 semaines (Römbke *et al.*, 1989 dans Van Straalen et Van Gestel, 1993).

La plupart des méthodes utilisées pour exposer les invertébrés aux polluants ont été développées pour des substances pures et sont communes aux différents organismes. Les voies d'exposition les plus fréquemment utilisées sont :

- ⇒ la nourriture, obtenue à partir de cultures sur substrat pollué ou directement additionnée de polluant (Van Brummelen *et al.*, 1994a, 1994b, Gomot et Gomot, 1996, 1997),
- ⇒ le papier filtre imprégné de la substance à tester (Poinsot-Balaguer *et al.*, 1993; OCDE 207, 1984),
- ⇒ le sol reconstitué ISO (OCDE 207, 1984; AFNOR X31-251, 1994) ou un substrat artificiel (test Artisol, AFNOR X 31-250, 1984), complétés avec le polluant ou la matrice solide.

L'emploi de substrat artificiel bien que critiquable car peu représentatif des conditions naturelles, est utile pour déterminer la toxicité d'une substance donnée. En effet, contrairement au sol reconstitué qui contient de l'argile et de la tourbe, cette voie d'exposition permet de maximiser les éventuels effets puisque le substrat artificiel n'interagit pas avec le polluant. Enfin, ce type de test est plus reproductible et peut permettre une comparabilité des résultats et une hiérarchisation fiable des substances en fonction de leur toxicité (Bouché, 1994).

d) Tests sur les algues du sol

Les algues du sol, souvent négligées au profit de l'étude des bactéries et des champignons, n'en ont pas moins un rôle important dans la fertilité des sols : elles constituent une source importante de carbone, produisent des polysaccharides jouant un rôle dans l'agrégation du sol (Brady et Weil, 1996) et colonisent les milieux pauvres. Plusieurs centaines d'algues ont été recensées dans les sols et la biomasse générée peut atteindre 500 kg/ha (Wood, 1995). Hammel *et al.* (1997) utilisent le dosage de la chlorophylle d'échantillons de sols stériles, contaminés par des éléments traces métalliques (Sb, Hg, As et Cu), après incubation de l'algue unicellulaire *Chlorococcum infusionum*. Debus et Hund (1997) utilisent également le dosage de la chlorophylle des algues indigènes après mise en culture des échantillons contaminés.

e) Tests sur végétaux supérieurs

Les plantes constituent le premier maillon de la chaîne alimentaire tellurique. Elles produisent l'oxygène et la nourriture nécessaire à la vie. De plus, elles constituent des habitats particuliers nécessaires à la reproduction et à l'abri de nombreuses espèces (insectes invertébrés, oiseaux, vertébrés...). Les plantes sont nécessaires au bon déroulement des cycles biogéochimiques : évaluer l'impact des polluants sur les plantes est donc primordial.

Ces organismes sont très largement utilisés en agronomie pour déterminer la valeur fertilisante des engrais et la fertilité des sols. Dans le cadre de la mesure de l'activité inhibitrice de substances à caractère polluant, les principaux paramètres étudiés sont la germination (AFNOR X 31-201, 1982) et la croissance de l'appareil aérien (AFNOR X31-202, 1995) ou racinaire (AFNOR X31-203, 1994). Les essais consistent à exposer différentes espèces végétales (laitue, lentille, orge, maïs, carotte, concombre, blé...) aux polluants (substances pures ou échantillons solides contaminés) introduits dans un milieu de culture (sol ISO

reconstitué, sable...) en conditions contrôlées et à observer, dans un premier temps, l'émergence et la croissance par rapport à un témoin.

Ces tests classiques d'émergence et de croissance, réalisés en général sur 14 jours, sont peu représentatifs de la toxicité potentielle des polluants ou des matrices solides testées : durant cette première étape de développement, la plantule utilise principalement les réserves internes de la graine et échange peu de matière avec le milieu extérieur (Wang et Freemark, 1995, Van Leeuwen, 1995). Des expositions plus longues seraient préférables rendant alors compte des modifications :

- *métaboliques* (activités enzymatiques, composition des chlorophylles [Mench *et al.*, 1996]),
- *génétiques* (clastogénèse [Ma, 1979; Gill et Sandhu, 1991], détection d'adduits sur ADN [Arnold *et al.*, 1996]),
- *de composition* (accumulation d'éléments traces métalliques [Morel, 1997a, 1997b]),
- *morphologiques* (déformation des racines et des tiges, [Sims et Overcash, 1983])

Des études sur *Arabidopsis thaliana* pourraient également permettre d'étudier les effets des polluants à plus long terme sur le maintien des caractères des plantes (Sheppard *et al.*, 1993, Wang et Freemark, 1995). L'installation des symbioses rhizosphériques, bactéries symbiotiques fixatrices d'azote (Wetzel et Werner, 1995) et champignons mycorhizogènes (Leyval *et al.*, 1994; 1995) peut également être étudiée.

f) Tests sur mammifères

Ces tests utilisent l'exposition de rats ou de surmulots élevés en laboratoire, la terre contaminée étant introduite dans leur alimentation ou leur litière. Les paramètres de suivi sont alors la mortalité, la croissance et des activités enzymatiques mono-oxygénases pulmonaires ou hépatiques (Rivière, 1993, Fouchecourt et Rivière, 1995, 1996).

g) Conclusion

L'exposition directe d'organismes telluriques à des matrices solides contaminées (sols et déchets) est représentative des conditions rencontrés sur le terrain : elle permet aux organismes testés de s'intoxiquer (i) par contact "dermique", (ii) par ingestion de particules solides contaminées et (iii) de solution contaminée, et (iv) par inhalation de l'atmosphère contaminée. Cette approche directe permet l'intégration des différentes voies d'exposition des organismes telluriques. Cependant, exception faite des tests biologiques sur bactéries, cette démarche de caractérisation des matrices solides est coûteuse et lourde car elle nécessite des surfaces importantes (vases de végétation sous serre, par exemple) et la durée des tests varie de 7 à 28 jours. De plus, le nombre de tests normalisés (tableau 2) étant limité, il ne permet pas de couvrir l'ensemble des effets à considérer : il manque notamment des tests chroniques et génotoxiques.

	Test aigus			Test chroniques		
	Bactéries du sol	Végétaux supérieurs	Ver de terre	Collemboles	Ver de terre	Végétaux supérieurs
OCDE		208	207 (1984)			208
CEE			87/302			
ISO	14240-1 (1995) 14238 (1995)	11269-3 (1982)	11268 -1 (1994)	Draft ISO/TC190/ (1994)	Draft 11268 -2 (1994)	11269-1 (1993) 11269-2 (1995)
AFNOR		NF X 31-201 (1982)	NF X 31-250 (1984) NF X 31-251 (1994)			NF X 31-201 (1982) NF X 31-202 (1986)

Tableau 2 . Liste des tests biologiques normalisés pour l'étude de la qualité des sols

2.6.2 L'approche indirecte : mise en évidence au laboratoire de la mobilité des polluants

L'alternative proposée (approche indirecte) est réalisée après lixiviation des matrices solides et exposition d'organismes aquatiques à ces lixiviats. L'approche indirecte, depuis longtemps employée en agronomie pour caractériser la fertilité des sols (extraction des éléments nutritifs du sol : N, P, K, Ca.....), consiste à placer l'échantillon solide en contact avec un solvant (eau, solvant organique...) qui est ensuite séparé et utilisé pour conduire différents tests biologiques mis au point pour les milieux liquides.

La toxicité des polluants est influencée par la mobilité des substances et par leur absorption ultérieure par les organismes vivants, ces deux processus définissant la biodisponibilité. La mise en évidence de la mobilité des polluants au sein des matrices solides peut être établie au laboratoire. Face au grand nombre de méthodes disponibles, une revue bibliographique s'est avérée nécessaire dans le but de déterminer les méthodes les mieux adaptées pour la mesure de la mobilité.

Cependant, avant de détailler précisément les dispositifs permettant de mettre en évidence la mobilité des polluants au laboratoire, il convient de définir précisément les termes à employer. En effet, les termes utilisés pour qualifier ces techniques sont nombreux (lixiviation, extraction, percolation, élution, élutriation, lessivage...) et peuvent être employés à contre sens.

a) Terminologie

Duchaufour (1983) définit la lixiviation dans les sols comme l'entraînement de sels solubles alors que le terme lessivage est réservé à l'entraînement des particules fines (migration de particules en suspension). Dans les définitions de l'USEPA (1993), le terme "leaching"¹ (lixiviation) est défini comme le processus par lequel des constituants solubles sont dissous et entraînés à travers le sol, sous l'action d'un fluide percolant alors que la percolation² est décrite comme le mouvement descendant et radial de l'eau à travers les horizons de sol, vers l'eau

¹ Leaching : the process by which soluble constituents are dissolved and filtered through the soil by a percolating fluid.

² Percolation : the movement of water downward and radially through subsurface soil layers, continuing downward to groundwater. Can also involve upward movement of water.

souterraine (ce terme peut également inclure des mouvements ascendants de l'eau). Tas et Van Leeuwenn (1995) définissent le terme "leachate" (lixiviat) comme une eau qui a percolé dans une colonne de sol ou de déchet dans l'environnement¹. C'est en ce sens qu'il est employé pour qualifier par exemple les jus de décharge. Rivière (1997b) définit les termes lessivage, lixiviation et percolation. Le lessivage est un entraînement par convection de particules en suspension alors que la lixiviation est un transport par convection de substances dissoutes dans le sol, la percolation étant le transport vertical d'un liquide dans un milieu poreux. Ces définitions sont reprises par la norme ISO 11074-1 (1997) où la lixiviation est définie par le mouvement de substances dissoutes causé par la percolation de l'eau ou d'autres liquides dans un sol et le lessivage comme le transport de particules d'argiles dans un profil de sol.

Les différentes définitions correspondent toutes à la description des phénomènes de terrain et concordent pour définir la lixiviation comme l'entraînement de substance dissoutes par l'eau ou tout autre solvant par percolation à travers une épaisseur de sol ou de déchet. Le lessivage correspond également à un entraînement mais de particules en suspension.

Ces différents termes sont également utilisés pour définir et qualifier des tests de laboratoire supposés reproduire les phénomènes de terrain. La terminologie précédemment décrite se confronte au vocabulaire plus spécifique des techniques utilisées en chimie. Ainsi, la lixiviation (du latin *lessive*) décrit une technique de lessivage de produits solides par un solvant approprié de façon à en extraire les parties solubles (Encyclopedia Universalis) ou encore, une opération qui consiste à faire passer lentement un solvant à travers un produit pulvérisé et déposé en couche épaisse pour en extraire un ou plusieurs constituants solubles (Larousse). Le terme lixiviation est donc à associer à une technique d'extraction. La norme AFNOR X31-210 (1992) reprend cette terminologie en définissant un essai de lixiviation comme l'extraction liquide/solide d'un déchet par une solution aqueuse, le lixiviat étant alors la solution contenant les éléments solubilisés sur laquelle sont effectuées les caractérisations analytiques (par exemple : analyses physico-chimiques, essais écotoxicologiques). La norme AFNOR X31-211 (1994) utilise la même définition mais remplace le mot lixiviation par lessivage et lixiviat par lessivat². Ces deux normes emploient donc des termes (lixiviation et lessivage) ayant des significations différentes au terrain (respectivement et normalement liés aux molécules solubilisés et aux particules en suspension). De plus, contrairement aux définitions précédentes, ces normes imposent la nature aqueuse du solvant. Une confusion supplémentaire est ajoutée par le projet de norme EN 12457 (1997) qui définit un essai de lixiviation comme un essai pendant lequel un éluat est obtenu à partir d'un matériau mis en contact avec un lixiviant. L'éluat étant alors la solution résultant de cette lixiviation.

Le terme éluat est utilisé pour les techniques analytiques de chromatographie dans lesquelles les polluants sont élués à travers une colonne avant une détection préalable. Il rappelle aussi le terme anglais "elutriate" qui est défini par Tas et Van Leeuwen (1995) et Environnement CANADA (1996) comme la solution aqueuse obtenue après ajout d'eau à une matrice solide et agitation du mélange puis, centrifugation, filtration ou décantation³. Ce terme "elutriation" est

¹ Leachate : Water or wastewater that has percolated through a column of soil or solid waste in the environment.

² AFNOR X31-211 (1994). Définition des termes :

-Essai de lessivage : extraction liquide/solide d'un déchet massif par une solution aqueuse.

-Lessivat : solution obtenue à l'issue de l'essai de lessivage sur laquelle seront effectuées les caractérisations analytiques (par exemple : analyses physico-chimiques, essais écotoxicologiques).

³ Elutriate : an aqueous solution obtained after adding water to a solid substance, shaking the mixture, then centrifuging or filtering it or decanting the supernatant.

mieux traduit par lixiviation, lessivage ou élutriation par le dictionnaire technique de l'eau et de l'assainissement (Meink et Möhle, 1983).

Ainsi par la suite, une lixiviation sera définie comme un essai pendant lequel un matériau solide est mis en contact avec un solvant approprié afin d'en extraire des molécules solubles. Le solvant récupéré (ou lixiviat) par centrifugation, filtration ou décantation sert ensuite aux caractérisations ultérieures (analyses physico-chimiques, essais écotoxicologiques...). La lixiviation correspond donc au laboratoire à une technique d'extraction. Le lessivage est défini de la même manière mais concerne les particules en suspension et non plus les molécules solubilisées. En complément à ces deux définitions, les essais en colonnes seront définis, par analogie avec les techniques chromatographiques, comme l'élution par percolation d'un solvant à travers une matrice placée dans une colonne. Le liquide récupéré étant l'éluat ou percolat. Dans le cadre de ces définitions, la nature des solvants de lixiviation ou d'élution n'est pas fixée (eau, solvant organique...).

Les essais d'extraction par lixiviation et d'élution par percolation sont en général classés en fonction du type de renouvellement du solvant : sont distingués les tests statiques sans renouvellement de solvant ou avec un série de renouvellements, et les tests dynamiques avec renouvellement continu ou intermittent.

b) Extraction des polluants par lixiviation

Les essais de lixiviation sont des tests statiques et peuvent être divisés en 2 catégories suivant que la solution de lixiviation est unique ou renouvelée. Plusieurs protocoles ont été standardisés dans un cadre réglementaire pour la caractérisation chimique des déchets (tableau 3, adapté de CEN, 1994)). La matrice à évaluer est placée dans un système fermé en contact avec un solvant et agitée le plus souvent faiblement par des mouvements horizontaux ou par rotation du flacon sur lui-même (figure 6).

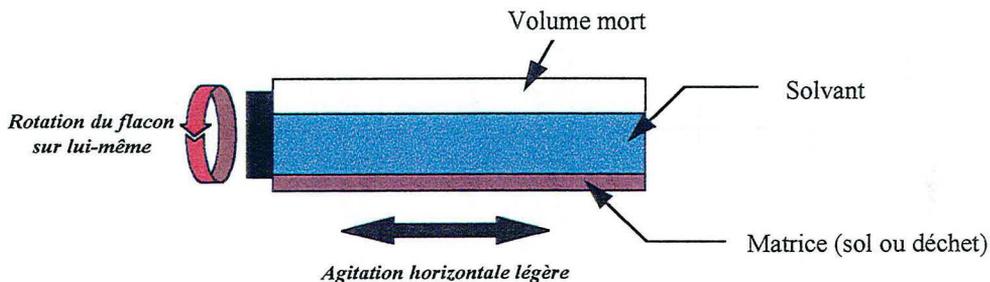


Figure 6. Schéma d'une lixiviation

Nom du test	TCLP Method 1311	DIN 38414S4	AFNOR X 31-210	AFNOR X 31-211	TVA-Eluattest	Waste research unit Leaching test	NEN 7341 Availability test	NEN 7349 Serial Batch test	ENA Skakttest	NF EN 12457
Pays	USA	Allemagne	France	France	Suisse	UK (Harwell)	Pays-bas	Pays-bas	Suède	CFF
Granulométrie	< 9,5 mm	< 10 mm	< 4 mm	Monolithique	Granulaire ou Monolithique	< 10 mm	< 125 µm (95 %)	< 4 mm (95 %)	< 20 mm	< 4 mm (90 %)
Extractant	Acide acétique (pH=2,88), ou Acide acétique + NaOH (pH=4,93)	Eau distillée	Eau distillée	Eau distillée	Eau distillée saturée en CO ₂	Eau distillée ou tampon acide acétique (pH=5)	Eau distillée à pH=7 et à pH=4, (avec HNO ₃)	Eau distillée initialement acidifiée à pH=4 (avec HNO ₃)	Eau distillée initialement acidifiée à pH=4 (avec HNO ₃)	Eau distillée
Masse lixiviée	100 g	100 g	100 ± 5 g	100 g	100-200 g	Appr. 100 g	16 g	40 g	125 g	100 ± 5 g
Rapport Liquide/solide par étape	20	10	10	10	10	Variable	50	20	4	3 procédures : A : 2 B : 10 C : 2 puis 2-10
Nombre d'étape d'extraction	20	1 à 3	1 à 3	1 à 3	2	5 à 6	2	5	4	1 (A et B) 2 (C)
Durée de contact	18 heures	24 heures	24 h (étape 1) 16 h (étapes 2 et 3)	24 h (étape 1) 16 h (étapes 2 et 3)	24 heures	2 à 9 jours (voire plus)	3 heures	23 heures	24 heures	A : 24 ± 0,5 h B : 24 ± 0,5 h C : 6 ± 0,5 h puis 18 ± 0,5 h
Pour les batch en série	-	Nouvel extractant	Nouvel extractant	Nouvel extractant	Nouvel extractant	Nouvel extractant	Nouvel extractant pH fixé à 7 (étape 1) puis à 4 (étape 2)	Nouvel extractant	Nouvel extractant	Nouvel extractant
Agitation	En rotation 30 tour/min	Rotation lente ou Agitation	Agitation linéaire, 60 cycles/min	Agitateur magnétique ou hélice à 120 tour/min	Bullage au CO ₂	Agitation	Agitation magnétique	Rotation	Table d'agitation	Agitation (5à 10 U/min.): - sur rouleaux - par retournement
Filtration	0,6-0,8 µm filtre verre	0,45 µm	0,45 µm	0,45 µm	0,45 µm	Filtration sous vide	0,5 µm	0,45 µm	0,45 µm ap. centrif.	0,45 µm

Tableau 3. Protocoles normalisés de lixiviation des déchets (adapté de CEN, 1994)

➤ *Lixiviation en une seule bâchée*

La lixiviation est réalisée en une seule bâchée. Lorsque la teneur en eau est importante (cas notamment des sédiments, de certaines boues ou de mélanges sols/boues), l'eau interstitielle peut être récupérée par centrifugation, le culot pouvant alors être utilisé pour des lixiviations complémentaires.

➤ *Lixiviations en bâchées successives*

Les lixiviations en bâchées successives sont des systèmes semi-ouverts, où une série de lixiviations sont produites, sur le même échantillon (tableau 3). Cette approche, par succession d'états d'équilibre vise à épuiser le contenu total des polluants mobilisables. Plusieurs protocoles préconisent des lixiviations successives avec cumul des lixivats, le rapport solide/liquide cumulatif pouvant atteindre 1/100.

Ces essais de lixiviation présentent l'intérêt d'être simples d'application mais sont beaucoup moins réalistes par rapport aux essais de percolation.

c) *Elution des polluants par percolation*

La technique d'élution par percolation utilise un système ouvert, où la matrice solide est placée dans une colonne verticale, parcourue par de l'eau. Deux types d'alimentation en eau des colonnes sont employées (figure 7) :

- colonnes alimentées par le haut (migration gravitaire, souvent non saturée)
- colonnes alimentées par le bas (migration sous pression, saturée).

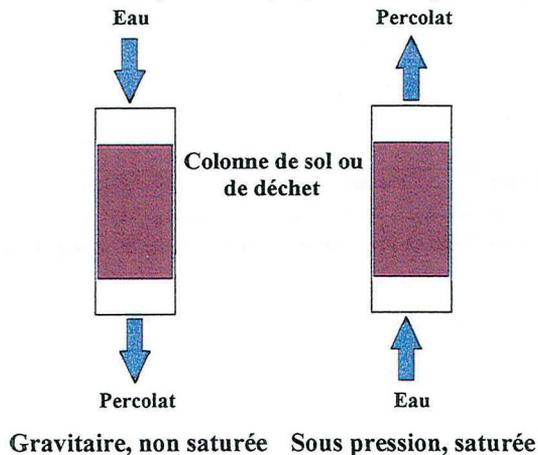


Figure 7. Schéma d'essais de percolation

Cette méthode a été normalisée pour étudier le comportement à la percolation d'un horizon de sol ou de déchet traversé par l'eau de pluie et estime le relargage des polluants en fonction du temps. Le tableau 4 récapitule différentes méthodes de percolation normalisées ou pré-normalisées.

Type de test	NEN 7343 Column Test	Ordonnance suisse sur les sites pollués par des déchets	Combined leaching test Combined column and batch test	POLDEN INSAVALOR	Draft CEN/TC292/WG6 (Février 98)
Pays	Pays-bas	Suisse	Danemark (VKI)	France	CEN
Granulométrie	< 4 mm (95 %)	Granulométrie < 10% du diamètre de la colonne	< 10 mm	< 10 mm	Granulométrie < 10% du diamètre de la colonne 4 à 10 mm
Extractant	Eau distillée initialement acidifiée à pH=4 avec HNO ₃	Eau désionisée et désoxygénée	Eau distillée initialement acidifiée à pH=4 Avec HNO ₃	Eau permutée	Eau déminéralisée
Masse percolée	500-800 g	1 à 10 kg	10 kg/10-100 g	5 Kg	En fonction de la granulométrie maximum : Pour 4 mm -> 200 g Pour 10 mm-> 3.1 kg
Rapport Liquide/solide (l/kg) par étape	Variable durant le test	Variable durant le test	Variable durant le test	Variable durant le test	Variable durant le test
Volume total (l)	10	10 fois la masse de sol utilisée	2 lors de l'essai colonne 25-200 en batch	non renseigné	débit de 0.1 L/S par jour
Nombre d'étape d'extraction	(7 fractions collectées)	non renseigné	4 en essai colonne 2-5 en batch	un minimum de 5 percolats collectés	3 à 7 fractions collectées
Durée de contact	Variable (appr. 21 jours avec L/S=0 à 10)	1 à 5 jours (après 48 h le rapport L/S : 10)	Colonne : 70 jours avec L/S = 0-2 Batch : 23 heures	10 jours avec L/S = 0-5	non renseignée
Renouvellement de l'extrait ou du solide	Extractant ajouté en continu	Extractant ajouté en continu	Nouvel extractant (en batch)	Extractant ajouté en continu	Extractant ajouté en continu
Agitation	Aucune	Aucune	Rotation en batch	aucune	aucune
Filtration/filtre	0,45 µm	filtre à sable d'au moins 3 cm de granulométrie moyenne à grossière	0,45 µm	0,45 ou 1.2 µm ou filtration sur couche de sable	0,45 µm
Sens du flux	Ascendant	Ascendant	non renseigné	Ascendant	Ascendant
Colonne saturée en eau	Oui	Oui	non renseigné	Oui	Oui
Mise sous pression de la solution	non renseigné	non renseigné	non renseigné	Jusqu'à 3 bars	non renseigné

Tableau 4. Les méthodes de percolation normalisées ou pré-normalisées (adapté de CEN, 1994)

La percolation présente un degré de réalisme plus élevé pour l'évaluation de la mobilité (par rapport aux autres techniques de lixiviation) mais nécessite en général des montages plus complexes, mis en œuvre sur de longues périodes. En plus de ces problèmes matériels, des limites techniques subsistent comme :

- le tassement de la matrice dans la colonne qui définit la porosité et influence l'écoulement du fluide circulant,
- la pression du fluide dans la colonne,
- l'existence de chemins préférentiels le long des parois, ou dans l'échantillon, surtout si le mouvement de l'eau est gravitaire.

Il est en général recommandé de travailler (i) avec des colonnes dont le diamètre présente un rapport 1/10 avec le diamètre des plus grosses particules introduites, (ii) en écoulement saturé, avec un flux ascendant pour limiter les chemins préférentiels (à l'aide d'une pompe pour réguler la pression du fluide) et (iii) avec une méthode standardisée de remplissage des colonnes (Perrodin et Abdelghafour, 1996). Ces précautions permettent d'augmenter la reproductibilité des essais.

Myers *et al.* (1991) présentent en détail ces approches et discutent des considérations théoriques et techniques ainsi que des limites inhérentes aux modèles réduits utilisés en laboratoire. Il en ressort, entre autres, que la mobilité des contaminants est moins importante dans une colonne de sol perturbé par rapport à un profil naturel. La plus grande accessibilité des sites de rétention du sol perturbé serait à l'origine de ce phénomène. La représentativité de l'écoulement dans ces modèles apparaît limitée.

d) *Autres techniques d'extractions des polluants*

En complément à ces techniques mettant en jeu les échanges de polluants entre la matrice et un solvant dans des conditions de température et de pression " ordinaires " (température ambiante et pression atmosphérique) des protocoles plus agressifs (extraction à chaud, sous pression...) peuvent également être utilisés. Ces techniques (extraction par Soxhlet, par sonication, par fluide supercritique..) développées principalement dans le cadre de l'analyse chimique, cherchent à maximiser le transfert des polluants pour quantifier leur teneur totale.

e) *Conclusion*

Les essais de percolation en colonne simulent les phénomènes d'écoulement dynamiques. Ils présentent un degré de réalisme élevé par rapport aux essais de lixiviation statiques. Ils sont généralement réalisés pour le suivi chimique des polluants (Hornsby et Davidson, 1973, O'Connor *et al.*, 1976, Hutzer *et al.*, 1986, Somasundaram *et al.*, 1991, Hayden *et al.*, 1992, Perrin-Ganier *et al.*, 1996), bien que la plupart soit transposables au suivi de la toxicité (Symons et Sims, 1988, Belkin *et al.*, 1994). Cependant, ces essais sont encore au stade du développement et posent plusieurs problèmes de nature technique. Les lixiviations en bâchées uniques ou successives présentent l'intérêt d'être faciles et rapides à réaliser. De plus, leur répétabilité assure la comparaison des matériaux testés entre eux. Cependant, les nombreuses conditions utilisées pour la lixiviation font que le choix d'une technique particulière est délicat.

2.7 Extractions par lixiviation : les différents choix techniques

La comparaison des différentes méthodes recensées dans la littérature fait apparaître de nombreuses variations. Les différences relevées portent sur les points suivants :

- le type et l'état physique de la matrice utilisée,
- la nature du solvant utilisé,
- le volume d'extractant par rapport au volume d'échantillon à lixivier,
- la durée et le mode de contact,
- la récupération et le prétraitement de l'extract,
- le type de test utilisé pour évaluer la toxicité du lixiviat.

2.7.1 Le type et la granulométrie de l'échantillon

- Les méthodes recensées sont applicables à divers échantillons :
 - sédiments (Ross et Henebry, 1989, True et Hayward, 1990, Kwan et Dutka, 1992, Campbell *et al.*, 1992, Côté *et al.*, 1998),
 - sols pollués (Vanhanla et Athiainen, 1994, Dombroski *et al.*, 1966),
 - sols contaminés artificiellement au laboratoire (Matthews et Hastings, 1987, Aprill *et al.*, 1990, Dasappa et Loehr, 1991),
 - déchets solides (Calleja *et al.*, 1986, Symons et Sims, 1988, Bessi *et al.*, 1992).

- La granulométrie de l'échantillon est un paramètre important puisqu'il fait varier pour une même masse de solide la surface d'échange dont va dépendre le flux de matières à l'interface solide/liquide. Le tableau 3 précise les dimensions des particules des textes normatifs de lixiviation qui peuvent varier de 125 μm à 20 mm.

2.7.2 La nature du solvant de lixiviation

a) Lixiviations à l'eau ultrapure ou osmosée

Le solvant le plus employé est l'eau (deminéralisée, osmosée, ultra-pure ...). Il est simple, facile et peu coûteux à obtenir au laboratoire. Par ailleurs, l'eau est non seulement un milieu de vie biologique mais aussi un vecteur important de transferts de pollution qui solubilise et transporte les polluants dans l'environnement. Ces tests sont destinés à mesurer la fraction relarguée dans des conditions données de contact eau-matrice, supposées simuler un transfert vers l'eau.

b) Les lixiviations acides tamponnées

Le pH de la fraction mobilisable générée est le plus souvent imposé par l'échantillon. L'ajustement du pH de la solution extractante, avant lixiviation, à une valeur acide, sans utilisation d'un tampon amène généralement à une situation similaire. Dans ces conditions, il n'est pas évident que ce type de lixiviation apporte une information additionnelle utile. La solution consiste à employer des solutions tamponnées à un pH acide mais elle présente le risque d'une toxicité interférente très élevée lors du couplage à des tests biologiques (Calleja *et al.*, 1986).

c) Les lixiviations à l'aide de solutions salines ou complexantes

Ces extractions peuvent être effectuées avec différentes solutions salines ou complexantes (chlorure de calcium, EDTA...) pour extraire séquentiellement les métaux par échanges d'ions (Lebourg *et al.*, 1996, McLaren, 1998). Les formes chimiques utilisées pour l'extraction peuvent cependant présenter une toxicité interférente (Mazidji *et al.*, 1992).

d) Les lixiviations à l'aide de solvants organiques

L'emploi d'un solvant organique permet de solubiliser les polluants hydrophobes et, par conséquent, rend possible l'évaluation de leur toxicité. La recherche bibliographique des méthodes d'extraction par solvants organiques effectuée indique que la majorité des méthodes ont été appliquées à la préparation d'extraits de sédiments pour les tests de génotoxicité et de toxicité (Kwan *et al.*, 1990, Jonhson, 1992, Campbell *et al.*, 1992, Kwan, 1993, Dutka *et al.*, 1995, Boxall et Malty, 1995, Ho *et al.*, 1994, 1997, Coté *et al.*, 1998). Les solvants utilisés pour l'extraction des matrices solides sont de natures diverses (dichlorométhane, méthanol, DMSO, éthanol, acétonitrile...).

Le méthanol, miscible avec l'eau et relativement peu toxique, est très approprié à cet égard. De plus, il a déjà été employé pour caractériser les pesticides mobilisables à terme dans les sols (Schiavon, 1988a et b).

e) Conclusion

Le recours à un ensemble d'extractants tend à se développer (Bispo *et al.*, 1997a, Wahle et Kördel, 1997, Debus et Hund, 1997) pour estimer l'importance de la fraction polluante potentiellement toxique.

2.7.3 Choix des conditions de lixiviation (volume d'extractant, durée et mode d'agitation)

Dans leur étude, Dombroski *et al.* (1996) montrent que la technique d'agitation, le rapport solide/liquide et la durée d'extraction ont des répercussions sur les rendements d'extraction.

a) Rapport Solide/Liquide

Le rapport de masse Solide/Liquide varie de 1/1 (Kwan et Dutka, 1990) à 3/100 (Bessi *et al.*, 1992). La masse de solvant peut être rapportée à la matière fraîche (AFNOR X 31-210) ou à la matière sèche (projet de test européen CEN TC 192). Dans ce dernier cas, il convient de définir avec précision les conditions de séchage qui peuvent modifier la quantité de polluants (volatilisation, thermolyse...). Il peut également s'agir d'un rapport volumique ou surfacique quand on s'intéresse aux transferts de matière à partir d'un échantillon monolithe pour lequel le mécanisme de transfert est proportionnel à la surface d'échange entre la matrice et le solvant.

b) Durée de lixiviation

La durée de lixiviation varie de 2 minutes (Kwan et Dutka, 1990) à 48 heures (Atkinson *et al.*, 1985). Aucune optimisation de cette durée n'a été recensée.

c) Type d'agitation

L'agitation a lieu en général sur un agitateur à vitesse fixe (vitesse de 30 à 250 tours/min), avec ou sans sonication préalable. Les agitateurs employés sont variables : rotatifs, planétaire, linéaires, magnétiques... Un bullage à l'air ou au CO₂ de la suspension formée par la matrice solide et l'extractant peut également être utilisé avec risque de stripping des polluants organiques volatils.

2.7.4 Prétraitement du lixiviat avant la réalisation du test biologique

Pour la plupart des tests biologiques, il est nécessaire de séparer la matrice solide de l'extractant. Cette séparation peut être effectuée par décantation, centrifugation et/ou filtration. De même, d'autres ajustements peuvent être nécessaires pour détecter un signal toxique (modification du pH, concentration de l'extraire...).

a) Décantation, centrifugation et filtration

La décantation, d'une durée variable (jusqu'à 3 jours, ce qui peut entraîner un risque de dégradation ...) est souvent suivie d'une centrifugation. Celle-ci est effectuée entre 2500 et 10 000 tours minutes, sur des durées de 10 à 45 minutes.

Le surnageant est ensuite récupéré et sert directement aux tests ou est préalablement filtré (filtration de 0.22 à 100 µm ou sur filtres rapides) avant d'être testé.

b) Neutralisation

Le pH peut être ramené à la neutralité (à l'aide d'HCl ou de NaOH suivant le pH) ou laissé tel quel avant le test biologique de toxicité.

c) Concentration des échantillons¹

Les lixiviats ou percolats aqueux sont dans certains cas extraits à l'aide de solvants organiques non miscibles avec l'eau (de type dichlorométhane, pentane...). Cette extraction liquide/liquide est suivie d'une étape d'évaporation, le résidu sec est ensuite récupéré dans du méthanol ou du DMSO (Bessi *et al.*, 1992). Ces étapes d'extraction-évaporation-concentration permettent ainsi de concentrer les faibles quantités de polluants dissous dans l'eau et de mettre éventuellement en évidence une toxicité ou génotoxicité potentielle.

2.7.5 Les tests biologiques de toxicité (biotests) utilisés sur les lixiviats ou les extraits

Les tests biologiques de toxicité employés sont ceux couramment utilisés pour évaluer la qualité du milieu aquatique. Les biotests actuellement normalisés sont rassemblés dans le tableau 5.

	Tests aigus		Tests chroniques			Tests génétiques	
	<i>Daphnia magna</i> 24/48h	<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Daphnia magna</i> 21 jours	<i>Ceriodaphnia dubia</i> 7 jours	Algues*	Bactéries	Micronoyaux Pleurodèle
OCDE	202 (1984)		202 (1984)		201 (1984)	471 (1983) 472 (1983)	
CEE	C2 JOCE L 383 A (1992)		Draft XI/681/86 (1986)		C3 JOCE L 383 A (1992)	B14 JOCE L 383 A (1992)	
ISO	EN ISO 6341(1996)	Draft 11348			8692 (1993)		
AFNOR	NF T 90-301 (1996)	NF T 90-320 (1991)		Protocole Agence de l'eau (1992)	NF T 90-304 (1993)	NF T 03-351 (1982)	NFT 90- 325 (1992)
CEN	EN ISO 6341 (1996)				EN 28692 (1993)		
ASTM	D 4229 (1984)	D 5660 (1996)	E 1193 (1987)	E 1295 (1989)	E 1218 (1990) D 3978 (1993)		
DIN	38 412-11 38412-13	38412-34			EN 28692 (1993)	Draft UA 12 (1994)	
BSI	BS 6068 (1996)				BS 6068 (1993)		

* Différentes espèces sont proposées : *Scenedesmus subcapitatus*, *Pseudokirchneriella subcapitata*

Tableau 5. Liste des tests biologiques normalisés pour l'étude de la qualité de des eaux

Les tests biologiques de toxicité et de génotoxicité sont employés directement sur les lixiviats obtenus. Cependant, certains paramètres physico-chimiques du lixiviat (pH, dureté,

¹ Il faut bien distinguer :

- les procédures consistant en une lixiviation à l'eau suivie d'une étape d'extraction-évaporation-concentration,
- les procédures où la lixiviation avec solvant organique est effectuée directement sur l'échantillon solide.

Dans le premier cas, il s'agit d'extraire la fraction hydrosoluble des polluants puis de la concentrer afin d'évaluer sa toxicité (ou génotoxicité). Dans le second cas, la méthode est plutôt orientée vers une extraction maximale des polluants afin d'évaluer la fraction toxique maximale extractible de la matrice.

salinité....) doivent être vérifiés pour correspondre à la gamme de tolérance du test (tableau 6, EPFL, 1996). Cette étape préalable (souvent négligée) est importante pour l'interprétation ultérieure des données. De plus, si les tests biologiques de toxicité sont conduits sur des extraits obtenus avec des solutions à pH non neutre ou avec des solvants organiques, des modifications sont nécessaires.

o Si le pH des solutions extractantes ou du lixiviat obtenu n'est pas dans la gamme de tolérance du test biologique, les alternatives suivantes peuvent être envisagées :

- ramener le pH à la neutralité avant de pratiquer le test¹,
- ramener le pH dans la gamme de tolérance de l'organisme testé (tableau 6),
- laisser le pH tel quel, en considérant que le pH est un facteur de la toxicité,
- effectuer les deux essais (avant et après neutralisation).

o Si des solvants organiques sont utilisés, ils peuvent être dilués à l'eau pour diminuer la toxicité inhérente du solvant. En réalisant un blanc du solvant à la même dilution, on peut donc par différence estimer la toxicité additionnelle due aux polluants extraits. Mais une dilution trop importante du solvant peut conduire à la ré-précipitation des polluants.

Test biologique	pH	Conductivité ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Ammonium ($\text{mg NH}_4^+, \text{NH}_4/\text{l}$)	Na_2SO_4 ($\text{mg Na}_2\text{SO}_4/\text{l}$)
<i>Vibrio fischeri</i>	6.5 - 8.5	28000 - 56000	75 - 150 (pour un pH entre 6.5 - 7.5) 7.5 - 15 (pour un pH entre 7.5 - 8.5)	1250 - 2500
<i>Daphnia magna</i>	6 - 9	3000 - 6000	85 - 170 (pour un pH entre 7 - 7.5) 25 - 50 (pour un pH entre 7 - 7.5) 10 - 20 (pour un pH entre 8 - 8.5) 2.5 - 5 (pour un pH entre 7.5 - 9)	2500 - 5000

Tableau 6. Gamme de validité des tests biologiques par rapports à des paramètres physico-chimiques (EPFL, 1996)

Dans les procédures d'évaluation écotoxicologiques recensées, les 3 tests les plus utilisés sont par ordre d'importance :

- le test Microtox[®], test de toxicité aiguë, utilisant la bactérie bioluminescente *Vibrio fischeri*² (Symons et Sims, 1988, True et Heyward, 1990, Dasappa et Loehr, 1991, Vanhala et Athiainen, 1994, Dombrowski *et al.*, 1996) où est recherchée la concentration (en %) de l'extrait qui diminue de moitié la luminescence initiale de la bactérie. Il test est utilisé depuis près de 20 ans dans le domaine de l'écotoxicologie (Bulich et Isenberg, 1979, Bulich, 1982). La luminescence est produite par l'interaction d'un enzyme (luciférase), d'une flavine réduite et d'un aldéhyde, en présence d'oxygène. Cette réaction prend part à un transfert d'électron le long d'une chaîne de transport d'électrons. L'émission de lumière (entre 420 et 630 nm avec un maximum d'intensité vers 490 nm) qui dépend du flux d'électrons transportés, reflète les changements métaboliques et par conséquent la "santé" de la bactérie (Bulich, 1986). Le test mesure l'inhibition de luminescence après une exposition à un polluant. Le spectre de réponse couvert par ce test biologique est large : le test est en effet sensible à une grande gamme de polluants tant organiques que métalliques (Ribo et Kaiser, 1987, 1988, Steinberg *et al.*, 1995). Sa rapidité (environ 45mn pour 3 tests) et sa simplicité d'emploi (existence de kits commerciaux) font que ce test est devenu un outil de gestion et de recherche très employé.

¹ La modification de pH pour revenir à la neutralité aura pour conséquence de réprécipiter certaines fractions solubles.

² Anciennement *Photobacterium phosphoreum*

- le test Daphnie, test de toxicité aiguë, utilisant un micro-crustacé aquatique *Daphnia magna* (Kwan *et al.*, 1990, Tay *et al.*, 1992, Dutka *et al.*, 1995) où le nombre de *Daphnia magna* toujours mobiles après 24 h ou 48h d'exposition est déterminé pour identifier la concentration provoquant 50% d'immobilisation des organismes.

- le test sur l'algue unicellulaire *Pseudokirchneriella subcapitata*¹, test de toxicité chronique, basée sur l'inhibition de la croissance (Ross et Henebry, 1989) où est déterminée la concentration à laquelle on observe 50% d'inhibition de croissance. D'autres algues unicellulaires peuvent être utilisées (*Scenedesmus subcapitatus*, *Chlorella vulgaris*....).

D'autres tests sont également utilisés pour évaluer la toxicité chronique et la génotoxicité :

- pour la toxicité chronique, l'utilisation du test Cériodaphnie 7 jours (*Ceriodaphnia dubia*) où est déterminée la survie et la reproduction de cet organisme dans différentes dilutions d'extrait (Kwan *et al.*, 1990, Dutka *et al.*, 1995) peut être une alternative au test de reproduction *Daphnia magna* 21 jours (OCDE 202, partie 2, 1984), réduisant ainsi le temps de réponse de 21 à 7 jours,

- pour la mise en évidence de la génotoxicité, le test le plus anciennement utilisé est le test AMES (Aprill *et al.*, 1990, Bessi *et al.*, 1992), basé sur l'utilisation de souches de *Salmonella typhimurium* ou le test SOS Chromotest® sur *E. coli* (Kwan *et al.*, 1990, Dutka *et al.*, 1995). Plus récemment, le test génotoxicité Mutatox® a été employé pour déterminer la génotoxicité d'échantillons environnementaux (Jonhson, 1992, 1993, Ho *et al.*, 1994, 1997, Belkin *et al.*, 1994). Ce test utilise le mutant M169 non bioluminescent de la souche *Vibrio fischeri* (dark mutant). Une modification de l'ADN sous l'action de substances mutagènes entraîne une émission de lumière et permet de calculer le taux de révertants.

Les tests qui viennent d'être présentés sont parmi les plus couramment utilisés. D'autres tests (Poissons [Van Guchte et Maas Diepveen, 1987], ATP tox system® [Kwan *et al.*, 1990], MetPLATE® [Bitton *et al.*, 1992b, c], Thamnotox kit® [Persoone, 1991], Umu test [Dechema, 1995], ...) permettent la mise en évidence et l'expression des toxicités aiguës, chroniques et génétiques. Une synthèse des tests bactériens ou enzymatiques couramment utilisés a été réalisée par Bitton et Koopman (1986, 1992a) et Kong *et al.* (1996).

2.8 Conclusion et objectifs

Les sols contaminés et les déchets sont des matrices complexes et hétérogènes pour lesquelles les démarches de caractérisation du danger et l'évaluation des risques sont difficiles à élaborer. Actuellement, elles sont essentiellement basées sur l'analyse chimique des matériaux ou de leurs lixiviats. Cette caractérisation chimique est insuffisante pour conclure à l'innocuité des matériaux solides. En effet, la teneur totale ainsi que la fraction lixiviable des polluants ne sont qu'indicatrices du danger toxique. Celui-ci ne peut être évalué que par l'emploi de tests biologiques de toxicité qui, exposés aux matériaux, démontrent l'existence d'effets quantifiables.

Sur la base de l'étude bibliographique, un grand nombre d'espèces bactériennes, végétales et animales peuvent être utilisées pour évaluer la toxicité d'échantillons environnementaux.

¹ Anciennement *Raphidocelis subcapitata* ou encore, *Selenastrum capricornutum*

Deux approches peuvent être dégagées : les organismes testés peuvent être exposés directement à l'échantillon ou indirectement par le biais d'un extrait issu de l'échantillon (figure 8).

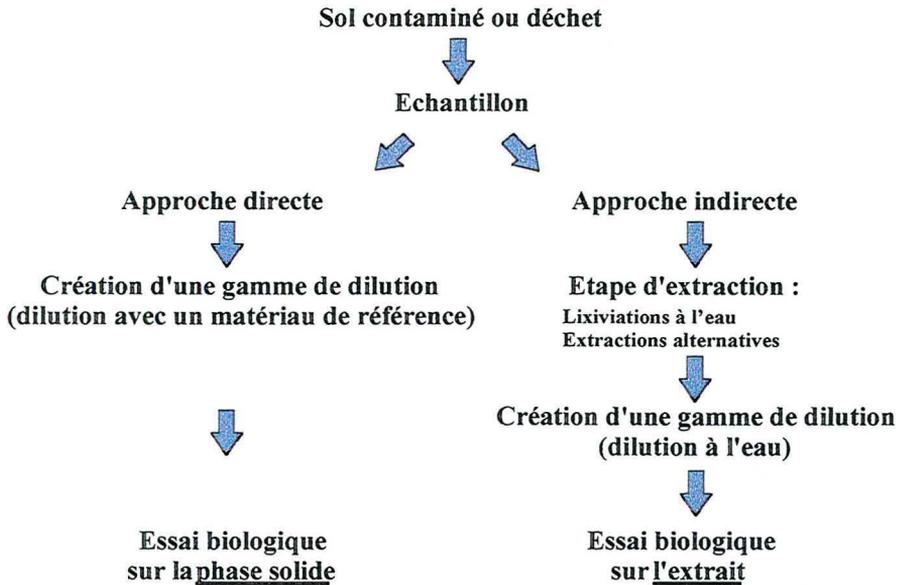


Figure 8 . Les approches directes et indirectes en écotoxicologie (Bispo et al. 1997b)

L'objectif de ce travail est de caractériser la mobilité et la toxicité des polluants des sols contaminés et des déchets. La diversité des tests biologiques réalisables sur des extraits liquides permet de caractériser les différentes formes de toxicité (aiguë, chronique et génétique), les techniques d'extraction par lixiviation ou d'élution par percolation ont donc été retenues pour caractériser le danger lié aux matrices solides contaminées. De plus, cette approche indirecte permet également d'estimer le danger lié au transfert des polluants par l'eau qui représente un vecteur important pour les pollutions : elle permet la mobilisation des polluants par solubilisation directe ou par entraînement des particules ou des colloïdes, transportant ainsi les pollutions vers les milieux aquatiques (nappes phréatiques, rivières..) par ruissellement et/ou lessivage, facilitant le contact entre ces polluants et les cibles environnementales (aquatiques ou terrestres). Cette évaluation indirecte du danger peut faire appel à toute une gamme de procédures d'extraction ou d'élution par percolation, couplées à des tests biologiques de toxicité. La figure 9 résume l'ensemble des couplages possibles.

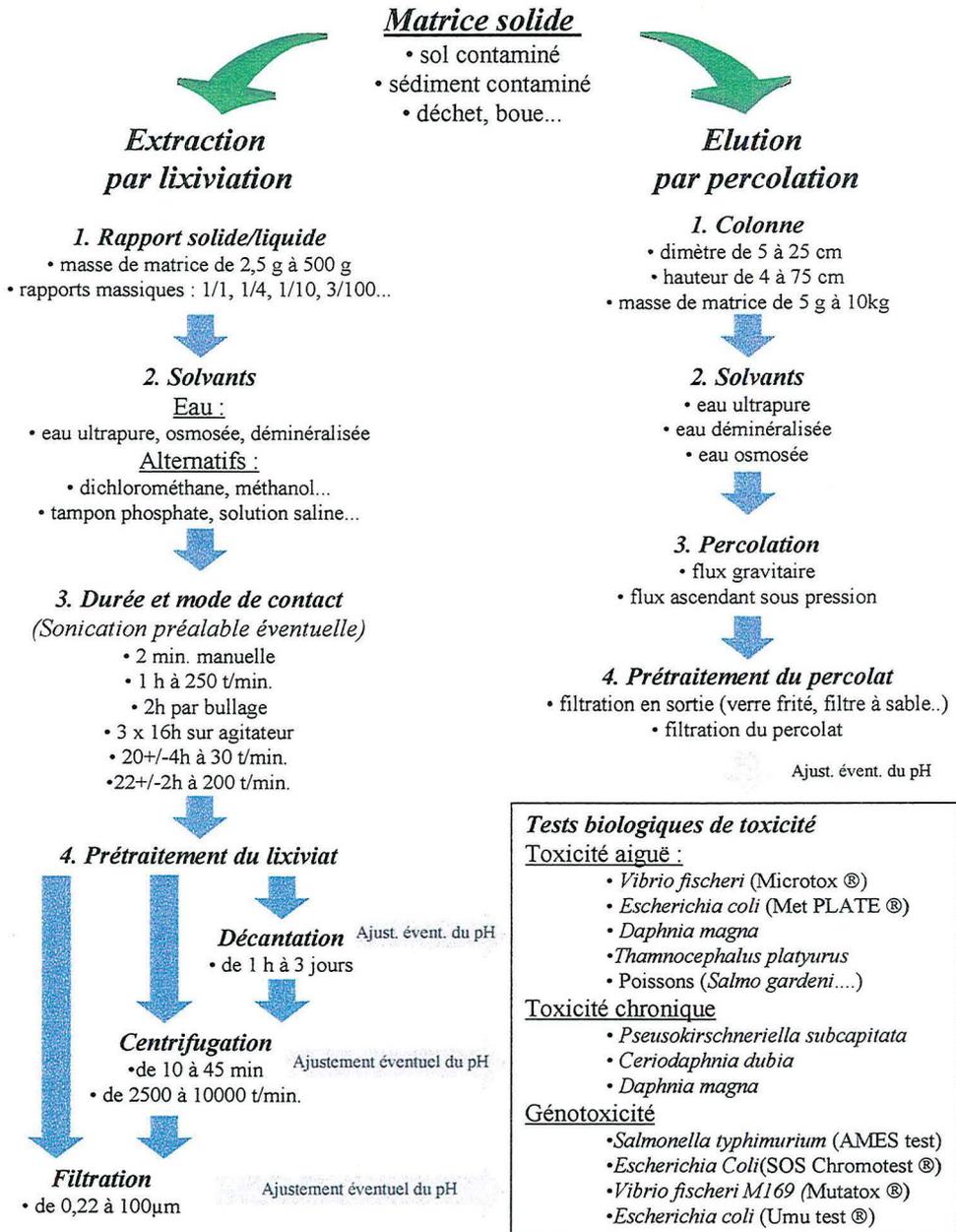


Figure 9. Résumé des différentes méthodes d'extraction mises en évidence lors de l'étude bibliographique

Dans un premier temps, les techniques de lixiviation statiques ont été retenues car plus simples d'étude pour modéliser le transfert des polluants et étudier leur toxicité. Cependant, devant la diversité des méthodes mises en évidence lors de l'étude bibliographique, il nous a paru essentiel de justifier les protocoles à employer et donc d'étudier l'impact des conditions de lixiviation (rapport solide/liquide, durée de lixiviation, nature du solvant...) sur la mobilité de polluants et l'expression de leur toxicité. Cette étude ne peut être réalisée qu'à travers l'emploi d'échantillons contaminés au laboratoire pour lesquels la nature et la quantité des polluants introduits sont connues permettant le calcul de rendements d'extraction et d'expliquer la nature et l'intensité de la réponse toxique.

Les conditions de vieillissement des polluants dans les échantillons pollués au laboratoire étant différentes de celles rencontrées dans les contaminations anciennes des sols ou dans les déchets, le protocole dégagé par l'emploi d'échantillons de terre artificiellement pollués doit être employé sur des matrices solides industrielles. Cette application permet de valider son utilité et de définir les limites d'une telle caractérisation.

Finalement, la représentativité de l'étape de lixiviation par rapport aux phénomènes du terrain (percolation) doit également être discutée. En effet, les protocoles de lixiviation statique sont des simplifications des transferts des polluants des matériaux solides vers l'eau. Ces modèles doivent être calibrés par rapport aux phénomènes dynamiques d'écoulement d'eau dans un profil de sol ou de déchet.

De même, la caractérisation de la toxicité des échantillons est le plus souvent effectuée en l'absence d'une vision à long terme. Les questions relatives au devenir des polluants et à l'évolution de la toxicité, en fonction de la dégradation chimique et biologique de l'échantillon sont rarement envisagées.

L'objectif est donc de caractériser dans l'espace et dans le temps les transferts potentiels des polluants des matrices solides vers les différents milieux environnementaux (essentiellement les eaux) et d'évaluer le plus exhaustivement possible leurs impacts sur les organismes vivants.

III. Choix des matériaux et des tests biologiques utilisés dans le cadre de la recherche

*Pour atteindre son but, la science est à l'écoute des faits.
Elle s'impose le contrôle des expériences en laboratoire.
La réalité qu'elle recrée - en termes de théories et de lois –
doit obligatoirement produire ses observations.*

H. Reeves

3. Choix des matériaux et des tests biologiques utilisés dans le cadre de la recherche

Dans le cadre de cette recherche, des matériaux solides (sols ou déchets) contaminés au laboratoire ou prélevés sur des sites contaminés (pour les matériaux terreux) et des sites de production (pour les déchets) ont été évalués par une batterie de tests biologiques de toxicité et un test de génotoxicité.

3.1 Choix des matériaux

Deux types de matériaux solides ont été évalués : des terres contaminées au laboratoire et des terres ainsi que des déchets prélevés sur différents sites industriels en friche ou en activité. La contamination en conditions contrôlées d'une terre permet de maîtriser la nature et la quantité des polluants introduits, ce qui facilite l'interprétation ultérieure des résultats. Cependant, les conditions de contamination et de vieillissement de ces matériaux étant très différentes des conditions rencontrées pour les matrices industrielles contaminées (terres issues de sites contaminés, déchets de production...), le recours à des terres et des déchets issus de sites industriels est essentiel pour valider les acquis obtenus sur des terres contaminées artificiellement.

3.1.1 Contamination au laboratoire d'un échantillon de terre

Une terre agricole a été prélevée sur le domaine agricole de la Bouzule (ferme expérimentale de l'ENSAIA, 54) dans l'horizon supérieur (0-15 cm) d'un sol brun lessivé, limono-argileux (limons de plateau). Après prélèvement, la terre a été séchée à 40°C, broyée et tamisée à 4 mm. Les analyses granulométriques et élémentaires sont précisées dans le tableau 7.

Paramètres	Unité	Valeur
pH eau		6,0
CEC	cmol+/kg	15,3
Carbone organique total	g/kg	16,53
<i>Eléments traces métalliques</i>		
Cuivre (extraction HF)	mg/kg	24,5
Manganèse (extraction HF)	mg/kg	1740
Zinc (extraction HF)	mg/kg	131
Chrome (extraction HF)	mg/kg	88,6
Plomb (extraction HF)	mg/kg	49,5
Cadmium (extraction HF)	mg/kg	0,377
<i>Granulométrie</i>		
Particules comprises entre 0,000 et 0,002 mm	g/kg	284
Particules comprises entre 0,002 et 0,020 mm	g/kg	326
Particules comprises entre 0,020 et 0,050 mm	g/kg	203
Particules comprises entre 0,050 et 0,100 mm	g/kg	25
Particules comprises entre 0,1 et 0,2 mm	g/kg	26
Particules comprises entre 0,2 et 0,5 mm	g/kg	61
Particules comprises entre 0,5 et 1 mm	g/kg	36
Particules comprises entre 1 et 2 mm	g/kg	39

Tableau 7. Analyse granulométrique et chimique de la terre agricole prélevée sur le site expérimental de la Bouzule (54)

La terre a été contaminée au laboratoire par des polluants métalliques et organiques. Dans un premier temps, des polluants organiques et métalliques ont été introduits conjointement. Puis, afin de permettre une meilleure interprétation des résultats (et notamment pouvoir expliciter l'éventuelle sensibilité des organismes biologiques), les polluants organiques et les polluants minéraux ont été apportés séparément à deux échantillons de terre.

a) *Choix des polluants*

Le recours à un échantillon de terre contaminé au laboratoire a été utilisé pour simplifier l'étude des conditions de lixiviation. Cependant, afin de pouvoir généraliser les résultats à d'autres types de contamination, les polluants choisis doivent, d'une part, appartenir aux deux grandes classes de polluants (organiques et métalliques) et, d'autre part, présenter des comportements différents lors de la lixiviation. En effet, il s'agissait d'étudier non seulement le devenir des polluants solubles dans l'eau (facilement extractibles à l'eau) mais également celui des polluants peu hydrosolubles. De plus, pour les polluants organiques, les molécules choisies doivent être peu dégradables pour éviter leur disparition ou leur transformation dans l'échantillon de terre ou dans la solution de lixiviation.

Pour les polluants métalliques, le chrome hexavalent et le plomb ont été choisis pour leurs comportements très différents dans les sols. Le chrome sous forme hexavalente est généralement utilisé comme traceur car très peu réactif avec les constituants du sol (Tevissen, 1993) alors que le plomb, à pH proche de la neutralité, est au contraire fortement retenu par les argiles et la matière organique du sol.

Pour les polluants organiques, le 2,4,6 trichlorophénol et le phénanthrène ont été retenus pour leurs temps de ½ vie supérieurs à 70 jours dans les sols et 16 jours en milieu aqueux (Howard, 1991) et leurs solubilités différentes (800 mg/l pour le 2,4,6 trichlorophénol contre 1.3 mg/l pour le phénanthrène, à 20°C).

Les niveaux de contamination ont été fixés de telle manière à se situer au dessus des valeurs définies par la directive européenne N° 86-278 du 12 juin 1986 et des seuils hollandais et québécois d'intervention (tableau 8) mais également de façon à pouvoir être détectées par les tests biologiques de toxicité sur la base d'expériences préliminaires.

	CEE (*)	Hollande (**)			Québec***		
		A	B	C	A	B	C
Cr	non définie	100	250	800	75	250	800
Pb	50 à 300	85	150	600	50	200	600
2,4,6 trichlorophénol	non définie	0.01	1	10	0.1	1	10
Phénanthrène	non définie	0.1	10	100	< 0.1	5	50

* : directive européenne N° 86-278 du 12 juin 1986 relative à l'épandage des boues, Annexe II C

** : VROM (1983), seuil C correspondant à la valeur d'intervention au dessus de laquelle le site doit être décontaminé

*** : Ministère de l'Environnement du Québec (1988), seuil C correspondant à la valeur d'intervention au dessus de laquelle le site doit être décontaminé

Tableau 8. Valeurs guides européennes, hollandaises et québécoises (en mg/kg de terre sèche)

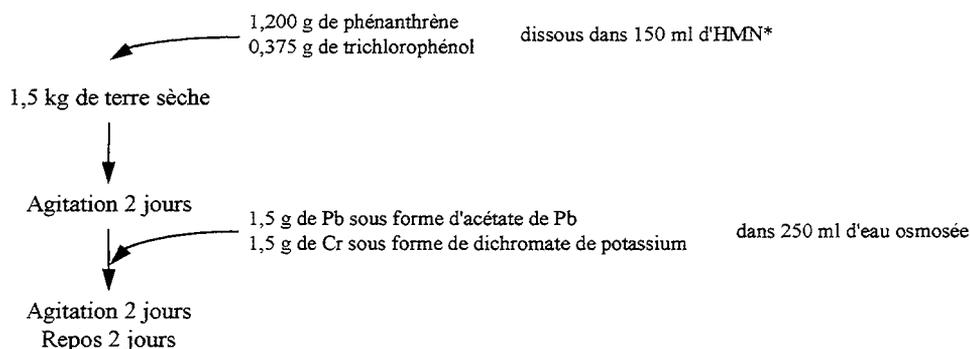
Les caractéristiques des solutions de contamination ainsi que les objectifs de contamination (en mg/kg de matière sèche) sont rapportés dans le tableau 9.

	Forme	Pureté analytique	Fournisseur	Objectifs de contamination
Plomb	Acétate de plomb	99 %	Aldrich	1 g de Pb/kg de terre sèche
Chrome	Dichromate de potassium	98 %	Prolabo	1 g de Cr/kg de terre sèche
2, 4, 6, Trichlorophénol	-	98 %	Aldrich	250 mg/kg de terre sèche
Phénanthrène	-	98 %	Riedel-de Haën	800 mg/kg de terre sèche

Tableau 9. Forme, pureté, fournisseurs et objectifs de contamination

b) Contamination simultanée de la terre agricole par des polluants organiques et des polluants métalliques

Lors de cette contamination simultanée, les polluants métalliques ont été apportés dans l'eau ; les polluants organiques ont été ajoutés à l'échantillon de terre, dissous dans une huile minérale (Heptaméthylnonane, Interchim). L'heptaméthylnonane est une huile non hydrosoluble, précédemment utilisée à l'IRH pour simuler les apports d'hydrocarbures polycycliques aromatiques dans des hydrocarbures lourds et reproduire une contamination accidentelle (Bispo *et al.*, 1995b). La contamination et la préparation sont explicitées dans la figure 10.



* HMN : Heptaméthylnonane (huile minérale.)

Figure 10. Contamination simultanée de la terre agricole par des éléments traces métalliques (Cr et Pb) et des polluants organiques (phénanthrène et 2,4,6 trichlorophénol)

Les concentrations des différents polluants obtenues après contamination, exprimées en mg/kg de matière sèche, sont regroupées dans le tableau 10. Les analyses ont été réalisées, après extraction Soxhlet, à 110 °C, au Dichlorométhane/Hexane (50/50, v/v) suivie d'une quantification en HPLC (détection UV et Fluorimétrique) pour les composés organiques, et après minéralisation à l'eau régale suivie d'un dosage par émission atomique avec atomisation à la flamme, pour les éléments traces métalliques.

	Objectifs de contamination (en mg/kg de terre sèche)	Concentrations mesurées (en mg/kg de terre sèche)
Plomb	1000	750 ± 91
Chrome	1000	1195 ± 283
Trichlorophénol	250	176 ± 47
Phénanthène	800	760 ± 288

Tableau 10. Objectifs de contamination et concentrations mesurées (exprimées en mg/kg de terre sèche) sur l'échantillon de terre agricole contaminée simultanément par des polluants organiques et métalliques

c) Contamination distincte de la terre agricole par des polluants organiques et des polluants métalliques

La contamination précédente a été réalisée en apportant les polluants organiques et métalliques sur le même échantillon, pour ces nouvelles contaminations, les mêmes polluants métalliques et organiques sont apportés séparément sur un échantillon de terre agricole, en respectant les mêmes quantités. Cependant, pour la terre contaminée par les polluants organiques, afin de limiter la toxicité due à la présence de l'huile HMN, la contamination organique s'est effectuée à l'aide d'une solution de méthanol, ce dernier étant ensuite évaporé pendant 2 jours sous hotte, à température ambiante ($20 \pm 5^\circ\text{C}$).

Les concentrations mesurées après contamination et évaporation sont comparées aux objectifs de contamination dans le tableau 11.

		Objectifs de contamination (en mg/kg de terre sèche)	Concentrations mesurées (en mg/kg de terre sèche)
Bouzule + Métaux	Plomb	1000	989 ± 80
	Chrome	1000	985 ± 70
Bouzule + Organiques	2,4,6 Trichlorophénol	250	213 ± 40
	Phénanthène	800	988 ± 180

Tableau 11. Objectifs de contamination et concentrations mesurées (exprimées en mg/kg de terre sèche) sur deux échantillons de terre agricole contaminée par des polluants métalliques (Bouzule +métaux) ou par des polluants organiques (Bouzule + organiques)

3.1.2 Définition et prélèvements des échantillons issus de sites en friche (terres souillées) ou de sites de production (déchets)

Les terres issues de contaminations industrielles et les déchets générés par les process présentent un temps de vieillissement plus important par rapport à des terres artificiellement contaminées au laboratoire : les polluants ont pu réagir avec les constituants organiques ou minéraux de la matrice (modification de la spéciation, dégradation partielle, liaisons covalentes...). L'amplitude de ces phénomènes est plus faible au laboratoire lors de dopages artificiels alors qu'ils régissent la mobilité et donc le danger des polluants. Ainsi, afin de compléter la gamme des matériaux testés, deux terres issues de sites potentiellement contaminés ont été échantillonnées. De même, deux déchets ont été prélevés sur des sites industriels en activité.

Les matériaux sélectionnés ont été choisis sur la base de la nature des contaminants. Ainsi, comme pour les échantillons de terre contaminés séparément, et afin de mettre en évidence des comportements distincts lors de l'évaluation de la mobilité et de la toxicité, des pollutions de nature différente ont été sélectionnées. Parmi les matériaux industriels prélevés, deux

présentent des contaminations mixtes, à la fois minérale et organique alors que les deux autres matériaux présentent soit une contamination essentiellement organique, soit une contamination essentiellement minérale. Leur choix a également été conditionné par les concentrations détectées : les sites desquels sont issues les échantillons de terre doivent être réhabiliter suite à la pollution de la nappe et les déchets sélectionnés sont classés comme dangereux sur la base notamment du contenu en métaux et en PCB.

Les quatre matériaux issus de sites industriels (en friche ou en activité) sont les suivants (tableau 12, détail des analyses en annexe 1) :

- **La terre S1** est souillée par des éléments métalliques, des solvants organiques et des culots de distillation de régénération de solvants. Elle présente donc une contamination mixte par des substances organiques et métalliques. L'usine régénérait des solvants usagés (produits organiques dissous dans des solvants divers) par distillation pour récupérer des solvants "propres" (acétone, dichlorométhane..) et éliminait les culots de distillation. Suite à la baisse des prix des solvants, le coût du recyclage est devenu supérieur à celui de l'achat des solvants et l'entreprise a déposé son bilan, laissant sur le site des fûts de solvants non traités qui, en se corrodant ont généré une pollution du sol et de la nappe. La terre a été prélevée par IRH Environnement, en juin 1995 dans une lagune de stockage en six points différents sur 1 m², à une profondeur maximale de 2,5 m. Il n'y avait pas de couvert végétal. La terre utilisée pour les biotests a préalablement été séchée à température ambiante pour ramener son humidité à 10 %. Elle a ensuite été épierrée manuellement, broyée puis tamisée à 5 mm. L'homogénéisation a été réalisée dans une bétonnière de travaux publics. Le stock ainsi préparé étaient d'environ 400 kg.
- **La terre S2** est contaminée par des résidus de cokerie. Elle présente une pollution essentiellement liée à des substances organiques (hydrocarbures aliphatiques et aromatiques). Elle a été prélevée par IRH Environnement, en juillet 95, à la pelle mécanique dans d'anciennes cuves de rétention de cokerie comblées par des matériaux de démolition. La superficie échantillonnée est de 20 m² sur une profondeur maximale de 1,5 m. Son humidité initiale était d'environ 25 %. Le sol a été épierré et tamisé à 5 mm en l'état avant d'être homogénéisé dans une bétonnière de travaux publics. Le stock ainsi préparé était d'environ 250 kg.
- **Le déchet D1** provient d'une entreprise qui récupère les éléments ferreux issus du broyage automobile ; les autres parties non valorisables (plastiques intérieurs, mousses de sièges, gaines plastiques, Durits....) sont alors éliminés en décharge. Ces résidus présentent une contamination mixte, métallique et organique (PCB notamment). IRH Environnement a prélevé ces déchets, les a débarrassé des aciers et métaux spéciaux, avant de les broyer (3 fois) dans un broyeur à mâchoires. Le tamisage à 10 mm a permis de constituer un stock de 250 kg de déchet.
- **Le déchet D2** est issu d'une usine d'incinération d'ordures ménagères de forte capacité disposant d'un dispositif récent de traitement des fumées par voie humide. Les cendres volantes prélevées par INSA-POLDEN (Lyon), n'ont pas été chaulées afin d'éviter un effet toxique, du au pH. Elles se caractérisent essentiellement par la présence de métaux lourds volatils et semi-volatils (plomb, zinc, cadmium, mercure, arsenic..), ainsi que par une importante fraction soluble, due pour une bonne part à la présence de chlorures et de sulfates.

				Polluants majoritairement identifiés	
	Matrice	Nature	Type de contamination	Polluants minéraux (mg/kg de MS)	Polluants organiques (mg/kg de MS)
Terres	Sol 1	Sol limono argileux	Mixte	Cd : 30 Cr : 342 Pb : 1200 Zn : 2270	Arochlor 1242 : 4.5 Arochlor 1254 : 204 Arochlor 1260 : 13.7
	Sol 2	Sol sablo limoneux	Essentiellement organique	Cr : 134 Zn : 2080	Naphtalène : 115 Fluorène : 87 Phénanthrène : 205 Chrysène : 125 Benzo(a)Pyrène : 70
Déchets	Déchet 1	Hétérogène (présence de mousses, débris métalliques et plastiques)	Mixte	Cd : 32 Cr : 133 Pb : 2370 Zn : 10200	Arochlor 1242 : 29 Arochlor 1254 : 15 Arochlor 1260 : 4.1
	Déchet 2 (INSA-POLDEN)	Cendres	Essentiellement minérale	Cd : 1210 Pb : 1700 Zn : 6900	

Tableau 12. Principaux polluants détectés dans les matériaux issus de sites industriels

3.2 Choix des tests biologiques de toxicité

Le but de la recherche est d'évaluer la mobilité et les effets des polluants sur les organismes de manière exhaustive. Un seul test biologique ne permettant pas d'appréhender la totalité de ces impacts, il est nécessaire d'élaborer une batterie de tests biologiques de toxicité pour obtenir l'ensemble des informations. Une réflexion est également proposée pour intégrer la réponse des différents tests biologiques et déterminer le danger des matériaux testés.

3.2.1 Choix de la batterie de tests biologiques

La constitution de la batterie a été réalisée sur la base des critères suivants :

- tests réalisables en milieu aqueux,
- tests permettant d'évaluer l'impact des polluants sur le court et le long terme,
- tests permettant d'évaluer l'impact des polluants à différents niveaux d'organisation,
- tests issus de niveaux trophiques différents.

Le tableau 13 explicite le choix des tests de toxicité intégrés dans la batterie, il reprend l'organisme utilisé, l'espèce, l'effet mesuré et l'information apportée par le test quant à l'impact sur le court et le long terme.

Organisme	Niveau trophique	Espèce testée	Effet mesuré	Information
<i>Bactérie</i>	Décomposeur	<i>Vibrio fischeri</i>	Inhibition de la luminescence	Test de toxicité aiguë (informations sur le court terme)
<i>Bactérie</i>	Décomposeur	<i>Vibrio fischeri</i> M169	Ré-émission de lumière	Test de génotoxicité (informations sur le long terme)
<i>Micro-crustacé</i>	Consommateur	<i>Daphnia magna</i>	Immobilisation et mortalité	Test de toxicité aiguë (informations sur le court terme)
<i>Algue unicellulaire</i>	Producteur primaire	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Inhibition de croissance	Test de toxicité chronique (informations sur le long terme)

Tableau 13. Batterie de tests utilisée pour évaluer la toxicité des matériaux sélectionnés

La batterie ainsi constituée est complémentaire tant du point de vue des organismes exposés qui proviennent des différents niveaux trophiques, que par rapport aux niveaux d'organisations évalués : niveau moléculaire (inhibition et ré-émission de la luminescence de *Vibrio fischeri*), niveau individuel (immobilisation et mortalité de *Daphnia magna*) et niveau d'une population (effets sur la croissance de *Pseudokirchneriella subcapitata*). De plus, elle permet d'appréhender les effets à court et long terme.

Pour l'ensemble des tests biologiques réalisés, l'échantillon aqueux à évaluer (lixiviats ou percolat) va être dilué afin de constituer une gamme de dilution. Dans chaque dilution, l'observation des effets générés par les molécules mobilisées sur les organismes tests permet alors de générer la courbe concentration-effet, interprétée ensuite pour calculer les descripteurs toxicologiques (CE₅₀ % notamment).

Les différents tests biologiques de toxicité employés sont brièvement décrits ci-après (les protocoles détaillés figurent en annexe 2) :

- Les essais Microtox® ont été conduits suivant la norme française AFNOR T90-320 (1991) avec les réactifs commercialisés par la société AZUR Environmental (Carlsbad, USA). Ce test utilise une bactérie marine bioluminescente (*Vibrio fischeri*) et permet d'estimer la concentration effectrice qui réduit de 50% la luminescence par rapport à un témoin (ou CE₅₀%). La luminescence est enregistrée après 5, 15 et 30 minutes d'exposition à l'échantillon.
- Les essais sur microcrustacés ont été réalisés sur *Daphnia magna*, suivant la norme française AFNOR T90-301 (1996). Ce test permet d'estimer la concentration effectrice qui immobilise 50% de la population de *Daphnia magna* par rapport à un témoin (ou CI₅₀%).
- Les essais conduits sur l'algue unicellulaire *Pseudokirchneriella subcapitata* ont été réalisés suivant la norme AFNOR T90-304 (1993) avec 6.10⁵ cellules/ml dans des flacons de 10 ml. Les lixiviats n'étant pas filtrés, l'estimation de la croissance a été réalisée par comptage microscopique sur cellules de Malassez. Ce test permet d'estimer la concentration effectrice qui inhibe de 50% la croissance des algues exposées par rapport à un témoin (ou CI₅₀%).

L'unité commune adoptée pour les tests de toxicité aiguë et chronique est définie par :

$$\text{Unité toxique (Ut)} = \frac{100}{\text{CX}_{50}}$$

où CX_{50} est la concentration efficace, immobilisatrice ou inhibitrice à 50% en fonction du test biologique de toxicité employé. Plus l'unité toxique est élevée, plus l'échantillon est toxique¹. Lorsque des lixiviations sont conduites avec des solvants autres que l'eau (méthanol, solutions tamponnées...), des blancs sont réalisés en parallèle pour tenir compte de la toxicité intrinsèque du solvant.

- Les essais sur *Vibrio fischeri* M169 (test Mutatox[®]) ont été conduits avec les réactifs commercialisés par la société AZUR Environmental (Carlsbad, USA), suivant le protocole développé par Microbics (1995b). Ce mutant est une bactérie non luminescente et la restauration de son aptitude à émettre de la lumière indique une altération de l'ADN. Ce test peut être utilisé sur des échantillons liquides avec ou sans activation métabolique préalable (Kwan *et al.*, 1990, Jonhson, 1992, Legault *et al.*, 1994). L'activation métabolique -réalisée avec les complexes enzymatiques issus de foies de rat, appelés S9 mix- simule les réactions métaboliques qui ont lieu dans le foie. Les lixiviats sont incubés pendant une durée totale de 24 heures avec la bactérie. Durant l'incubation, la luminescence est enregistrée après 12, 16 et 24 heures. Des témoins positifs et négatifs sont également réalisés pour tester la viabilité et la stabilité de la souche bactérienne. La figure 11 illustre les relations "concentration-réponse" obtenues après exposition de la suspension bactérienne à un échantillon. Elle renseigne sur le seuil de positivité (valeur de la luminescence à partir de laquelle l'échantillon est considéré comme génotoxique), la concentration seuil (concentration la plus faible engendrant une réponse supérieure ou égale au seuil de positivité) et le facteur d'amplification (rapport entre la valeur maximale de ré-émission de lumière enregistrée et la valeur du seuil de positivité).

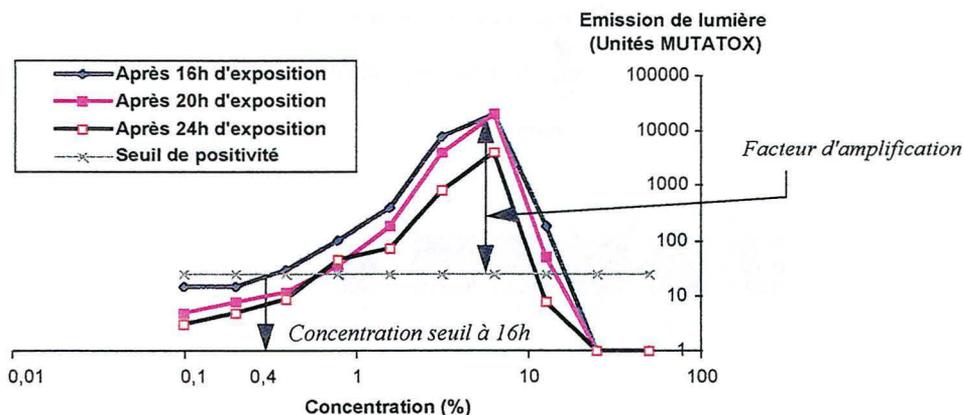


Figure 11. Illustration des relations concentration-réponse obtenues par le test de mutagenèse Mutatox[®] après 16, 20 et 24h d'incubation avec un lixiviat

¹ Cette unité représente la charge toxique libérée par un échantillon solide dans l'extrait ou le percolat.

Le seuil de positivité est fixé égal à quatre fois la valeur des témoins négatifs : un échantillon est considéré comme génotoxique si, sur au moins deux dilutions successives, la luminescence mesurée dépasse le seuil de positivité. L'échantillon proposé comme exemple (figure 11) est génotoxique (la luminescence observée dépasse le seuil de positivité pour 5 à 6 dilutions suivant la durée d'exposition considérée), la concentration seuil à 16 h est égale à 0.4% et le facteur d'amplification est supérieur d'environ 500.

L'ensemble des tests de toxicité présentés sont réalisés par exposition indirecte à des extraits. Un test, par exposition directe de l'organisme à l'échantillon a également été effectué afin de comparer ces deux méthodes d'exposition.

3.2.2 Test Microtox® en phase solide

Ce test est un prolongement de celui développé pour les échantillons liquides. Il consiste à exposer la bactérie *Vibrio fischeri* à des suspensions de terre ou de déchet, et non plus à un extrait. Une série de 10 dilutions au demi est réalisée dans lesquelles sont ajoutées les bactéries. Après une durée d'incubation de 20 minutes, les suspensions de sol sont filtrées (filtre à plasma sanguin, Evergreen Scientific, CA) et les bactéries sont récupérées dans le surnageant pour la lecture de la luminescence (Microbics, 1995a). La figure 12 schématise le déroulement de ce test.

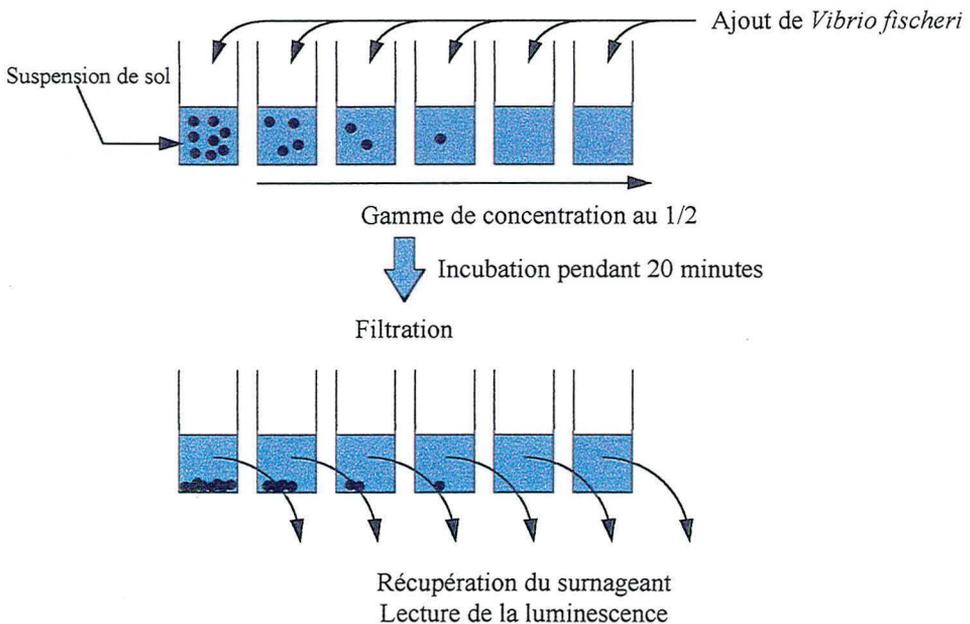


Figure 12. Schéma du déroulement du test Microtox® en phase solide

Il est alors possible d'établir une courbe concentration-réponse et de déterminer la concentration à laquelle la luminescence est diminuée de moitié par rapport aux témoins ou CE_{50} (%). Par analogie avec ce qui a été développé pour les lixivats, cette valeur peut être convertie en $Ut (= 100/CE_{50})$.

3.2.3 Intégration des réponses des tests biologiques

Le but de l'étude n'était pas de statuer sur le danger toxique ou génotoxique des matrices employées dans le cadre de la recherche mais de les utiliser pour mettre en évidence la mobilité et la toxicité des polluants. Cependant, il est intéressant de réfléchir à une telle approche et de traiter l'information générée par plusieurs tests biologiques de toxicité.

Différentes méthodes existent pour statuer sur la toxicité de matrices polluées. Les plus utilisées sont celles se référant à des seuils limites de toxicité au dessus desquels la matrice est déclarée comme dangereuse. Les différences rencontrées dépendent du nombre de tests biologiques utilisés pour définir ce dépassement de seuil.

a) Méthodes de classement par rapport à un seul test biologique

Ces méthodes consistent à comparer la réponse d'un test par rapport à un seuil de toxicité déterminé. La matrice est considérée comme dangereuse lorsque ce seuil est franchi. Ces méthodes reposent sur la réponse individuelle des tests biologiques :

- Bulich (1982) retient le seuil de 25% pour la CE₅₀ (basé sur le test *Vibrio fischeri*),
- Le Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement (1997b), concernant les critères et méthodes d'évaluation des l'écotoxicité des déchets, propose d'utiliser un seuil ou valeur limite¹ de :
 - 10% pour la CE₅₀ des tests *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* (48h), ver de terre (*Eisenia fetida*) et plantes terrestres,
 - 0,1% pour la CE₂₀ des tests *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* (21 jours) et *Ceriodaphnia dubia* (7 jours).
- Une réflexion identique est actuellement menée en Suisse par l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne concernant l'établissement de seuils d'écotoxicité, basés sur la valeur de la CE₅₀ (communication personnelle de K. Becker van Slooten, 1998).

Ces méthodes reposent sur les réponses individuelles des tests biologiques : un seul test permet de classer l'échantillon testé comme dangereux. De plus, elles ne prennent pas en compte la génotoxicité des matrices. Il est plus pertinent d'agréger les réponses de plusieurs tests dans un indice unique.

b) Méthode d'intégration des réponses des différents tests

Les méthodes consistent à construire un indice global de toxicité à partir d'un ensemble de résultats de tests biologiques, sur un même échantillon. Les indices obtenus sont ensuite positionnés par rapport à un seuil ou permettent de classer des échantillons entre eux (classement relatif). A la différence des méthodes précédentes, cette démarche utilise un ensemble de réponses et non plus une seule. Parmi les différentes méthodes recensées (Constant *et al.*, 1993, Hartwell, 1997, Swanson *et al.* 1997), celle proposée par Constant *et al.* est la mieux adaptée à la problématique envisagée. Ils proposent pour les effluents le calcul d'un indice PEEP (Potential Ecotoxic Effects Probe) qui intègre le débit de rejet, la toxicité, la génotoxicité et la biodégradabilité de l'effluent. Cet indice est calculé à l'aide de

¹ Ces valeurs ont été proposées et sont actuellement discutées.

la formule suivante : $PEEP = \log_{10} \left[1 + n \left(\frac{\sum_{i=1}^N Ti}{N} \right) Q \right]$

où :

- n est le nombre de tests produisant une réponse
- N est le nombre total de tests réalisés
- Ti est la toxicité des tests avant et après biodégradation exprimée en Unités Toxiques (=100/CE₅₀)
- Q est le débit de l'effluent

Les méthodes précédemment définies permettent de situer la toxicité et/ou la génotoxicité des matrices solides par rapport à un seuil déterminé ou dans l'absolu. Elles peuvent être utilisées dans un cadre réglementaire à condition de choisir et de valider le seuil.

3.3 Conclusion

Les matériaux sélectionnés présentent une complexité croissante. Les contaminations réalisées au laboratoire permettront de comprendre et de modéliser la mobilité et la toxicité des polluants introduits en conditions contrôlées. Le recours à des matériaux "mono-contaminés" permettra de valider les acquis obtenus sur les matériaux modèles, tout en ne considérant qu'un seul grand type de polluant (métallique ou organique). Finalement, l'utilisation d'échantillons "multi-contaminés" permettra d'augmenter la complexité des interactions.

La toxicité et le danger de ces matériaux seront évalués par la batterie de tests constituée, qui permettra par sa complémentarité de qualifier et de quantifier des effets à court et à long terme, à différents niveaux d'organisation biologique et sur des organismes issus de différents niveaux trophiques. L'utilisation de tests biologiques réalisables sur un milieu liquide nécessite la mise en solution des polluants avant la réalisation des essais.

IV. Mobilité des polluants et expression de leur toxicité en fonction des conditions de lixiviation et de la nature du test biologique

4. Mobilité des polluants et expression de leur toxicité en fonction des conditions de lixiviation et de la nature du test biologique

Les protocoles dégagés dans le cadre de l'étude bibliographique semblent essentiellement dictés par des impératifs pratiques. Ils négligent les conditions optimales d'extraction, et, en particulier le rendement d'extraction. Ainsi, dans les techniques d'extraction par lixiviation, les rapports les plus utilisés (1/10 et plus) privilégient l'obtention d'un volume d'eau suffisant pour réaliser les tests biologiques (daphnie, algues unicellulaires..) au détriment de la réalité du terrain. De même, les durées de contact de 2 minutes ou 24 heures permettent une rationalisation du travail mais peu de données existent précisant leur efficacité : en 2 minutes, est-il possible d'extraire une quantité de polluants représentative de ce qui peut être en contact avec les organismes et, *a contrario*, une durée de contact 24 h n'est elle pas trop longue, favorisant, d'une part, le contact entre les polluants et les particules du sol (et donc une meilleure fixation) et, d'autre part, les phénomènes interférants (biodégradation, volatilisation, oxydation...)?

Des essais ont donc été réalisés afin d'évaluer l'impact des protocoles de lixiviation sur la mobilité des polluants et l'expression de leur toxicité. Les points particuliers ayant fait l'objet de cette recherche concernent l'étude de l'impact du rapport massique solide/liquide, de la durée d'extraction, de la nature du solvant d'extraction et de la filtration, sur l'étape de lixiviation et sur les résultats des tests biologiques. En plus de ces paramètres, l'expression de la toxicité va dépendre non seulement de la mobilité des polluants mais également du "détecteur toxicologique" utilisé sur cet extrait. Les essais ont été conduits sur les terres contaminées au laboratoire afin de maîtriser la quantité et la nature des polluants introduits.

4.1 Effet des conditions de lixiviation et de prétraitement de l'échantillon sur la mobilité des polluants et l'expression de leur toxicité

Il s'agit de comprendre le rôle joué par les conditions de lixiviation sur la mobilité des polluants et l'expression de leur toxicité afin de sélectionner un ou des protocoles de lixiviation. L'objectif est de comparer les différentes conditions de lixiviation et de les comparer entre elles par rapport au rendement d'extraction et à la toxicité. Concernant la toxicité, la réponse relative d'un test est suffisante pour hiérarchiser les performances de chaque méthode d'extraction (en d'autres termes, l'usage de la batterie de tests n'est alors pas justifiée). Le test biologique bactérien Microtox[®] en phase liquide, rapide et aisément réalisable sur un grand nombre d'extraits a été préféré aux autres tests biologiques.

4.1.1 Effet du rapport massique solide/liquide et de la durée d'extraction

a) Matériel et méthode

L'échantillon de terre, contaminé conjointement par des polluants organiques et métalliques (chapitre 3), a été soumis à une série d'extractions par lixiviation réalisées avec de l'eau ultra pure (Elga, 18 mΩ).

Trois rapports massiques solide/liquide ont été envisagés : le rapport 1/10, le rapport 1/5 et le rapport pâte saturée (l'eau est ajoutée jusqu'à ce qu'elle imbibe complètement l'échantillon de terre et qu'une fine pellicule d'eau apparaisse en surface). Pour chaque

rapport massique considéré, l'échantillon de terre contaminé (environ 1,6 kg) est homogénéisé manuellement par quartages successifs avant d'être séparé en 4 lots de 400 g. Chaque lot correspond aux durées de lixiviation expérimentées, à savoir : 2 minutes, 30 minutes, 2 heures et 24 heures. Chaque lot est de nouveau divisé en 4 : un échantillon de 100 g est conservé pour analyse du contenu en polluants (tableau 14) et les 300 g restants sont utilisés pour les 3 répétitions. La figure 13 explicite le protocole expérimental.

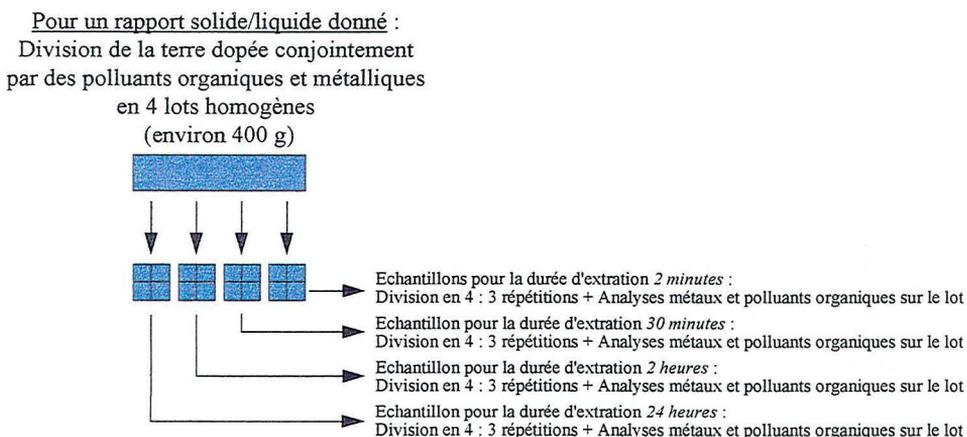


Figure 13. Préparation des lots de terre pour les différentes lixiviations

Après lixiviation, les suspensions de sol ont été centrifugées (2000 tours.min⁻¹ pendant 10 minutes), filtrées à 0,45µm conformément aux recommandations de la norme AFNOR X31-210 (1992). Les extraits obtenus ont été analysés par HPLC et par émission atomique après atomisation à la flamme (tableau 14).

	Analyse des lixiviats	Analyse des lots de terre contaminée
Polluants métalliques	Emission atomique	Minéralisation acide (eau régale) Emission atomique
Polluants organiques	HPLC (détection UV et Fluo)	Extraction Soxhlet (110 °C, au Dichlorométhane /Hexane, 50/50, v/v) HPLC (détection UV et Fluo)

Tableau 14. Techniques de détection et de quantification utilisées sur les lixiviats et les échantillons de terre contaminée

Finalement, la toxicité des extraits obtenus a été évaluée sur la réunion des différentes répétitions, par le test de toxicité Microtox[®] en phase liquide, réalisé suivant la norme NFT 90-320 (1991).

b) Résultats

➤ Rendements d'extractions obtenus après lixiviation de la terre contaminée conjointement par des polluants organiques et minéraux

Les concentrations des polluants dans les extraits ont été quantifiées (tableau 15). Il apparaît que le rapport massique pâte saturée permet d'obtenir des lixiviats plus concentrés pour les polluants les plus solubles comme le chrome et le 2,4,6 trichlorophénol. Ainsi, par exemple, la concentration en chrome dans l'extrait pâte saturée est 5 fois plus importante que celle de l'extrait obtenu avec un rapport massique solide/liquide 1/10. Pour les polluants à solubilité limitée comme le plomb et le phénanthrène, les concentrations sont identiques,

quels que soient les paramètres de la lixiviation (0.3 à 0.4 mg/l pour le plomb, et proche du seuil de détection pour le phénanthrène soit 0.01 mg/l).

Rapport massique	Polluant	Durée d'extraction			
		2 minutes	30 minutes	2 heures	24 heures
Rapport pâte saturée	Plomb	0,3 ± 0,05	0,4 ± 0,03	0,4 ± 0,05	0,4 ± 0,06
	Chrome	16,3 ± 1,3	15,6 ± 1,2	17 ± 1,5	16 ± 0,1
	Trichlorophénol	0,4 ± 0,3	0,8 ± 0,04	0,9 ± 0,02	0,8 ± 0,1
	Phénanthrène	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Rapport 1/5	Plomb	0,5 ± 0,05	0,2 ± 0,03	0,5 ± 0,05	0,45 ± 0,00
	Chrome	7,7 ± 1,45	1,9 ± 0,3*	6,6 ± 0,66	7,9 ± 0,6
	Trichlorophénol	0,2 ± 0,07	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,05	0,3 ± 0,04
	Phénanthrène	< 0.01	< 0.01	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,02
Rapport 1/10	Plomb	0,4 ± 0,02	0,4 ± 0,01	0,45 ± 0,02	0,45 ± 0,01
	Chrome	3,4 ± 0,1	3,7 ± 0,07	4,2 ± 0,1	4,3 ± 0,1
	Trichlorophénol	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,03	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,02
	Phénanthrène	< 0.01	< 0.01	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00

* : la valeur observée pour le Chrome, lors de la lixiviation avec le rapport 1/5, sur une durée de 30 minutes est beaucoup plus faible que celles observées après 2 minutes, 2 ou 24 heures. Cette valeur est due à une concentration plus faible dans l'échantillon de terre soumis à l'extraction

Tableau 15. Concentrations des polluants (exprimées en mg/l) dans les lixiviats en fonction de la durée d'extraction et du rapport massique solide/liquide (moyenne ± écart type)

Afin de connaître l'efficacité des différentes méthodes d'extraction testées, les concentrations mesurées dans les extraits doivent être rapportées aux quantités initialement présentes dans les échantillons lixiviés. L'ajout d'une quantité contrôlée de polluants organiques et métalliques permet cette comparaison grâce au calcul de rendements d'extraction. Ceux-ci sont calculés en rapportant la quantité de polluant présente dans le lixiviat à la quantité totale dans la terre contaminée d'après la formule :

$$\%rdt = 100 \times \frac{[\text{polluant}]_{\text{eau}}}{[\text{polluant}]_{\text{sol}}}$$

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 16.

Rapport massique	Polluant	Durée d'extraction			
		2 minutes	30 minutes	2 heures	24 heures
Rapport pâte saturée	Plomb	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00
	Chrome	5,9 ± 0,7	4,7 ± 0,4	5,3 ± 0,6	8,8 ± 1,3
	Trichlorophénol	0,2 ± 0,00	0,3 ± 0,02	0,9 ± 0,05	0,2 ± 0,05
	Phénanthrène	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Rapport 1/5	Plomb	0,5 ± 0,01	0,7 ± 0,00	0,6 ± 0,08	0,5 ± 0,04
	Chrome	35,8 ± 6,5	33,9 ± 0,00*	34,5 ± 3,1	47,2 ± 5,5
	Trichlorophénol	1,9 ± 0,6	0,7 ± 0,00	1,1 ± 1	4,5 ± 1,03
	Phénanthrène	< 0.01	< 0.01	0,04 ± 0,04	0,09 ± 0,04
Rapport 1/10	Plomb	1,1 ± 0,06	1 ± 0,04	1,5 ± 0,08	0,9 ± 0,02
	Chrome	36,8 ± 0,1	38,6 ± 1	80 ± 1,3	43 ± 1,2
	Trichlorophénol	3,6 ± 0,15	3,6 ± 0,9	5 ± 0,6	6,2 ± 0,5
	Phénanthrène	< 0.01	< 0.01	0,2 ± 0,05	0,3 ± 0,05

* : lors du calcul du rendement d'extraction, la concentration dans l'extrait est rapportée à celle initialement présente dans l'échantillon. Les rendements obtenus pour les différentes durées de lixiviation sont alors comparables.

Tableau 16. Rendements d'extraction (exprimés en %) obtenus pour les polluants en fonction des durées d'extraction et des rapports massiques solide/liquide utilisés (moyenne ± écart type)

L'examen des résultats obtenus pour chaque catégorie de polluants (minéral et organique) met en évidence, indépendamment du rapport massique et de la durée d'extraction :

- la plus forte extraction du chrome par rapport au plomb (rendement d'extraction de l'ordre de 80% pour le chrome après 2 heures de contact, dans le cas d'un rapport 1/10 contre seulement 1,5% pour le plomb),
- la plus forte extraction du trichlorophénol par rapport au phénanthrène (rendement d'extraction de l'ordre de 5% pour le trichlorophénol après 2 heures de contact, dans le cas d'un rapport 1/10 contre seulement 0,21% pour le phénanthrène).

L'influence de la durée de lixiviation et du rapport solide/liquide a été décomposée par analyse de variance à 2 facteurs (tableau 17) afin de déterminer le ou les facteurs influant sur l'étape d'extraction.

	Durée d'extraction	Rapport massique solide/liquide
Chrome	S (p = 0,0265)	H.S (p = 0,000)
Plomb	N.S (p = 0,056)	H.S (p = 0,000)
2,4,6 Trichlorophénol	S (p = 0,015)	H.S (p = 0,000)
Phénanthrène	T.S (p = 0,015)	T.S (p = 0,002)

N.S : Non Significatif (p > 0,05)
 S : Significatif (0,01 < p < 0,05)
 T.S : Très Significatif (0,001 < p < 0,01)
 H.S : Hautement significatif (p < 0,001)

Tableau 17. Analyse de variance à 2 facteurs (durée d'extraction et rapport massique) sur les rendements d'extraction des polluants (chrome, plomb, 2,4,6 trichlorophénol et phénanthrène)

Quel que soit le polluant et la durée d'extraction, le rapport massique solide/eau est un facteur influant sur le rendement d'extraction (seuil de signification systématiquement inférieur à 0.001). L'examen des différents rapports massiques solide/liquide entre eux montre que le rapport 1/10 est celui qui permet les meilleurs rendements d'extraction, quel que soit le polluant concerné (dans le cas des contaminants étudiés).

En ce qui concerne les durées d'extraction, l'importance diffère suivant les polluants. Ainsi pour le plomb, le facteur n'est pas significatif, alors que pour le phénanthrène, celui-ci est très significatif.

➤ *Mesure de la toxicité des extraits*

La mesure de la toxicité (exprimée en Ut), étudiée à l'aide du test Microtox® en phase liquide sur les différents extraits filtrés à 0,45µm (issus de la réunion des 3 différentes répétitions) est présentée en figure 14 (sur cette figure, les écarts types ne peuvent être présentés puisque les valeurs obtenues correspondent à la réunion des 3 lixiviats obtenus).

La toxicité est beaucoup plus importante pour le rapport "pâte saturée" (de l'ordre de 4 Ut) et se manifeste dès 2 minutes d'extraction. La toxicité exprimée dans ce type d'extrait est identique quelle que soit la durée de l'extraction. Pour les autres rapports (1/5 et 1/10), cette toxicité est moitié moins importante et ne se révèle qu'après 30 minutes d'extraction pour le rapport 1/5 et seulement après 24 h pour le rapport 1/10.

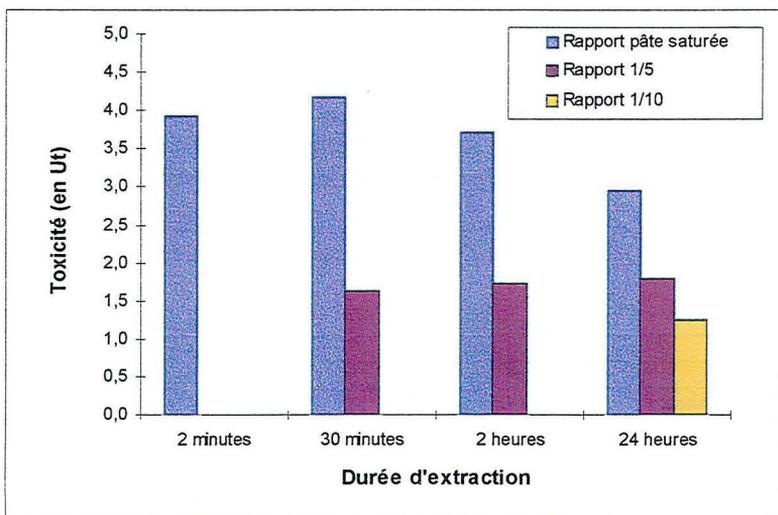


Figure 14. Toxicité des extraits (exprimée en Ut) mesurée par le test Microtox[®] en fonction de la durée d'extraction et des rapports massiques solide/liquide utilisés

4.1.2 Effets de la filtration des lixiviats aqueux et de la nature du solvant de lixiviation

La comparaison des rendements d'extraction (sur des bases analytiques) des différents polluants a été réalisée sur l'échantillon de terre contaminé conjointement par des polluants organiques et métalliques. Pour les expériences suivantes, le but est de mettre en évidence les effets de l'étape de filtration et de la nature du solvant d'extraction, sur la mobilité des polluants et leur toxicité. La filtration et la nature du solvant pouvant avoir des impacts différents suivant la nature des polluants en présence, l'utilisation de 2 échantillons contaminés soit par des polluants organiques (Bouzule + organiques) soit par des polluants métalliques (Bouzule + métaux) a été préférée à une contamination conjointe. Cette contamination séparée permet de caractériser le comportement des polluants et leur toxicité individuellement, sans interactions.

a) Matériel et méthodes

Les lixiviations ont été réalisées sur les échantillons de terre contaminés soit par des polluants organiques (Bouzule + organiques) soit par des polluants métalliques (Bouzule + métaux). La toxicité des différents lixiviats a été évaluée à l'aide du test Microtox[®] en phase liquide.

⇒ Pour l'étude des effets de la filtration sur l'expression de la toxicité, les lixiviats ont été obtenus avec un rapport massique 1/10, après 24 h d'agitation. Le surnageant a été récupéré par filtration à 0,45 µm (AFNOR X31-210), ou après décantation pendant une nuit (soit environ 12h, à 20°C ± 2).

⇒ Pour l'étude des effets de la nature du solvant d'extraction sur la mobilité des polluants, 2 solvants ont été utilisés : un tampon phosphate à pH =5 (favorisant la mobilité des polluants ionisables) et du méthanol (favorisant la mobilité des polluants organiques) (Prolabo, pureté 95%). Ces deux lixiviations complémentaires ont été conduites en conservant le rapport massique solide/liquide égal à 1/10 mais en limitant la durée à 2h, ce, sans utiliser la filtration, mais la décantation (pendant 12 h).

b) Comparaison des méthodes de séparation des extraits¹ (filtration/décantation)

La toxicité des différents extraits obtenus après filtration à 0,45µm ou décantation est présentée en figure 15. A titre de comparaison, une lixiviation d'une durée de 2h a également été réalisée (dans les mêmes conditions : 1/10, avec décantation).

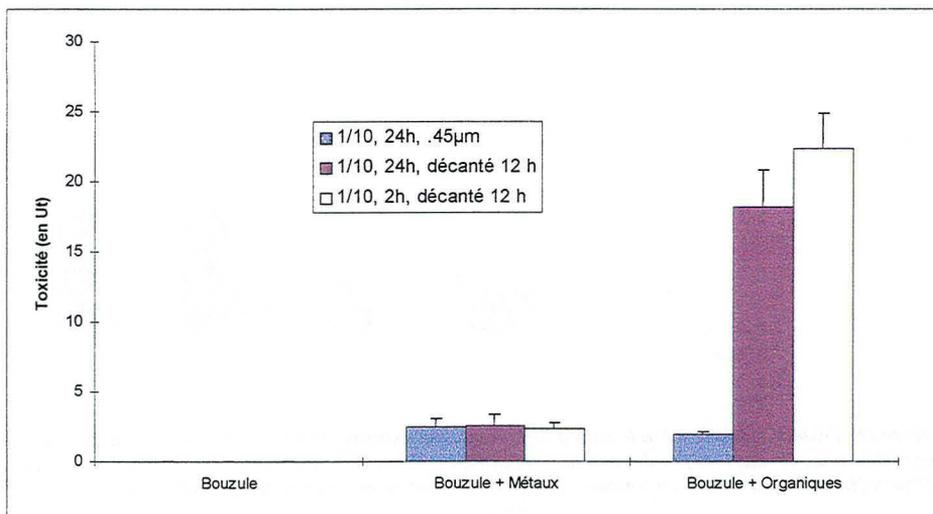


Figure 15. Toxicité, évaluée à l'aide du test Microtox[®], des extraits obtenus à partir des échantillons de terre sans dopage (Bouzule), contaminés par des polluants organiques (Bouzule + organiques) ou par des polluants métalliques (Bouzule + métaux), en fonction du type de séparation (filtration à 0,45µm ou décantation 12 h)

Aucune toxicité n'est détectée sur l'échantillon de terre agricole, non contaminé (Bouzule), quel que soit le protocole employé.

La comparaison des résultats obtenus après 24 h d'extraction montre que la filtration peut modifier l'expression de la toxicité. Ainsi, bien que sur l'échantillon de terre contaminée par des polluants métalliques, aucune différence entre les deux traitements n'apparaisse, la filtration divise d'un facteur dix la toxicité mesurée sur l'échantillon de terre contaminée par des polluants organiques (19 Ut pour la décantation contre 2 Ut pour la filtration).

Les lixiviations 2h confirment ce qui a été observé lors des essais précédents : la lixiviation de 24h pourrait, sur la base de ces essais, être ramenée à une durée de 2h, pour la mesure de la toxicité.

¹ Pour cette étude, l'impact de la centrifugation sur l'expression de la toxicité n'a pas été réalisée.

c) *Effet de la nature du solvant*

Les lixiviations complémentaires, réalisées à l'aide d'un tampon phosphate (pH = 5) et de méthanol, ont été comparées aux performances des lixiviations classiques à l'eau pour lesquelles trois protocoles ont été utilisés (maintien du rapport massique à 1/10 mais durée de lixiviation de 2 ou 24 h et filtration ou non à 0,45µm). Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 16.

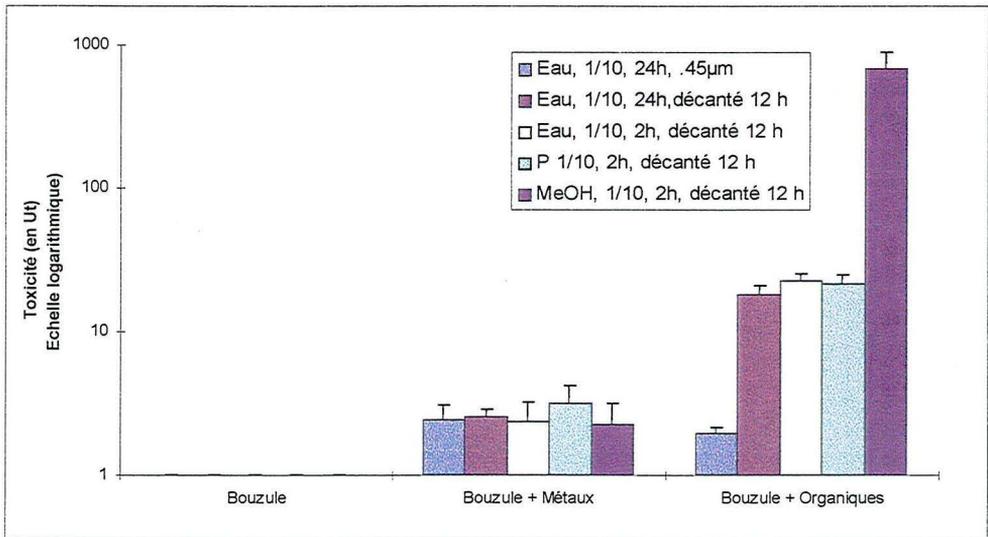


Figure 16. Toxicité, évaluée à l'aide du test *Microtox*[®], des extraits obtenus à échantillons de terre sans dopage (Bouzule), contaminés par des polluants organiques (Bouzule + organiques) ou par des polluants métalliques (Bouzule + métaux), en fonction du type de solvant employé (eau, tampon phosphate à pH 5 et méthanol)

Aucune toxicité n'est détectée sur l'échantillon de terre non contaminé, quel que soit le solvant employé.

Les différentes lixiviations à l'eau permettent de nouveau de souligner l'impact de la filtration pour les polluants organiques (Bouzule + Organiques) pour lesquels la toxicité entre le lixivié 24h filtré et décanté est diminuée d'un facteur 10. De plus, l'égalité des réponses constatées sur les lixiviations non filtrées 2h et 24h renforce le fait que ces deux durées pourraient être employées indifféremment pour la mesure de la toxicité.

La comparaison des lixiviations complémentaires (tampon phosphate et méthanol) avec les lixiviations à l'eau, met en évidence :

- ⇒ sur l'échantillon de terre contaminé par des polluants métalliques, la très faible toxicité détectée, même par l'emploi du tampon phosphate à pH 5. Sur cet échantillon, l'extraction au méthanol n'apporte aucune information complémentaire.
- ⇒ sur l'échantillon de terre contaminé par des polluants organiques, une réponse toxique très importante sur les extraits obtenus avec le méthanol par rapport aux lixiviations à l'eau ou au tampon phosphate (la toxicité détectée de plus de 30 fois

supérieure à celle mesurée pour l'eau).

4.2 Influence du test biologique et de la méthode d'exposition sur la réponse toxique

Pour l'ensemble des essais préalablement réalisés, le test Microtox[®] en phase liquide a été employé comme unique détecteur. Cette partie étudie l'influence du test biologique employé, de la durée d'exposition du test du test Microtox[®] et de la méthode d'exposition, sur l'expression de la toxicité.

4.2.1 Sensibilité des essais biologiques aux polluants extraits

Il s'agit de déterminer la sensibilité relative des tests biologiques, sur les extraits préalablement évalués avec le test Microtox[®] en phase liquide. En complément à ce test, les différents extraits aqueux, méthanoliques et tamponnés à pH 5, obtenus après lixiviation des échantillons de terre contaminée par des métaux (Bouzule + Métaux) et par des polluants organiques (Bouzule + Organiques) ont été évalués à l'aide des tests sur *Daphnia magna* et *Pseudokirchneriella subcapitata*. Les résultats obtenus sont présentés, pour les deux sols artificiellement pollués dans les figures 17 et 18. A titre de comparaison, les résultats obtenus avec le test Microtox[®] en phase liquide sont également renseignés.

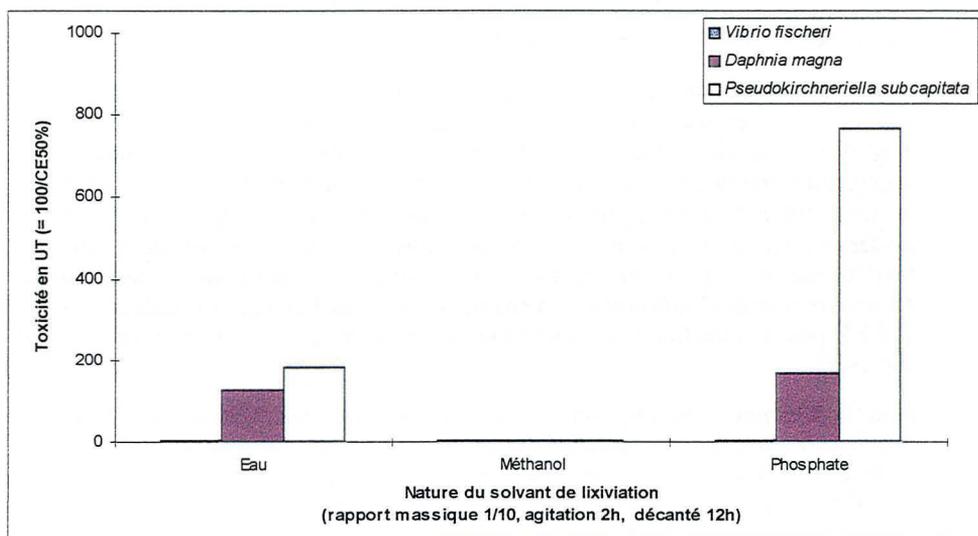


Figure 17. Réponse de 3 tests biologiques de toxicité (*Vibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Daphnia magna*) à différents extraits (eau, méthanol et tampon phosphate à pH 5) obtenus après lixiviation de l'échantillon de terre contaminé par des métaux (Bouzule + métaux)

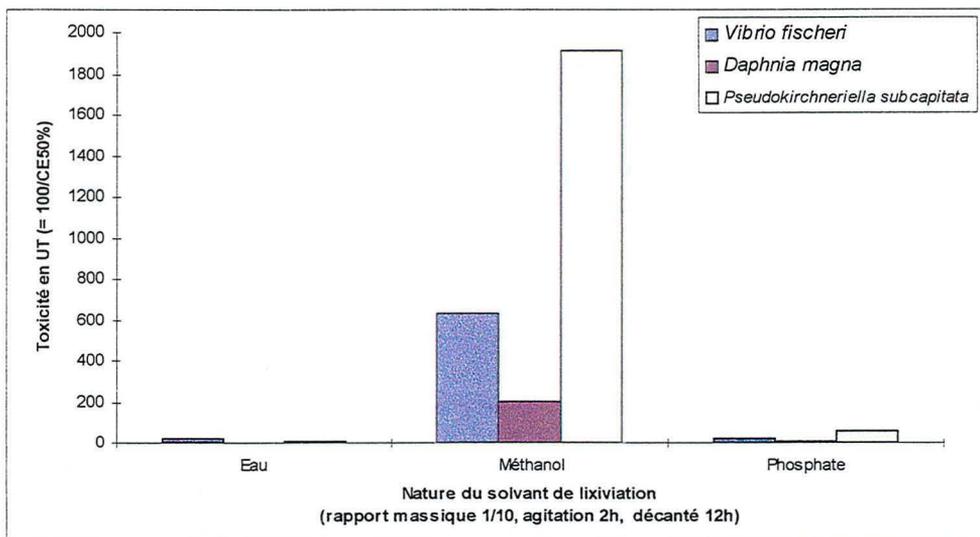


Figure 18. Réponse de 3 tests biologiques de toxicité (*Vibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Daphnia magna*) à différents extraits (eau, méthanol et tampon phosphate à pH 5) obtenus après lixiviation de l'échantillon de terre contaminé par des polluants organiques (Bouzule + organiques)

Les tests biologiques donnent des réponses différentes sur les extraits collectés :

- pour la contamination minérale (figure 17) et sur l'extrait réalisé à l'eau osmosée, le test Microtox® en phase liquide est beaucoup moins sensible que les tests *Daphnia magna* et *Pseudokirchneriella subcapitata* qui présentent des réponses plus importantes (moins de 5 Ut pour le test Microtox® contre environ 150 à 180 Ut pour les deux autres tests biologiques). De plus, contrairement à ce qui avait été mis en évidence pour le test Microtox®, l'extrait réalisé au tampon phosphate génère une toxicité plus importante pour les essais sur *Daphnia magna* et sur algues unicellulaires *Pseudokirchneriella subcapitata* comparativement à la lixiviation classique (plus de 700 UT pour l'extraction phosphate contre environ 180 UT pour la lixiviation à l'eau osmosée).
- pour la contamination organique (figure 18) et quel que soit le test biologique employé, la toxicité détectée dans l'extrait réalisé au méthanol est plus importante que celle mesurée dans le lixiviat obtenu à l'eau ou au tampon phosphate à pH 5 (pour le test Microtox, la toxicité est ainsi multipliée par 30 et par plus de 200 pour le test *Pseudokirchneriella subcapitata*).

La faible réponse du test Microtox®, observée quels que soient les extraits de l'échantillon contaminé par des éléments traces métalliques, pourrait être en partie due à une durée d'exposition trop courte (ici 30 minutes). En effet, lors des essais sur les lixiviats du sol de la Bouzule, contaminé par des polluants métalliques, la toxicité mesurée à l'aide du test Microtox®, augmentait significativement avec la durée d'exposition (figure 19), passant d'environ 1 UT après 5 minutes à environ 4 Ut après 60 minutes.

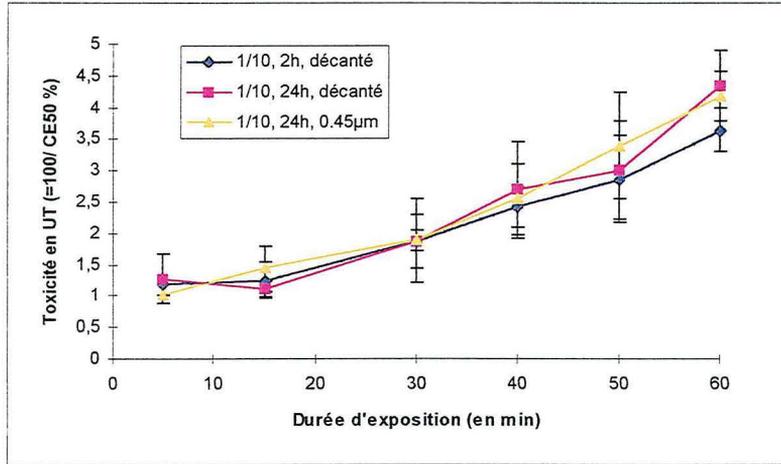


Figure 19. Evolution de la toxicité du lixiviat issu de la terre de la Bouzule contaminée par des métaux en fonction de la durée d'exposition (Test Microtox®)

4.2.2 Réaction du test Microtox® lors de l'exposition à des éléments traces métalliques

Afin de confirmer ces premières observations, la réponse du test Microtox® en présence de polluants métalliques a été étudiée. Le test a donc été réalisé sur des solutions pures de dichromate de potassium (Prolabo, 98%) ou d'acétate de plomb (Aldrich, 99%). Ces solutions sont testées selon le protocole Microtox® (Norme AFNOR T90-320) mais la lecture du test a été poursuivie jusqu'à une heure d'exposition. L'évolution de la toxicité en fonction de la durée de contact est ainsi suivie après 5, 15, 30, 40, 50 et 60 minutes pour ces 2 métaux. Les figures 20 et 21 présentent ce suivi pour le plomb et le chrome.

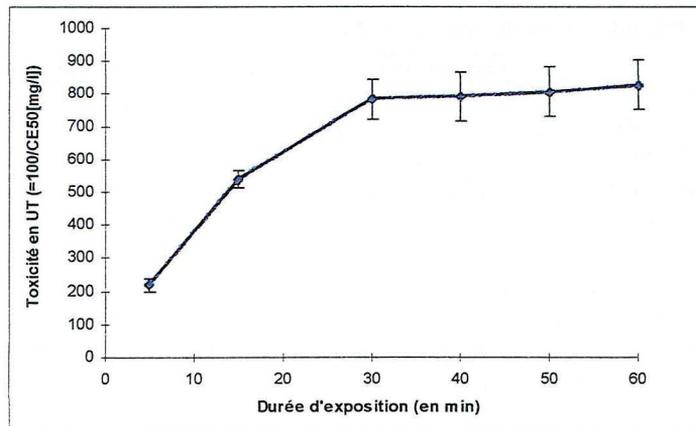


Figure 20. Evolution de la toxicité du Plomb (sous forme d'acétate de plomb) en fonction de la durée d'exposition (Test Microtox®)

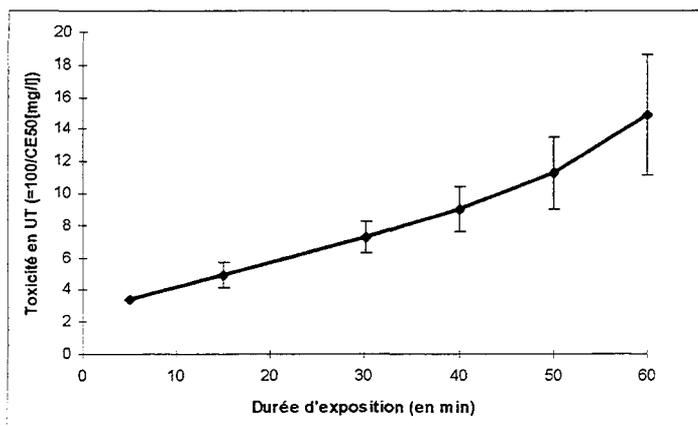


Figure 21. Evolution de la toxicité du Chrome (sous forme de dichromate de potassium) en fonction de la durée d'exposition (Test Microtox®)

L'examen de ces résultats met en évidence une augmentation de la toxicité avec la durée d'exposition. La différence de toxicité observée entre la durée 15 min. et 60 min. peut être très importante, allant d'un facteur 1,5 à 4, respectivement pour le Plomb et le Chrome. La forme et l'intensité de la réponse aux deux métaux sont différentes : pour le chrome, la toxicité observée est faible (moins de 20 Ut après 60 minutes) et celle-ci continue à croître ; pour le plomb, un plateau est rapidement atteint après 30 minutes d'exposition, la toxicité alors mesurée étant de l'ordre de 700 à 800 Ut.

4.2.3 Effet de la méthode d'exposition

Le test Microtox® en phase solide a été réalisé sur les suspensions de terre des échantillons contaminés et, à titre de témoin, sur la terre agricole, supposée non contaminée. Les résultats sont présentés en Unités toxiques et par rapport au témoin Bouzule, (facteur d'amplification de la toxicité par rapport au témoin) dans le tableau 18.

	Toxicité (en Ut)	Facteur d'amplification de la toxicité
Bouzule	45 ± 2,7	-
Bouzule + Métaux	130 ± 24,4	3
Bouzule + Organiques	3295 ± 1052	72

Tableau 18. Réponse du test Microtox® en phase solide aux échantillons de terre de la Bouzule, et aux échantillons contaminés par des polluants organiques (Bouzule + Organiques) ou minéraux (Bouzule + Métaux)

La toxicité est respectivement multipliée par un facteur 3 et 72 pour la terre de la Bouzule contaminée par des métaux et celle contaminée par des polluants organiques, comparativement à la terre de la Bouzule, employée comme témoin (cet échantillon témoin présente néanmoins un réponse toxique).

L'utilisation du même organisme (*Vibrio fischeri*) avec deux méthodes d'exposition différentes permet de mieux comparer les réponses, à condition d'adopter une unité commune. La comparaison des protocoles Microtox® solide et liquide peut être réalisée en adoptant comme unité "la quantité de terre à ajouter dans 1 litre d'eau pour générer une CE₅₀". Cette quantité peut facilement être calculée pour l'essai en phase solide. De même,

elle peut l'être pour l'exposition indirecte en estimant que le lixiviat (non filtré) est constitué d'une fraction liquide et d'une fraction solide. Le rapport solide/liquide 1/10 étant utilisé, il est alors possible de calculer la quantité de terre présente dans le lixiviat générant la CE₅₀. Le tableau 19 regroupe les quantités (exprimées en g) nécessaires pour générer une EC₅₀ lors de l'exposition directe ou indirecte de *Vibrio fischeri* aux terres contaminées et au témoin Bouzule.

	Microtox® en phase solide	Microtox® en phase liquide
Bouzule	22	> 100
Bouzule + Métaux	7,7	42
Bouzule + Organiques	0,3	4,5

Tableau 19. Masse de terre (exprimée en g de matière sèche) pour chacun des 3 échantillons testés (Bouzule, Bouzule + Métaux, Bouzule + Organiques) nécessaire pour générer une CE₅₀ dans 1 litre d'eau en fonction de la méthode d'exposition (test Microtox® réalisé en phase solide ou sur lixiviat)

La quantité de terre nécessaire à générer une CE₅₀ est 5 à 15 fois supérieure pour l'exposition indirecte à celle de l'exposition directe : le protocole réalisé en phase solide est donc plus sensible que celui réalisé après lixiviation.

4.3 Discussion

Les résultats obtenus sur les terres contaminées au laboratoire démontrent l'impact des conditions de lixiviation et de prétraitement du lixiviat sur la mobilité des polluants et l'expression ultérieure de la toxicité. L'intensité de la réponse toxique est également fonction de la nature du test biologique, de la durée, et du mode d'exposition.

4.3.1 Impact des conditions de lixiviation et de prétraitement de l'échantillon sur la mobilité et la toxicité des polluants

Les différentes conditions de lixiviation étudiées concernent l'impact du rapport massique solide/liquide, de la durée, et de la nature du solvant sur la mobilisation des polluants et l'expression de leur toxicité. De même, la réalisation du test biologique nécessite au préalable la séparation des phases solides et liquides : la décantation pendant 12 h et la filtration ont été étudiées.

a) Impact du rapport massique solide/liquide sur la mobilité et l'expression de la toxicité

Parmi les rapports massiques utilisés, le rapport 1/10 permet la meilleure extraction des polluants : un volume d'eau important solubilise plus de polluants. Cependant, la toxicité enregistrée sur les extraits obtenus avec ce rapport massique est beaucoup plus faible que celle obtenue sur l'extrait pâte saturée. En effet, la toxicité est à relier à la concentration des polluants dans les lixiviats. Ainsi, pour les polluants solubles comme le chrome et le 2,4,6 trichlorophénol, les concentrations les plus importantes, quelles que soit les durées de contact, sont rencontrées pour le rapport massique pâte saturée. Les quantités lixiviées, même faibles par rapport aux quantités disponibles dans l'échantillon, suffisent, compte tenu de la faible dilution, à générer une réponse toxique. Les rapports massiques 1/5 et 1/10, favorisent une meilleure extraction mais diluent l'échantillon, limitant l'expression de la toxicité.

Kördel et Hund (1998), en expérimentant différents rapports massiques solide/liquide (de 1/0,6 à 1/10), concluent que les rapports massiques élevés (jusqu'à 1/2) génèrent des lixiviats plus concentrés et peuvent alors être utilisés pour simuler le scénario réaliste " du pire cas

possible ». Ils préconisent alors le rapport 1/2 pour la lixiviation en vue d'essais biologiques ultérieurs. De même, Dombrowski *et al.* (1996), retiennent le rapport massique 1/1 pour l'analyse de la toxicité afin de maximiser la réponse.

Cependant, les rapports élevés (tels que 1/1 ou 1/2) ne peuvent être retenus dans le contexte d'une méthodologie standardisée. En effet, la variabilité est trop importante en fonction de la composition de l'échantillon (tourbe ou sable) et le volume de lixiviat récupéré trop faible, limitant le nombre de tests biologiques et d'analyses ultérieurement réalisables. Le rapport 1/10 semble alors un bon compromis. Il permet, d'une part, d'extraire plus de polluants, renseignant ainsi sur le relargage à long terme des polluants et, d'autre part, étant déjà utilisé pour l'analyse chimique des déchets, il rend possible l'interprétation de la toxicité par les éléments détectés dans le lixiviat.

b) Impact de la durée de lixiviation sur la mobilité et l'expression de la toxicité

Pour les échantillons étudiés, la durée de lixiviation semble n'avoir qu'un impact limité. Ainsi, les durées de 2h ou de 24h se sont montrées d'une efficacité comparable, tant vis à vis de l'extraction des polluants que de la toxicité. La durée de 2h paraît être suffisante pour saturer le solvant en polluants rendant la durée de 24h accessoire. Une durée longue de lixiviation peut diminuer les rendements d'extraction en favorisant le contact entre le polluant et le sol (Van Guchte et Maas-Diepeveen, 1987) et en modifiant les conditions d'oxydoréduction (par le développement d'une activité biologique, rendant le milieu plus réducteur). Cependant, pour le phénanthrène et concernant l'analyse chimique des lixiviats, les rendements d'extractions sont meilleurs après 24 h de lixiviation. Des durées aussi courtes que 2 ou 30 minutes ne peuvent être retenues dans la perspective d'un protocole normalisable : le rapport entre la durée nécessaire à la lixiviation et celle nécessaire à la manipulation des échantillons (pendant laquelle l'échantillon est susceptible d'être encore en contact avec l'eau) ne doit pas être trop important.

Finalement, les durées d'extraction de 24 h ou 16 h préconisées dans la plupart des protocoles pourraient être remplacées, dans l'objectif d'une caractérisation toxique des lixiviats, par une durée de 2 heures (dans leur étude, Dombrowski *et al.* (1996), préconisent une agitation d'une heure, pour l'étude de la toxicité, après l'avoir comparé à une durée d'agitation de 24 heures).

c) Impact de la nature du solvant de lixiviation sur la mobilité et l'expression de la toxicité

La lixiviation réalisée à l'aide du méthanol, sur l'échantillon de terre contaminé par des micropolluants organiques, s'est montrée plus performante vis à vis de l'expression de la toxicité -quel que soit le test biologique employé-, que les lixiviations à l'eau ou au tampon phosphate. Au contraire, sur l'échantillon contaminé par des éléments traces métalliques, cette lixiviation n'apporte aucune information supplémentaire par rapport aux autres. Le méthanol améliore la solubilisation des molécules organiques peu ou non hydrosolubles comme le phénanthrène et le 2,4,6 trichlorophénol ; il joue le rôle d'un tiers solvant augmentant leur concentration dans le milieu testé et donc la toxicité.

Sur l'échantillon de terre pollué par des métaux, l'extraction à l'aide du tampon phosphate apporte une information complémentaire par rapport à la lixiviation à l'eau décantée (2h ou 24h) pour les tests sur algue et sur microcrustacés. Ce tampon acide (pH 5) permet une meilleure extraction des polluants métalliques et augmente leur concentration dans l'extrait qui est alors plus toxique pour ces organismes.

Ongley *et al.* (1988) et Coté *et al.* (1998) soulignent qu'une part importante de la toxicité des sédiments est due aux fractions liées des molécules et que l'extrait à l'eau est alors insuffisant pour caractériser le danger toxique. Ongley *et al.* (1988) proposent de fractionner la toxicité des sédiments à l'aide d'extractants organiques. Wahle et Kördel (1997) utilisent deux solutions extractantes pour compléter l'extraction à l'eau. Ils emploient une solution de tensioactifs ou d'acides humiques pour extraire les polluants organiques. La première de ces solutions, pour être efficace doit être très concentrée en tensioactifs et dénature la structure du sol. La seconde présente l'intérêt de se rapprocher des conditions in situ par l'emploi d'acides humiques. Néanmoins, elle ne permet d'extraire que les composés très peu solubles (solubilité inférieure à 10 mg/l).

Dans le cadre de cette recherche, les lixiviations réalisées au méthanol et à l'aide d'un tampon phosphate sont d'une réalisation simple et permettent d'améliorer la solubilisation des polluants sans dénaturer l'échantillon, augmentant ainsi leur concentration dans les extraits et la réponse toxique. Ces lixiviations complémentaires, conduites à l'aide de solvants autres que l'eau, signalent la présence de molécules toxiques peu mobiles dans les conditions imposées par la lixiviation classique (à l'eau osmosée). Dans l'environnement, ces molécules sont susceptibles d'être, d'une part, solubilisées en faibles quantités pendant de longues périodes entraînant des risques d'intoxication chronique, et, d'autre part, remobilisées si les conditions de milieu changent (modification du pH, activité bactérienne accrue...). L'extraction à l'aide de solvants organiques ou de solutions tampons indique l'existence d'un potentiel toxique, sans en assurer sa manifestation.

d) Impact de la décantation et de la filtration sur l'expression de la toxicité

La réponse toxique peut être modifiée par la méthode de séparation employée (décantation 12 h ou filtration à 0,45µm). La diminution de la toxicité constatée sur le lixiviat issu de l'échantillon de terre contaminé au laboratoire par des polluants organiques, filtré à 0,45µm, par rapport à celui décanté pendant 12h est à relier à "l'interception" par le filtre des polluants introduits. Les polluants présents (2,4,6 trichlorophénol et phénanthrène), compte tenu de leur solubilité et du coefficient de partage eau/matière carbonée (K_{oc}^1) ont tendance, dans les échantillons terreux, à s'associer aux matières organiques. Lors d'une lixiviation, ces complexes (matière organique-polluants ou colloïdes) peuvent être mis en solution ou en suspension mais compte tenu de leur dimensions, ils sont interceptés par le filtre à 0,45µm, limitant ainsi la toxicité à la fraction hydrosoluble de ces polluants. Lors d'une décantation, le seuil de coupure est moins radical : une partie de ces complexes organiques ne décante pas et reste en solution ou en suspension dans le surnageant. La concentration des polluants lors des essais est donc égale à la fraction hydrosoluble additionnée de celle des complexes. Ces formes complexées, non solubles peuvent interagir avec les organismes testés de deux manières :

- les organismes peuvent ingérer ces complexes, augmentant ainsi leur charge polluante,
- les complexes échangent en permanence les polluants fixés avec le milieu testé, maintenant une charge polluante soluble constante durant le test. Ainsi, l'organisme

¹ Le K_{oc} (coefficient de partage eau-matière carbonée) traduit l'affinité des molécules organiques pour la matière organique. Plus il est élevé et plus les molécules ont tendance à s'associer avec la matière organique. Pour le phénanthrène et le 2,4,6 trichlorophénol, le logarithme de ce coefficient ($\log K_{oc}$) est respectivement égal à 4.1 et 3.03.

testé absorbe les polluants solubles, déplaçant l'équilibre, ce qui favorise la dissolution de polluants liés aux complexes.

Sur l'échantillon de terre contaminé par le chrome et le plomb, les pré-traitements réalisés ne modifient pas la toxicité qui doit être due à un ou des polluants non interceptés par l'étape de filtration. Compte tenu de la faible intensité de la toxicité mesurée (par le test Microtox[®]) et de son profil d'évolution en fonction de la durée de contact (à rapprocher de celui étudié lors des essais avec des solutions pures de dichromate de potassium), le chrome doit être le polluant à l'origine de la toxicité enregistrée. Cette hypothèse est renforcée par les rendements d'extraction obtenus pour ce paramètre.

Les effets de la filtration sur les polluants organiques ont été décrits par Vasseur *et al.* (1996) sur des lixiviats d'échantillon de terre contaminés pour lesquels l'étape de filtration diminuait ou supprimait la réponse génotoxique des tests biologiques (Ames, Mutatox[®] et sur amphibiens). De même, Kördel et Hund (1998), après avoir utilisé différentes méthodes de séparation de la phase solide et du lixiviat (décantation, filtration et centrifugation) concluent que l'échantillon décanté permet d'obtenir les concentrations les plus élevées pour l'ensemble des polluants dosés dans le lixiviat (lindane, pyrène, pentachlorophénol et PCB 52).

e) Conclusion : choix du protocole de lixiviation

En fonction des conditions de lixiviation et du prétraitement du lixiviat, avant la réalisation des tests biologiques, la mobilité et la toxicité des polluants peuvent être modifiées. Le choix entre les différentes conditions de lixiviation va être fixé par un objectif donné. Dans le domaine des matériaux solides contaminés (terres et déchets), deux grands types d'objectifs peuvent être identifiés. Il peut s'agir de caractériser le danger toxique des matériaux dans l'absolu, sans se préoccuper des conditions réelles d'exposition, ou au contraire d'estimer les risques pour la santé, la ressource en eau et les écosystèmes, liés à leur présence dans l'environnement. Dans le premier cas, le classement des matériaux entre eux ou par rapport à un seuil réglementaire pour orienter une décision ultérieure sera réalisé sur la base de protocoles de lixiviation reproductibles et permettant d'intégrer l'ensemble des polluants présents dans le matériau à évaluer. Dans le second cas, il faut se placer dans les conditions les plus réalistes possibles et n'envisager que les phénomènes les plus probables pour simuler le transfert des polluants. Le tableau 20 propose, en fonction de l'objectif retenu, différents choix techniques ainsi que leurs justifications.

	Estimation des risques		Caractérisation du danger	
	Choix retenu	Justification	Choix retenu	Justification
Rapport massique solide/liquide	-Pâte saturée -Rapport 1/1	-Conditions environnementales -Faibles dilutions	-Rapport 1/10	-Volume suffisant pour l'analyse -Extraction maximisée
Durée	En fonction du phénomène reproduit		-2h ou 24 h	-Compatible avec une réponse reproductible - Organisation rationnelle du travail
Solvant	-Eau	-Conditions environnementales	-Eau -Solvants organiques -Solutions tampon	-Exprimer la toxicité potentielle -Détecter la présence de polluants toxiques peu solubles
Filtration	-0,45µm -Variables	-Polluants solubles -Scénario d'exposition	-Pas de filtration -Filtration à 0,45µm	-Exprimer la toxicité potentielle -Détecter la présence de polluants toxiques liés aux particules en suspension -Filtration obligatoire pour la réalisation de certains tests biologiques*

*Certains tests biologiques comme le test d'Ames requièrent obligatoirement une filtration. De même, en fonction de la technologie sélectionnée pour l'exploitation du test, une filtration peut être obligatoire (comptage particulaire pour les tests sur algues par exemple)

Tableau 20. Choix des conditions de lixiviation en fonction de l'objectif identifié

4.3.2 Influence de la nature du test biologique, de la durée et de la méthode d'exposition, sur l'expression de la toxicité

Cette étude sur les échantillons de terre contaminés au laboratoire permet d'évaluer la sensibilité des tests en fonction de l'organisme testé, de la durée et de la méthode d'exposition.

a) Sensibilité des tests biologiques en fonction de l'organisme testé et de la durée d'exposition

Les essais réalisés avec le test Microtox[®] avaient conclu à la faible toxicité du lixiviat du sol contaminé par les éléments traces métalliques alors que les tests *Daphnia magna* et *Pseudokirchneriella subcapitata* démontrent la toxicité importante de ce lixiviat. De même, sur la base du test bactérien, le lixiviat réalisé avec le tampon phosphate n'avait pas démontré de réelle efficacité par rapport au lixiviat à l'eau osmosée, alors que le test sur la croissance des algues unicellulaires montre au contraire une toxicité 4 fois plus importante dans la lixiviat tamponné à pH 5. Concernant la sensibilité relative des tests biologiques, ces essais, réalisés sur un nombre restreint de contaminants et sur des échantillons contaminés au laboratoire ne permettent pas de conclure sur le choix d'un test¹. Au contraire, ils renforcent l'idée de l'emploi d'une batterie de tests pour évaluer la toxicité des polluants.

Cependant, le test sur les algues unicellulaires *Pseudokirchneriella subcapitata* présente une sensibilité plus importante que les deux autres tests biologiques utilisés. Cette meilleure sensibilité s'explique en partie par une durée d'exposition plus longue (3 jours d'exposition contre respectivement 30 minutes et 24 heures pour les tests Microtox[®] et *Daphnia magna*). Concernant le test bactérien Microtox[®], les faibles performances de ce test peuvent être dues à une durée d'exposition trop courte : une toxicité croissante des métaux avec la durée

¹ L'emploi du test Microtox[®] seul est insuffisant puisque sa sensibilité aux éléments métalliques est limitée.

d'exposition a été mise en évidence. Cette propriété, déjà soulignée par différents auteurs (Blaise *et al.*, 1994, Ghosh *et al.* 1996) oblige à poursuivre le test sur un minimum de 30 minutes (et si possible jusqu'à 60 minutes), lors de l'analyse de la toxicité d'un échantillon inconnu. De plus, si la toxicité augmente durant le test de façon significative, la présence de métaux peut être soupçonnée dans l'échantillon.

b) Sensibilité des tests biologiques en fonction de la méthode d'exposition

La comparaison des méthodes d'exposition directe et indirecte a été appréciée à travers l'utilisation du test Microtox[®] applicable à la fois en phase solide et liquide. La réalisation du test, dans sa version directe permet une meilleure sensibilité par rapport à la réponse obtenue après extraction. En reprenant l'idée de Gunkel *et al.* (1993) suivant laquelle les polluants, même liés aux molécules constitutives des échantillons, restent actifs (et peuvent générer un effet toxique), la concentration en polluants potentiellement toxiques est donc plus élevée dans les suspensions réalisées lors de l'exposition directe que lors des essais réalisés après lixiviation. Ce test reste cependant à valider et à discuter sur une gamme plus large d'échantillons (voir chapitre 5.2.4 et 5.3).

c) Conclusion : identification de la nature des polluants, en fonction des réponses toxiques obtenues

La contamination des matrices au laboratoire, réalisée pour maîtriser la nature et la quantité des polluants introduits, permet de définir le type de réponse à rechercher pour identifier la nature des polluants responsables de la toxicité mesurée. En effet, la connaissance des polluants amendés et la comparaison des réponses des tests biologiques sur les différents extraits obtenus permet de connaître le profil à rechercher pour identifier la nature des polluants :

- ⇒ pour l'échantillon de terre contaminé par des métaux (Pb et Cr), les extraits aqueux sont toxiques et ce, d'autant plus que le pH diminue (utilisation du tampon phosphate) alors que les extraits organiques ne le sont pas. Ce type de réponse est en cohérence avec la présence de polluants métalliques, efficacement solubilisés par l'eau, et ce, d'autant mieux que le pH est bas. Dans ce cas, les tests les plus sensibles sont par ordre décroissant, le test *Pseudokirchneriella subcapitata*, le test *Daphnia magna* et le test Microtox[®]. Pour ce dernier test, le suivi de la toxicité en fonction de la durée d'exposition peut également révéler la nature métallique des polluants.
- ⇒ pour l'échantillon de terre contaminé par des polluants organiques (trichlorophénol et phénanthrène), la réponse toxique des extraits aqueux est inférieure à celle des extraits réalisés avec du méthanol. Ce type de réponse est cohérente avec la présence de polluants organiques, plus efficacement solubilisés dans un solvant organique (méthanol) que dans l'eau. Dans ce cas, les tests les plus sensibles sont les tests Microtox[®] et Algue.

L'utilisation de différents extractants et de tests biologiques peut permettre d'identifier la nature des polluants responsables de la toxicité mesurée. Le tableau 21 regroupe les profils des réponses à rechercher.

Polluants	Toxicité mesurée	
	Toxicité dans les extraits	Tests biologiques les plus sensibles
Polluants métalliques	Eau et Eau acidifiée > Organiques Eau acidifiée > Eau	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> et <i>D. magna</i> Augmentation de la toxicité avec la durée d'exposition (test Microtox [®])
Polluants organiques	Organique > Eau > Eau acidifiée	Microtox [®] et <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>

Tableau 21. Profil de réponses à rechercher pour identifier la nature des polluants responsables de la toxicité mesurée

4.4 Conclusion

Sur la base des essais réalisés sur des terres contaminées au laboratoire, les protocoles de lixiviation utilisés et le pré-traitement du lixiviat avant la conduite du test biologique jouent un rôle sur la mobilité des polluants et l'expression de leur toxicité. De même, le choix du test utilisé comme détecteur toxique peut modifier l'amplitude de la réponse enregistrée.

L'utilisation couplée de ces deux outils permet de définir un premier protocole de caractérisation du danger lié aux matrices contaminées. Ce protocole permettant la caractérisation du danger écotoxique repose sur une étape de lixiviation couplée à une étape de test biologique (figure 22). Il permet de caractériser la toxicité liée aux fractions solubles mais également la toxicité potentielle des molécules moins solubles ou liées aux matières en suspension. De plus, la comparaison des réponses des tests biologiques en fonction de la nature de l'extrait permet également de soupçonner la nature des polluants responsables de la toxicité.

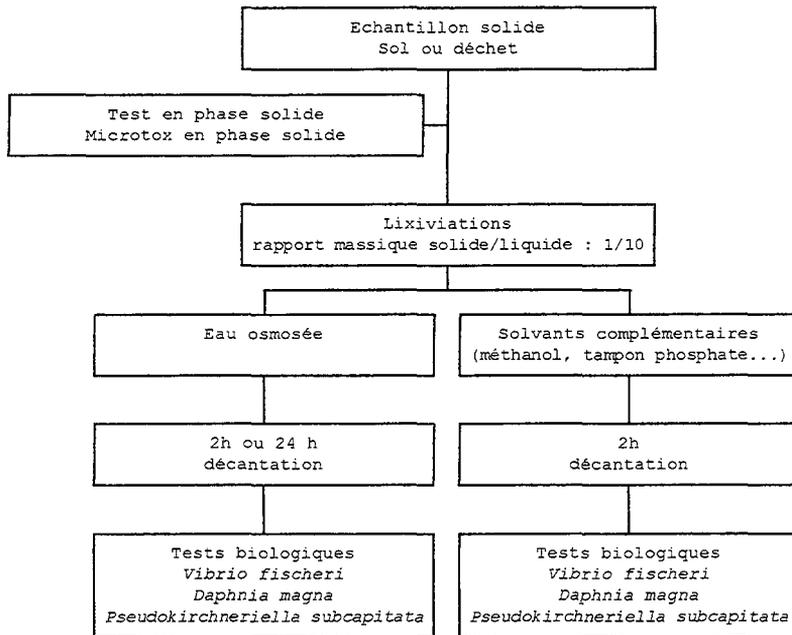


Figure 22. Proposition d'un protocole de caractérisation du danger toxique lié aux matrices solides contaminées

Les lixiviations choisies doivent permettre d'évaluer la toxicité de ces matrices et d'obtenir des informations quant à leur contenu toxique. Le choix d'un rapport massique solide/liquide de 1/10, d'une durée d'extraction de 2 h (ou 24h) et d'une décantation a été réalisé. De même, la connaissance de l'ensemble des molécules à effet toxique étant recherchée, l'emploi de différents extractants a été conservé. La batterie de tests biologiques définie et le test Microtox[®] en phase solide ont été intégrés dans le protocole car ils permettent l'étude de différents effets toxiques à différents niveaux d'organisation. Il conviendrait également d'ajouter à cette batterie un test de génotoxicité permettant de détecter des effets sur le génome comme le test Mutatox[®].

Le protocole proposé est issu des résultats obtenus sur des sols contaminés au laboratoire par un nombre limité de polluants. Il est nécessaire d'éprouver ce protocole sur des matériaux solides industriels contaminés (déchets de production industrielle ou terres issues de sites contaminés).

V. Mobilité et toxicité des polluants dans les échantillons de terre et de déchets contaminés

5. Mobilité et toxicité des polluants dans les échantillons de terre et de déchets contaminés

L'objectif est de décrire et de comprendre le comportement des polluants dans les matrices solides industrielles prélevées, en vue d'estimer leur devenir et la toxicité qu'ils pourraient générer. Dans un premier temps, l'utilisation du protocole précédemment défini sur les échantillons de terre et de déchets industriels doit permettre sa validation tout en précisant son intérêt et ses limites. Dans un second temps, les résultats dégagés doivent également pouvoir être utilisés pour caractériser le danger des matériaux et prévoir le comportement à long terme des polluants (préciser leur mobilité, estimer leur relargage..) et ainsi, le devenir de la toxicité.

5.1 Matériel et méthodes

La caractérisation de la mobilité et de la toxicité des polluants a été réalisée sur les échantillons de terre et les déchets industriels échantillonnés (S1 et S2, D1 et D2). En complément à la batterie de tests biologiques précédemment employés, les tests Mutatox[®] et MetPLATE[®]/MetPAD[®] ont également été utilisés. De même, d'autres protocoles d'extraction ont été expérimentés.

5.1.1 Description du test MetPLATE[®]/MetPAD[®]

MetPLATE[®] est un biotest quantitatif (développé à la suite du test qualitatif MetPAD[®]) permettant d'évaluer la biodisponibilité des éléments traces métalliques dans des échantillons liquides et solides (Bitton *et al.*, 1994 et Bitton *et al.* 1996, Boularbah *et al.*, 1996). Il est basé sur l'inhibition spécifique par les métaux lourds de l'activité β -galactosidase chez une souche mutante de *E. coli*.

L'échantillon testé est incubé (1g d'échantillon pour 1ml d'eau) pendant 2h à 35°C avec une suspension de bactéries avant l'ajout d'un substrat coloré spécifique de l'activité β -galactosidase (le CPRG, de couleur jaune). Suite à cette addition, une nouvelle incubation pendant 1 à 2 h (suivant le développement de la couleur) débute. Les échantillons sont ensuite filtrés et la solution de l'échantillon est récupérée avant lecture de la couleur par densité optique (à 575 nm) : si l'enzyme n'est pas inhibée par la présence de métaux, le réactif vire au rouge violacé ; sinon, il reste jaune. Il est alors possible de déterminer, pour un échantillon, un % d'inhibition de l'activité β -galactosidase. Contrairement au test Microtox[®] en phase solide, le test MetPLATE[®]/MetPAD[®] est spécifique des éléments en traces métalliques. Il dispose d'une série de blancs rendant possible la quantification de l'activité β -galactosidase intrinsèque de l'échantillon et de l'adsorption des composés colorants (initiaux ou dégradés) sur les constituants de l'échantillon testé (argiles, matières organiques..).

5.1.2 Les protocoles de lixiviation et d'extraction

Pour l'exécution du protocole de caractérisation défini précédemment, les lixiviations à l'eau ultra-pure (Elga, 18 m Ω), au tampon phosphate (pH = 5) et au méthanol ont été réalisées. En plus de ces lixiviations, un tampon borate tamponné à pH 9 a également été

¹ Les kits ont été gracieusement offerts par le groupe « 206 Technologies », Gainesville, FL, USA.

utilisé pour étudier le comportement des polluants à pH basique. Cet extractant est employé lors de l'analyse des complexes organo-minéraux des sols pour extraire les molécules organiques mobilisables (Bruckert, 1979).

Concernant la lixiviation à l'eau ultra-pure 2 protocoles ont été employés : le protocole normalisé (24h d'agitation avec une filtration à 0,45µm) et le protocole précédemment établi (2h d'agitation avec décantation 12h).

D'autres techniques plus agressives comme les extractions Soxhlet ou par CO₂ supercritique ont été utilisées pour mettre en évidence la toxicité liée aux fractions organiques moins extractibles à l'eau. Les protocoles, décrits ci après ont été suivis :

- extraction à chaud (à 110°C), pendant 12h, avec un mélange 50/50 (v/v) de dichlorométhane/hexane (respectivement Carlo Erba et Promochen, pureté analytique), avec un extracteur Soxhlet en verre. L'extrait est ensuite évaporé à sec et repris dans du méthanol,
- extraction avec du CO₂ supercritique : le CO₂ à l'état supercritique extrait et relargue les polluants du sol sur un piège, lequel est ensuite rincé avec du méthanol. L'extracteur par fluide supercritique est de type HP 7680 T. Les conditions d'extractions ont été fixées d'après les travaux de Rodriguez (1996).

L'extraction Soxhlet et la lixiviation au méthanol ont été réalisées pour l'ensemble des matrices et évaluées avec l'ensemble des biotests. Seules les terres contaminées (S1 et S2) ont été évaluées par l'extraction par fluide supercritique (SFE). De même, compte tenu du faible volume généré par l'extraction SFE (entre 5 et 7 ml), seul le test *Vibrio fischeri* a été réalisé. Tous ces extraits, indépendamment des techniques d'extractions employées, sont toujours récupérés dans du méthanol.

Les protocoles utilisés ainsi que les tests biologiques pratiqués sur les extraits sont regroupés dans le tableau 22.

	Solvant	Conditions d'extraction	Tests biologiques de toxicité sur les extraits
Extractions Par lixiviation	Eau ultra-pure	Rapport solide /liquide : 1/10 Durée de contact : 24 h Filtration : 0,45µm	<i>Vibrio fischeri</i> <i>Daphnia magna</i> <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>
	Eau ultra-pure	Rapport solide /liquide : 1/10 Durée de contact : 2h Décantation 12 h	<i>Vibrio fischeri</i> et <i>Vibrio fischeri</i> M 169 <i>Daphnia magna</i> <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>
	Eau acide Tampon phosphate (pH = 5)	Rapport solide /liquide : 1/10 Durée de contact : 2h Décantation 12 h	<i>Vibrio fischeri</i> <i>Daphnia magna</i> <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>
	Eau alcaline Tampon borate (pH = 9)	Rapport solide /liquide : 1/10 Durée de contact : 2h Décantation 12 h	<i>Vibrio fischeri</i> <i>Daphnia magna</i> <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>
	Méthanol	Rapport solide /liquide : 1/10 Durée de contact : 2h Décantation 12 h	<i>Vibrio fischeri</i> <i>Daphnia magna</i> <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>
Extractions Agressives	DCM/HEX (Soxhlet)	3 g de sol Température : 110°C 100 ml	<i>Vibrio fischeri</i> <i>Daphnia magna</i> <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>
	CO ₂ supercritique (SFE)	0,5 g de sol Température : 80°C Pression : 200 atm	<i>Vibrio fischeri</i>

DCM/HEX : Dichlorométhane/Hexane, 50/50 (v/v)

Tableau 22. Résumé des protocoles de lixiviation, d'extraction et des tests biologiques de toxicité utilisés

5.1.3 Conduite des essais

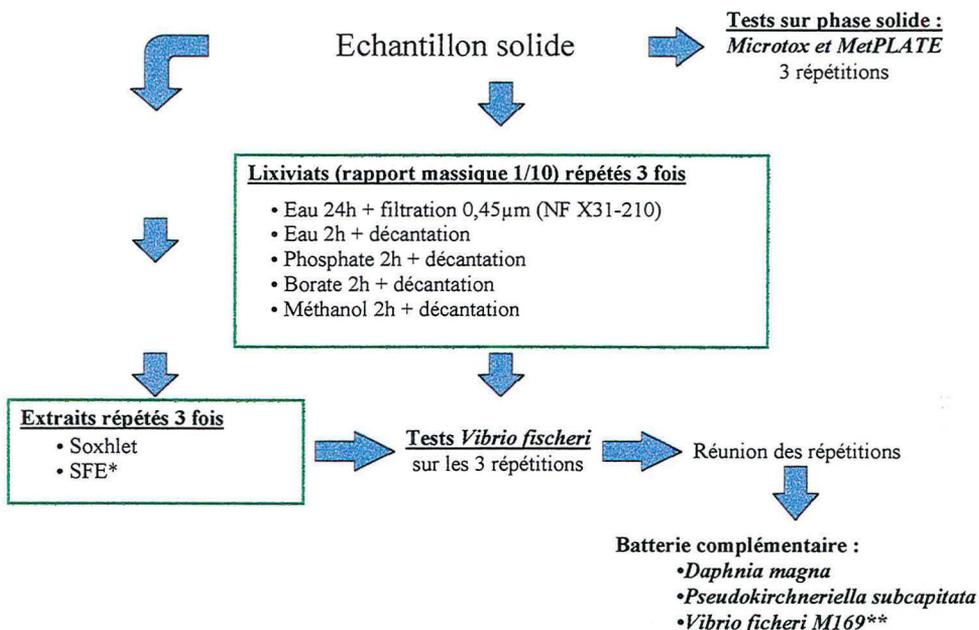
Les essais sur phase solide (Microtox[®] et MetPLATE[®]) ont été réalisés en trois répétitions sur l'ensemble des matériaux prélevés.

Les tests biologiques ont été effectués le jour même de la filtration ou de la décantation pour les tests les plus rapides (*Vibrio fischeri* et *Daphnia magna*) et dans la semaine suivant l'extraction pour le test sur *Pseudokirchneriella subcapitata*. Entre l'étape de préparation du lixiviat et son évaluation avec la batterie de tests, les extraits étaient conservés à l'obscurité, à 4°C. Le délai maximum entre la réalisation du lixiviat et celle des tests biologiques était au maximum égal à une semaine.

Tous les extraits ont été réalisés en 3 exemplaires. L'essai préalable réalisé à l'aide du test *Vibrio fischeri* a permis de caractériser la variabilité des extraits. Dans tous les cas, cette variabilité étant inférieure à 15%, les trois répétitions ont été réunies en un seul extrait puis analysées à l'aide des deux autres tests biologiques (*Daphnia magna* et *Pseudokirchneriella subcapitata*).

L'impact de l'étape de filtration sur la réponse des tests génotoxiques ayant été observés par Vasseur *et al.* (1996), le test de mutagenèse Mutatox[®] a été réalisé sur la réunion des 3 répétitions issues de la lixiviation à l'eau 2h, décantée.

La figure 23 résume la méthodologie employée.



* Sur l'extrait organique obtenu après extraction SFE, seul le test *Vibrio fischeri* a été utilisé.

** Le test *Vibrio fischeri* M169 a été réalisé sur les lixiviats décantés.

Figure 23. Protocole expérimental employé pour la caractérisation des matériaux industriels

5.2 Résultats

La toxicité des matrices industrielles contaminées a été étudiée en terme de toxicité liée, d'une part, à la fraction mobilisable à l'eau et, d'autre part, aux fractions peu mobiles à l'eau ou liées aux constituants de la matrice.

5.2.1 pH des lixiviats obtenus

Le pH des lixiviats est compris entre 7 et 12 (tableau 23).

	S1	S2	D1	D2
Eau 1/10, 24h, 0,45µm	7,2 ± 0,1	8,2 ± 0,1	7,7	11,9
Eau 1/10, 2h, décanté	8,0 ± 0,1	8,5	8,1	11,6
Tampon Phosphate 1/10, 2h, décanté	5,7	6,0	6,1	8,5 ± 0,1
Tampon Borate 1/10, 2h, décanté	9,6	9,7	9,4	11,7

Tableau 23. pH des lixiviats obtenus après lixiviation à l'eau, au tampon phosphate et borate de différents échantillons industriels collectés

Les pH des différents extraits obtenus pour les matériaux S1, S2 et D1, après lixiviation à l'eau et au tampon phosphate sont compatibles avec la réalisation de tests biologiques. Les pH obtenus avec le tampon borate sur ces matériaux sont supérieurs au seuil de validité des différents tests (limite de validité des tests entre 8.5 et 9). Cependant, pour cet extractant, les essais sont systématiquement comparés à la toxicité du tampon phosphate, ajusté au même

pH. La toxicité du lixiviat est alors déduite de celle de l'extractant. Cette méthode a été préférée à celle de l'ajustement du pH car l'ajustement modifie l'état des polluants dans les extraits et donc leur mobilité.

Le pH des lixiviats obtenus à partir du déchet D2 sont supérieurs à 11 (exception faite du lixiviat obtenu après lixiviation au tampon phosphate) et dépassent donc nettement les plages acceptables pour les différents tests biologiques. Afin d'évaluer la toxicité liée au pH, les essais biologiques ont été réalisés avec et sans neutralisation à pH 7.

5.2.2 Toxicité et génotoxicité de la fraction extractible à l'eau des matrices industrielles

a) Toxicité de la fraction extractible à l'eau des matrices industrielles

Les résultats de toxicité sont regroupés par matrice en fonction des lixiviats mis en œuvre et des différents tests biologiques pratiqués (tableau 24). La toxicité liée à la fraction mobilisable à l'eau représente la part des molécules toxiques directement solubilisée par l'eau.

		<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Daphnia magna</i>	<i>Pseudokirchmeriella subcapitata</i>
S1	Eau 1/10,2h, décanté	15 ± 1,6	Non toxique	14
	Eau 1/10,24h, 0,45µm	15 ± 0,4	Non toxique	8
S2	Eau 1/10,2h, décanté	Non toxique	Non toxique	2
	Eau 1/10,24h, 0,45µm	Non toxique	Non toxique	Non toxique
D1	Eau 1/10,2h, décanté	3 ± 0,22	Non toxique	22
	Eau 1/10,24h, 0,45µm	2 ± 0,29	Non toxique	4
D2	Eau 1/10,2h, décanté	47 ± 5,3	6	100
	Eau 1/10,2h, décanté, neutralisé	10 ± 2,1	2	54
	Eau 1/10,24h, 0,45µm	32 ± 5,8	4	34
	Eau 1/10,24h, 0,45µm, neutralisé	4 ± 0,8	2	20

Tableau 24. Résultats (exprimés en Unités toxiques) des 3 tests de toxicité sur les lixiviats à l'eau réalisés sur les terres industrielles et les déchets contaminés

Comme cela avait souligné sur les échantillons de terre contaminés au laboratoire, les tests biologiques montrent des réponses d'intensité différente sur un même lixiviat. Les tests sur bactéries (*Vibrio fischeri*) et algues unicellulaires (*Pseudokirchmeriella subcapitata*) présentent les réponses les plus élevées indépendamment de la matrice testée.

Les protocoles de lixiviation utilisés (2 h, décanté ou 24 h, filtré) présentent une efficacité comparable sur les échantillons testés. Cependant, pour les déchets D1 et D2, l'expression de la toxicité sur le lixiviat obtenu par le protocole normalisé est inférieure à celle observée pour le protocole réalisé avec une durée de lixiviation de 2h, suivi d'une décantation de 12 h (pour le test sur algues unicellulaires, sur le déchet D1, la différence entre les deux protocoles de lixiviation à l'eau est de l'ordre d'un facteur 5).

La toxicité des lixiviats neutralisés issus du déchet D2 est inférieure à celle du lixiviat non neutralisé, quel que soit le test de toxicité employé.

b) Génotoxicité de la fraction extractible à l'eau des matrices industrielles

Les essais de génotoxicité (test bactérien Mutatox[®]) ont été réalisés avec et sans activation métabolique (S9), sur le lixiviat 2h, décanté. Les concentrations seuils et les facteurs d'amplification obtenus après 16 h d'exposition, pour l'ensemble des matrices, sont présentés

dans le tableau 25.

	Sans activation métabolique		Avec activation métabolique	
	Dilution	Facteur d'amplification	Dilution	Facteur d'amplification
Témoin négatif	Pas de ré-émission de lumière significative (-)			
Témoin positif	1,25 mg/l [#]	> 800	0,125 mg/l ^{##}	190
S1	0,7 %	9	-	-
S2	1,5 %	17	25 %	3,8
D1	0,4 %	> 800	-*	-*
D2	-	-	-	-

- - : pas de ré-émission de lumière supérieure au seuil
- # : phénol
- ## : benzo(a)pyrène
- * : une ré-émission de lumière est observée après 24 h d'exposition (ré-émission légèrement supérieure au seuil de positivité)

Tableau 25. Résultats des essais de mutagenèse réalisés avec le test Mutatox[®] sur les lixivats (1/10, 2h, décantés) des matrices solides contaminées après 16 h d'exposition

A l'exception du déchet D2, pour lequel le pH élevé du lixiviat non neutralisé rendait impossible la mesure de la génotoxicité, les lixivats des autres matrices provoquent tous une réponse génotoxique. Cependant, l'échantillon de terre contaminée S1 ne présente cette réponse qu'en l'absence d'activation métabolique alors que S2 et D1 répondent plus ou moins fortement quel que soit le protocole utilisé. Les facteurs d'amplification sont compris entre 9 et plus de 800, démontrant le pouvoir mutagène des molécules lixiviées.

5.2.3 Toxicité des échantillons en phase solide

Les essais en phase solide (Microtox[®] et MetPLATE[®]) ont été répétés 3 fois, sur chaque échantillon. Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 24 et 25. Pour ces essais, les tests biologiques ont été également réalisés sur l'échantillon de terre agricole de la Bouzule (échantillon témoin non pollué) à titre de comparaison.

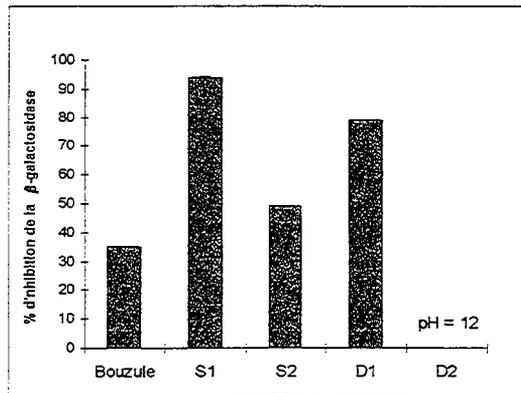


Figure 24. Inhibition de l'activité β -galactosidase (test MetPLATE[®]) exprimée en % sur un échantillon de terre agricole (Bouzule) et les matériaux industriels contaminés

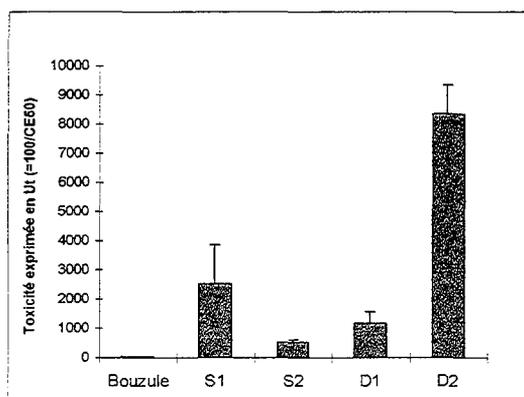


Figure 25. Toxicité (test Microtox en phase solide) exprimée en Ut sur un échantillon de terre agricole (Bouzule) et les matériaux industriels contaminés

Le test MetPLATE[®] met en évidence une inhibition de l'activité β -galactosidase importante (supérieure à 70%) sur les matrices S1 et D1. La spécificité de ce test aux éléments traces métalliques laisse supposer la présence de métaux dans les solutions de sol ou de déchet. Pour les matrices « Bouzule » et S2, l'inhibition mesurée (respectivement 35 et 49 %) suppose également la présence de métaux mais en quantité plus faible car l'inhibition est moins importante.

Le test Microtox[®] en phase solide met en évidence une toxicité sur l'ensemble des matrices testées. Cette toxicité est importante pour les matrices S1 et D2. Pour cette dernière, la présence de particules de cendres dans les différentes dilutions crée un effet tampon qui impose un pH basique et explique la CE₅₀ très basse observée (0.012% soit plus de 8000 Ut). Les autres matrices génèrent des toxicités moins importantes (inférieures à 1000 Ut).

La comparaison des réponses des tests biologiques bactériens peut être réalisée en considérant les valeurs en relatif, par rapport à l'échantillon de terre agricole de la Bouzule. Il est alors possible de calculer un taux d'amplification par rapport à ce témoin (tableau 26). La réponse du test MetPLATE[®] est amplifiée plus de 2 fois sur les matériaux S1 et D1, alors que la réponse du test Microtox[®] en phase solide est amplifiée entre 11 et 177 fois pour l'ensemble des matrices.

	Met PLATE [®]	Microtox [®] en phase solide
S1	3	54
S2	1,4	11
D1	2,3	25
D2	-	177*

* : toxicité liée au pH basique de l'échantillon

Tableau 26. Taux d'amplification, pour les tests Microtox[®] en phase solide et MetPLATE[®] des réponses mesurées sur les matrices industrielles, par rapport à l'échantillon de terre agricole de la Bouzule

La comparaison des méthodes d'exposition directe et indirecte peut être réalisée pour le test Microtox® à l'aide de l'unité " quantité d'échantillon (exprimées en g) nécessaire à générer une CE₅₀ dans 1 litre d'eau " (chapitre 3). Le tableau 27 présente les résultats obtenus.

	Test Microtox en phase solide	Test Microtox sur lixiviat
Bouzule	22	> 100
S1	0,5	6
S2	2	> 100
D1	0,9	33
D2	0,1	2,1

Tableau 27. *Masse de terre (exprimée en g de matière sèche) pour chacun des 5 échantillons testés (Bouzule, S1, S2, D1 et D2) nécessaire pour générer une CE₅₀ dans 1 litre d'eau (tests sur Vibrio fischeri réalisés en phases solide ou sur lixiviat)*

Le protocole d'exposition en phase solide présente une meilleure sensibilité que celui réalisé après lixiviation. Ainsi, pour l'échantillon S1, il suffit de 0,1 g dans 1 litre d'eau pour générer une CE₅₀ par exposition directe alors qu'avec le protocole liquide (après extraction), il faut 6 g d'échantillon.

5.2.4 Toxicité des terres et des déchets liée aux fractions moins solubles

La toxicité mesurée à l'aide des lixiviations complémentaires et des extractions Soxhlet et SFE représente, par comparaison à la lixiviation réalisée à l'eau, la fraction toxique des polluants contenue dans la matrice solide, et non extractible directement à l'eau.

a) *Lixiviation complémentaire au méthanol et extractions Soxhlet ou SFE*

Les résultats de toxicité obtenus pour les extraits au méthanol ou après extraction Soxhlet ou SFE (compte tenu du faible volume récupéré par cette extraction, seul le test Microtox® a pu être réalisé) sont rassemblés dans le tableau 28. En parallèle, à titre de comparaison, les résultats obtenus avec les lixiviations réalisées à l'eau figurent également dans le tableau.

		<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Daphnia magna</i>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>
S 1	Eau 1/10,2h, décanté	15 ± 1,6	Non toxique	14
	Eau 1/10,24h, 0,45µm	15 ± 0,4	Non toxique	8
	Méthanol, 1/10, 2h, décanté	698 ± 27	34	67
	Soxhlet	325 ± 50	Non toxique	Non toxique
	SFE	202 ± 31	Non réalisé	Non réalisé
S2	Eau 1/10,2h, décanté	Non toxique	Non toxique	2
	Eau 1/10,24h, 0,45µm	Non toxique	Non toxique	Non toxique
	Méthanol, 1/10, 2h, décanté	168 ± 18	184	15082
	Soxhlet	259 ± 92	172	42268
	SFE	321 ± 196	Non réalisé	Non réalisé
D1	Eau 1/10,2h, décanté	3 ± 0,22	Non toxique	22
	Eau 1/10,24h, 0,45µm	2 ± 0,29	Non toxique	4
	Méthanol, 1/10, 2h, décanté	19 ± 2,3	6	Non toxique
	Soxhlet	10 ± 3,3	Non toxique	Non toxique
D2	Eau 1/10,2h, décanté	47 ± 5,3	6	100
	Eau 1/10,2h, décanté, neutralisé	10 ± 2,1	2	54
	Eau 1/10,24h, 0,45µm	32 ± 5,8	4	34
	Eau 1/10,24h, 0,45µm, neutralisé	4 ± 0,8	2	20
	Méthanol, 1/10, 2h, décanté	206 ± 32	Non toxique	3712
	Soxhlet	7 ± 1	Non toxique	Non toxique

Non réalisé : volume d'extrait trop faible pour permettre les tests sur daphnie et sur algue

Tableau 28. Résultats (exprimés en Unités toxiques) des 3 tests de toxicité sur les extraits organiques obtenus après lixiviation au méthanol, extraction Soxhlet ou SFE sur les terres industrielles et les déchets contaminés

Pour l'ensemble des matrices contaminées, la toxicité des extraits méthanoliques est plus élevée que celle des lixiviats à l'eau. Les différences mises en évidence peuvent être faibles (de l'ordre de 15 Ut pour le déchet D1, avec le test sur *Vibrio fischeri*) ou, au contraire, très importantes comme celles détectées sur les extraits des matériaux S1, S2 et D2. Ainsi, pour le test sur algue unicellulaire *Pseudokirchneriella subcapitata*, la toxicité de l'échantillon de terre S2 passe de l'état non toxique à plus de 10000 Ut avec l'extrait obtenu par Soxhlet ou SFE. De même, pour le test Microtox[®], la toxicité sur l'échantillon S1 est amplifiée dans les extraits organiques comparativement au lixiviat aqueux (respectivement 700 Ut contre 15 Ut).

Les biotests répondent différemment aux extraits méthanol obtenus. Ainsi, sur l'échantillon S1, le test Microtox[®] est plus sensible que le test sur algue unicellulaire (respectivement 700 Ut contre moins de 100 Ut) alors que pour S2, le test algue avec plus de 10000 Ut est plus sensible que le test Microtox[®] (environ de 100 Ut).

Les extractions Soxhlet et SFE présentent des résultats plus faibles ou comparables à ceux obtenus avec la lixiviation réalisée avec du méthanol.

b) Lixiviations complémentaires à différents pH

Ces lixiviations alternatives ont été réalisées à l'aide de tampons phosphate (pH=5) et borate (pH=9), pendant une durée de 2h, l'extrait étant ensuite récupéré après 12 h de décantation. Pour le déchet D2, le pH des extraits (à l'exception de celui obtenu avec le tampon phosphate) n'est pas compatible avec la réalisation de tests biologiques (pH supérieur à 11, tableau 23). Les tests biologiques ont été pratiqués directement sur les extraits, avec ou

sans neutralisation à pH 7. La toxicité des extraits est présentée dans le tableau 29. En parallèle, à titre de comparaison, les résultats obtenus avec les lixiviations réalisées à l'eau figurent également dans le tableau.

		<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Daphnia magna</i>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>
S 1	Eau 1/10,2h, décanté	15 ± 1,6	Non toxique	14
	Eau 1/10,24h, 0,45µm	15 ± 0,4	Non toxique	8
	Phosphate 1/10,2h, décanté	17 ± 3	Non toxique	3
	Borate 1/10,2h, décanté	17 ± 4	Non toxique	4
S2	Eau 1/10,2h, décanté	Non toxique	Non toxique	2
	Eau 1/10,24h, 0,45µm	Non toxique	Non toxique	Non toxique
	Phosphate 1/10,2h, décanté	3 ± 0,03	Non toxique	17
	Borate 1/10,2h, décanté	Non toxique	Non toxique	5
D1	Eau 1/10,2h, décanté	3 ± 0,22	Non toxique	22
	Eau 1/10,24h, 0,45µm	2 ± 0,29	Non toxique	4
	Phosphate 1/10,2h, décanté	Non toxique	Non toxique	Non toxique
	Borate 1/10,2h, décanté	12 ± 3	Non toxique	44
D2	Eau 1/10,2h, décanté	47 ± 5,3	4	100
	Eau 1/10,2h, décanté, neutralisé	10 ± 2,1	2	54
	Eau 1/10,24h, 0,45µm	32 ± 5,8	6	34
	Eau 1/10,24h, 0,45µm, neutralisé	4 ± 0,8	2	20
	Phosphate 1/10,24h, 0,45µm	3 ± 0,03	Non toxique	21
	Borate 1/10,2h, décanté	36 ± 6	Non toxique	42
	Borate 1/10,2h, décanté, neutralisé	Non toxique	Non toxique	28

Tableau 29 . Résultats (exprimés en Unités toxiques) des 3 tests de toxicité sur les extraits acides et basiques obtenus après lixiviation avec un tampon phosphate ou borate des terres industrielles et les déchets contaminés

Les lixiviations basiques (tampon borate) ou acides (tapon phosphate) se sont révélées d'une efficacité comparable à celle obtenue directement à l'eau. Cependant, l'extractant acide augmente légèrement la toxicité mesurée sur l'échantillon S2 : pour le test sur algues unicellulaires, la toxicité passe ainsi de 2 Ut après une lixiviation à l'eau à 17 pour le lixivié au tampon phosphate. De même, l'extractant alcalin a permis une meilleure expression de la toxicité sur le déchet D1, pour les tests Microtox® et algue unicellulaire, par rapport à la lixiviation à l'eau.

5.3 Discussion

La discussion des résultats s'articulera en trois points : la validation du protocole proposé lors des essais de caractérisation des matériaux contaminés, la caractérisation de la toxicité des matériaux industriels contaminés et sa signification par rapport à d'autres essais biologiques ainsi que l'interprétation de l'ensemble des résultats en vue de déterminer la nature des relations entre la matrice contaminée et les polluants pour estimer le danger à court et long terme.

5.3.1 Validation du protocole de caractérisation du danger

Cette discussion traite de l'équivalence des protocoles de lixiviations à l'eau, de l'influence du pH de l'extrait sur la toxicité, de la sensibilité des tests biologiques lors d'une exposition indirecte ou directe, de l'impact génotoxique des polluants lixiviés et de la nature des solutions extractantes.

a) *Equivalence des protocoles d'extraction à l'eau (2h décanté ou 24 h filtré)*

Les réponses toxiques obtenues après lixiviation 2h, décantée ou 24 h, filtrée à 0,45µm, se sont montrées équivalentes, pour les échantillons industriels échantillonnés. Cependant, pour certains échantillons, le protocole 24h, filtré, présente des réponses toxiques moins importantes. Cette moins bonne performance peut être due à la l'existence de phénomènes limitant la mobilité des polluants lors de la lixiviation (dégradation, volatilisation, réduction, fixation des polluants..) mais également à l'étape ultérieure de filtration. Les différences observées sont néanmoins moins marquées que lors de la contamination organique de l'échantillon de terre de la Bouzule, au laboratoire.

Le protocole de lixiviation sur une durée de 24h, suivi d'une étape de filtration à 0,45µm (correspondant à la norme de lixiviation AFNOR X31-210 (1992)), utilisé pour l'analyse chimique et le classement des déchets, est actuellement envisagé pour l'étude de la toxicité de ces matériaux. Les résultats démontrent que si, pour certains échantillons, les résultats sont comparables, pour d'autres, le protocole normalisé conduit à sous estimer la toxicité. Il pourrait alors être remplacé par la lixiviation sur une durée de 2h, suivie d'une étape de décantation.

b) *Influence du pH de l'extrait*

La toxicité importante des lixiviats aqueux du déchet D2 diminue après neutralisation. Cette toxicité est donc essentiellement liée au pH alcalin initial du lixiviat puisque, compte tenu de la composition minérale du déchet, le passage d'un pH basique à la neutralité ne peut pas précipiter les métaux et au contraire, aurait du les rendre plus mobiles. Lors de la réalisation de tests de toxicité sur des lixiviats présentant des pH non compatibles avec la plage de validité (définie pour chaque test), la réalisation d'un essai sans neutralisation et d'un essai neutralisé peut renseigner sur la nature et la mobilité des polluants solubilisés. Cependant, cette information doit être nuancée car la toxicité mesurée peut être due à la combinaison de l'effet pH et des polluants.

c) *Sensibilité relative des tests biologiques utilisés*

Comme lors des essais sur les échantillons contaminés au laboratoire, les tests Microtox[®] (*Vibrio fischeri*) et *Pseudokirchneriella subcapitata* se sont avérés les plus sensibles aux extraits des échantillons industriels prélevés. La moins bonne sensibilité du test *Daphnia magna* aux différents extraits pourrait être due à une réaction de fuite des organismes. Les tests sont réalisés dans des tubes à essais de 18 cm de hauteur, remplis à moitié par les concentrations de l'échantillon à tester. Pendant les 24 h du test, les tubes à essais ne sont pas soumis à une agitation (contrairement aux essais sur les algues) et les échantillons décantent : les microcrustacés nagent alors au niveau du ménisque, évitant ainsi le bas du tube où la sédimentation des matières en suspension concentre les polluants.

d) *Influence de la méthode d'exposition*

Les expositions directes réalisées par la mise en suspension de l'échantillon à tester permettent d'améliorer la réponse et la sensibilité des tests. Ainsi, pour le déchet D1, alors qu'aucune toxicité n'est mesurée sur les lixiviats aqueux réalisés, quel que soit le test biologique, le test MetPLATE[®] démontre la présence de métaux biodisponibles (inhibition de l'activité enzymatique à plus de 70%). Sur ce même échantillon, le test Microtox[®] en phase solide mesure une toxicité 25 fois supérieure à celle d'un échantillon de terre agricole.

L'utilisation du même organisme (*Vibrio fischeri*) avec des protocoles différents permet de comparer les deux méthodes d'exposition directe et indirecte : les quantités de matrice nécessaires pour générer un effet toxique (CE₅₀) sont moins importantes pour l'exposition directe que pour la lixiviation. Cette exposition, sans séparation des phases solides et liquides, favorise un contact plus étroit entre l'organisme testé et les polluants : les bactéries sont exposées non seulement aux polluants en solution mais également aux polluants liés aux particules fines minérales ou organiques et aux colloïdes.

Le test Microtox[®] en phase solide détecte une réponse toxique sur l'ensemble des matrices industrielles testées (la toxicité est amplifiée d'un facteur 11 à 177 par rapport à un échantillon de terre agricole). Contrairement à ce test, l'essai bactérien MetPLATE[®], spécifique des éléments en traces métalliques, ne présente une réponse importante (supérieure à 70 % d'inhibition) que pour les échantillons S1 et D1 (matériaux fortement contaminés par des métaux). La comparaison des réponses des deux tests biologiques bactériens sur un échantillon inconnu peut alors permettre de suspecter la présence de métaux biodisponibles (Schwartz *et al.*, 1996). L'inhibition de la β -galactosidase constatée pour l'échantillon de terre agricole peut s'expliquer par la présence de métaux comme le manganèse dont l'impact sur l'activité de l'enzyme n'est pas connu (l'inhibition est inférieure à 10% lorsque l'essai est réalisé sur un sable rincé à l'acide).

En dehors de l'existence d'un témoin matrice, l'interprétation de la réponse du test Microtox[®] en phase solide est difficile compte tenu de la conception du test. En effet, contrairement au test MetPLATE[®] qui dispose d'un système de blancs couleur permettant de tenir compte de la spécificité de chaque matrice testée, le test Microtox[®] repose sur la récupération par filtration des bactéries et la quantification de la luminescence du surnageant. La diminution de la luminescence peut ainsi être due à la toxicité de l'échantillon mais également à une adsorption des bactéries sur les constituants solides de la matrice, limitant leur récupération pour la quantification de la luminescence. Ce biais, souligné par différents auteurs (Brouwer *et al.*, 1990, True et Heyward, 1990, Svenson *et al.*, 1996) est un frein à l'exploitation des résultats obtenus par ce type de test. Ainsi, la toxicité mesurée sur l'échantillon de terre témoin peut être liée à la présence d'argiles (adsorbant les bactéries) dans l'échantillon (tableau 7, page 37) et non à la présence de polluants. Ringwood *et al.* (1997) proposent pour les sédiments une échelle d'adsorption en fonction de la granulométrie. Ce test reste utilisable en relatif (suivi d'un procédé de traitement de sol par exemple) ou lors de contaminations artificielles, lorsque le sol servant de support est disponible (Bispo *et al.*, 1995a, 1995b), comme lors de la contamination au laboratoire du sol agricole de la Bouzule. Un système de blanc reste à développer pour pouvoir utiliser ce test quel que soit l'échantillon analysé et tenir compte de sa spécificité.

e) Impact génotoxique des lixiviats

Le test de génotoxicité Mutatox[®] détecte un potentiel génotoxique pour l'ensemble des échantillons testés (exception faite du déchet D2 pour lequel le pH élevé rend impossible la mesure de la génotoxicité). Pour les échantillons S2 et D1, ce test met en évidence une génotoxicité prononcée des lixiviats aqueux (facteurs d'amplification respectivement égal à 17 et supérieur 800) alors qu'aucune toxicité significative n'était détectée. Ces échantillons solides sont donc susceptibles de contenir et de relarguer des molécules non toxiques mais mutagènes. Ces résultats soulignent la nécessité d'inclure un test de mutagenèse dans une batterie de tests afin d'intégrer l'impact sur le génome (Lambolez *et al.*, 1994). Les tests de toxicité aigus ou chroniques ne suffisent pas à juger du caractère dangereux d'un déchet ou

d'un échantillon de terre.

Pour l'échantillon de terre issu du site cokier (S2), la génotoxicité doit être due à la présence d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), substances connues pour leurs effets sur le génome (Harvey, 1996). Cependant, contrairement à ce qui est observé pour les HAP purs¹ en solution, cet effet mutagène est observé même sans activation métabolique (l'activation métabolique du lixiviat diminue l'effet mesuré). Ce phénomène peut s'expliquer par l'existence d'une dégradation bactérienne générant un cortège de molécules (et non plus seulement les molécules mères) dont certaines peuvent correspondre à des molécules actives. La plus faible réponse après activation peut être due à une dégradation enzymatique des molécules (Belkin *et al.*, 1994), ce qui semble difficile à admettre en un délai aussi court (de 16 à 24 h) ou à un défaut (en quantité ou en qualité) des enzymes dans les réactifs.

f) *Influence de la nature de la solution extractante*

➤ *Lixiviations à l'aide des solutions tampons*

Pour l'échantillon de terre S1 et les déchets D1 et D2, contaminés par des métaux, la toxicité n'est pas augmentée (par rapport à la réponse toxique observée à l'eau) après la lixiviation acide alors que cet extractant aurait dû permettre une meilleure solubilisation des éléments en traces métalliques et augmenter la réponse toxique (comme lors de la contamination métallique du sol agricole de la Bouzule). Les métaux dans ces matériaux sont donc sous des formes stables, peu ou non mobilisables :

- pour l'échantillon S1, la spéciation de quelques métaux indique leur présence sous des formes peu mobiles (sulfures, liaisons avec les argiles et la matière organique...) (Manceau, 1996)²,
- pour le déchet D1, les métaux sont sous des formes particulières (présence de copeaux d'acier, de limaille de fer...) et sont très peu mobiles autrement que par digestion acide,
- pour le déchet D2, la spéciation des métaux révèle des formes très peu solubles comme des oxydes et des chlorures de zinc et de plomb (Manceau, 1996). De plus, compte tenu du pH basique imposé par le déchet, le pH du tampon phosphate a été modifié (pH du lixiviat récupéré = 8).

Au contraire, pour l'échantillon terreux S2, issu d'un site cokier contaminé majoritairement par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), la lixiviation réalisée à l'aide du tampon phosphate n'a pas apporté d'information complémentaire par rapport aux lixiviations à l'eau. L'augmentation de la toxicité, sur l'échantillon terreux S2, après lixiviation acide est surprenante puisque les HAP ne sont pas influencés par le pH. Mais, l'existence d'autres polluants ionisables accompagnant généralement ces pollutions, comme les phénols, les polyphénols (issus de la dégradation des HAP), les cyanures et les

¹ Les HAP doivent préalablement être activés par les systèmes enzymatiques avant de générer une réponse génotoxique. Cette activation les rend plus électrophiles et leur permet d'interférer avec l'ADN.

² Spéciation du Cr, du Zn et du Pb dans l'échantillon de terre S1 (d'après Manceau, 1996) :

- le *chrome* est présent à l'état d'oxydation 3+. Aucune trace d'ions chromates n'a été détectée. Sa spéciation est multiple, il est fixé à la fois par les constituants organiques et inorganiques du sol.
- le *zinc* est, pour un peu moins de la moitié, sous forme de ZnS et, pour le reste, majoritairement fixé de façon non-échangeable par les argiles.
- le *plomb* est présent sous au moins deux formes : PbS et Pb²⁺ - (O, OH). Il est possible qu'une partie du plomb soit fixée par les oxyhydroxydes de fer.

éléments en traces métalliques, peut expliquer cette toxicité plus importante.

La lixiviation réalisée à l'aide du tampon borate a permis, sur le déchet D1, d'augmenter la réponse toxique par rapport aux lixiviations à l'eau. L'emploi en agronomie de cet extractant permet de fractionner et de séparer les différents constituants de la matière organique d'échantillons de terre (Brucker, 1979). Les composés organiques constitutifs de ce déchet issu du broyage automobile (mousses, plastiques..) pourraient avoir été modifiés sous l'action du tampon borate, relargant des molécules ayant un effet toxique.

Les lixiviations acides (au tampon phosphate) améliorent la mobilité des polluants ionisables (comme les métaux mobilisables ou les phénols) alors que les lixiviations alcalines pourraient modifier les relations des polluants avec les matières organiques voire les matières organiques elles-mêmes. Cependant, la différence entre les réponses toxiques observées sur les lixiviations à l'eau et les lixiviations acides (tampon phosphate à pH 5) ou basiques (tampon borate à pH 9) reste faible, contrairement à l'échantillon de terre contaminé par des polluants métalliques (chapitre 4.2.1) pour lequel cette différence était importante (de l'ordre de 500 Ut, avec le test *Pseudokirchneriella subcapitata*). Les résultats obtenus soulignent l'effet de la spéciation des éléments en trace métalliques, du temps et des conditions de vieillissement des matériaux. Lors des contaminations au laboratoire, les polluants sont introduits dans la matrice à tester et ne réagissent que quelques jours, contrairement aux échantillons de terre issus de sites industriels pour lesquels, ce vieillissement est de l'ordre de plusieurs dizaines d'années, dans des conditions très variables. Pour l'échantillon S1 par exemple, le confinement de la zone polluée en lagune a créé des conditions réductrices expliquant l'association des métaux aux sulfures et leur faible mobilité.

➤ *Lixiviations à l'aide de solvants organiques*

Les lixiviations réalisées à l'aide de solvants organiques augmentent la réponse toxique entre 10 et plus de 1000 fois par rapport à celle observée pour les lixiviations à l'eau. Les solvants organiques améliorent la solubilisation des polluants peu ou non solubles dans l'eau et augmentent ainsi leur concentration dans les milieux d'essai, rendant la réponse toxique plus importante.

Pour tous les matériaux testés, la réponse toxique est augmentée par la lixiviation au méthanol, et ce, même pour le déchet D2, a priori de nature minérale (cendres volantes d'incinérateur). Cette réponse est surprenante et ne s'explique que par la présence de polluants organiques persistants et/ou néoformés à haute température. De plus, la diminution (test Microtox[®]) ou la disparition (test *Pseudokirchneriella subcapitata*) de la toxicité dans les extraits obtenus après extraction Soxhlet, laisse supposer la présence de polluants volatils, perdus pendant l'étape d'évaporation à sec avant reprise dans le méthanol. Sur le même déchet, les extraits organiques présentaient également un effet génotoxique avec *Salmonella typhimurium* (test d'Ames, Vasseur *et al.*, 1996) démontrant la présence de molécules organiques mutagènes. Des analyses complémentaires (empreintes en CG-MS) ont confirmé la présence d'hydrocarbures courts, permettant ainsi de faire le lien avec la toxicité mesurée.

Les extractions Soxhlet et SFE présentent des réponses de toxicité toutes inférieures ou égales à celles obtenues par lixiviation au méthanol, sauf pour l'échantillon de terre S2 (contaminé par des HAP). L'étape d'évaporation suivant l'extraction Soxhlet augmente les risques de perte de polluants par volatilisation, pouvant entraîner une diminution de la toxicité. Cette réduction n'est pas observée sur l'échantillon S2 en relation avec une contamination importante en hydrocarbures polycycliques lourds, peu volatilisables. De

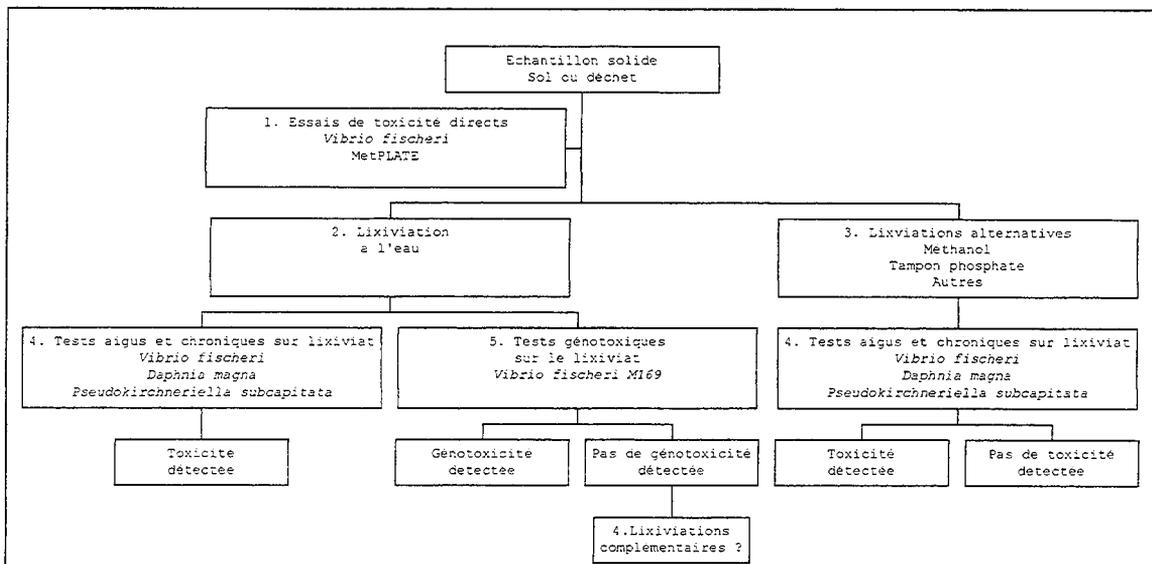
même, l'expression de la toxicité est améliorée par l'utilisation de la SFE, développée précisément pour l'extraction des HAP (Rodriguez, 1996). Pour cette dernière technique, une optimisation des paramètres d'extraction (pression, température et pourcentage de co-solvant) doit alors être envisagée pour permettre d'augmenter le potentiel d'extraction d'autres polluants organiques comme les hydrocarbures aromatiques chlorés...

Les lixiviations et les extractions à l'aide de solvants organiques permettent de détecter, de manière sélective, la présence des polluants organiques potentiellement toxiques, peu solubles dans l'eau. La comparaison des différents protocoles indique que les extractions plus poussées présentent des résultats inférieurs ou équivalents à ceux de la lixiviation au méthanol. Les extractions Soxhlet et SFE, bien que réalisées avec des solvants plus puissants (dichlorométhane, hexane, CO₂ supercritique...) et des conditions d'extraction plus agressives ne permettent pas une meilleure expression de la toxicité. Ce phénomène peut être due aux limites des 2 techniques (précédemment exposées) mais également à la solubilité du méthanol. En effet, la reprise dans le méthanol du résidu sec ou des polluants relargués sur le piège par le CO₂ est limitée par la capacité du solvant à solubiliser les polluants précédemment extraits. Les concentrations finales récupérées après reprise dans le méthanol peuvent donc être équivalentes à celles obtenues par lixiviation. D'autres solvants pourraient alors être utilisés comme le DMSO.

La lixiviation au méthanol, simple et rapide, est donc suffisante pour évaluer la toxicité liée aux fractions polluantes organiques. Elle doit être envisagée comme une méthode complémentaire, apportant une information relative par rapport à celle obtenue avec la lixiviation à l'eau.

g) Conclusion

Le protocole de caractérisation du danger (développé sur les échantillons contaminés au laboratoire) a été validé sur des matériaux industriels (déchets et terres issus de sites contaminés). L'importance des différents points soulignés (durée de lixiviation, importance de l'étape de filtration, pertinence de l'emploi de différents extractants, sensibilité des tests par exposition directe) a pu être de nouveau vérifiée. Les choix précédemment retenus sont donc confirmés. De plus, le protocole de caractérisation du danger écotoxique doit être complété par un test de mutagenèse : les polluants peuvent présenter un danger génotoxique et ne pas provoquer un effet macroscopique. Les différents résultats obtenus sur les matériaux industriels permettent de valider et de compléter le protocole développé sur les échantillons contaminés au laboratoire (figure 26). Ce protocole devra être évalué et critiqué sur une gamme plus vaste d'échantillons solides.



1. Les essais directs proposés sont ceux réalisés dans le cadre de cette recherche. D'autres essais pourraient être inclus. Concernant l'utilisation du test Microtox[®] en phase solide, celle-ci peut être conservée en fonction de l'objectif de l'étude et avec les réserves d'interprétation formulées précédemment (chapitre 5.3.1.d).
2. Les techniques de lixiviation ne sont pas décrites. Elles vont dépendre de l'objectif retenu (voir chapitre 4.3.1, tableau 20). Cependant, il faut préciser que la caractérisation chimique réglementaire du lixiviat des déchets et des sols contaminés est réalisée sur la base de la norme AFNOR X31-210 (1992) avec un rapport massique solide liquide de 1/10, une durée de lixiviation de 24 h et une filtration à 0,45µm du lixiviat obtenu. Si le protocole choisi est différent de ce dernier, cela conduirait à produire deux lixiviats et donc également deux caractérisations chimiques si les résultats de toxicité doivent être croisés avec les données chimiques.
3. Les extractants retenus sont ceux étudiés dans le cadre de cette recherche. D'autres auraient pu être employés (sels métalliques, tampons acétate, EDTA, DMSO...). Cependant, compte tenu des résultats des lixiviations réalisées à l'aide du méthanol, il est primordial de conserver et de conduire en parallèle cette lixiviation pour, d'une part, évaluer la nature des polluants responsables de la toxicité et, d'autre part, cerner la réserve toxique présente dans les matrices contaminées. Les extractants comme les tampons phosphates ou borates ont montré des résultats décevants sur les matrices industrielles contaminées alors qu'ils étaient prometteurs sur les matrices solides artificiellement contaminées au laboratoire. L'apport de ces extractants à une telle procédure de caractérisation du danger reste donc à confirmer en utilisant d'autres matrices contaminées dont la spéciation des métaux notamment serait différente de celle rencontrée dans les matrices utilisées.
4. Les tests biologiques proposés sont ceux qui ont été évalués dans le cadre de cette recherche. D'autres pourraient être ajoutés. Cependant, la batterie réalisée permet d'évaluer la toxicité aiguë, chronique et génétique des matrices, tout en utilisant différents niveaux trophiques (bactéries, végétaux et animaux).
5. Dans le cadre de cette procédure, la génotoxicité a été incluse au même niveau que l'étude de la toxicité. Ce type d'effet étant dissocié des autres types de toxicité, il convient donc de l'analyser au même titre que les autres. Les lixiviations complémentaires pour l'étude de la génotoxicité n'ont pas été développées mais pourraient être envisagées.

Figure 26. Proposition d'un protocole de caractérisation du danger écotoxique lié aux matrices solides contaminées

5.3.2 Caractérisation de la toxicité des échantillons testés

Le but de l'étude n'était pas de statuer sur le danger toxique ou génotoxique des matrices mais d'utiliser ces matériaux pour mettre en évidence la mobilité et la toxicité des polluants. Cependant, il est intéressant de réaliser une telle caractérisation et de la comparer à celle obtenue par le biais de tests biologiques terrestres.

a) Danger toxique et génotoxique des matériaux utilisés

Il s'agit de caractériser le danger lié à chacune des matrices et de les classer les unes par rapport aux autres. Parmi les différentes méthodes existant pour statuer sur la toxicité de matrices polluées, celles proposées par le Ministère de l'Environnement pour l'évaluation de la dangerosité des déchets (1997b) et par Constant *et al.*, 1993 (indice PEEP) ont été sélectionnées.

La méthode retenue par le Ministère de l'Environnement, en Décembre 1997, repose sur la réponse individuelle des tests biologiques. Une matrice est considérée comme dangereuse :

- si la toxicité aiguë induite par son lixiviat (CE₅₀ exprimée en %) pour l'un des 2 tests *Vibrio fischeri* et *Daphnia magna*, est inférieure ou égale à 10%, ou,
- si la toxicité chronique induite par son lixiviat (CE₂₀ exprimée en %) pour le test *Pseudokirchneriella subcapitata* et le test *Ceriodaphnia dubia* est inférieure ou égale à 0.1%.

Ces valeurs ont été proposées en décembre 1997 et sont encore en discussion. Elles s'appliquent aux déchets, et dans le cadre de cet exercice, elles ont été conservées pour les échantillons de terre contaminés. Le tableau 30 indique les valeurs de toxicité¹ obtenues sur les 4 matrices, pour les 3 tests biologiques réalisés. Dans le tableau, les valeurs en gras indiquent le dépassement du seuil.

			S1	S2	D1	D2*
Toxicité Du lixiviat	Toxicité Aiguë	<i>Daphnia magna</i> (CE ₅₀)	NT	NT	NT	62,7
		<i>Vibrio fischeri</i> (CE ₅₀)	6	NT	43	25
	Toxicité Chronique	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (CE ₂₀)	3.5	NT	9,8	1.3

NT : lixiviat non toxique

* Lixiviat neutralisé conformément aux préconisations retenues

Tableau 30. Toxicité des matrices utilisées par rapport aux seuils provisoirement retenus par le Ministère de l'Environnement pour l'évaluation de la dangerosité des déchets (1997b) (données exprimées en CE₂₀% pour le test *Pseudokirchneriella subcapitata* et en CE₅₀% pour les autres tests biologiques)

Par rapport aux seuils retenus et en les extrapolant pour les échantillons terreux contaminés, l'échantillon S1 serait la seule matrice classée comme dangereuse. Il n'est pas possible de conclure sur le danger des autres matrices puisque la procédure proposée par le Ministère n'a pas été réalisée complètement (il manque l'essai chronique sur lixiviat avec *Ceriodaphnia dubia* et, les essais directs de germination et de croissance sur végétaux supérieurs et de mortalité sur ver de terre). Le classement de l'échantillon S1 comme dangereux repose sur un seul test (*Vibrio fischeri*). De plus, les différents tests biologiques

¹ Les valeurs retenues correspondent au protocole sélectionné dans la version provisoire du Ministère (Décembre 1997), à savoir, une lixiviation à l'eau pendant 24h, suivie d'une filtration et d'une neutralisation.

pratiqués ne prennent pas en compte la génotoxicité des matrices. Il est donc plus pertinent d'agréger les réponses de plusieurs tests dans un indice unique.

Sur le modèle de l'indice PEEP, un indice global (Ig) de toxicité a été construit en tenant compte de l'ensemble des essais biologiques réalisés sur un même lixiviat. La formule utilisée est la suivante :

$$I_g = \log_{10} \left[1 + n \left(\frac{\sum_{i=1}^N T_i}{N} \right) \right]$$

- où :
- n est le nombre de tests produisant une réponse positive sur le lixiviat,
 - N est le nombre total de tests réalisés sur le lixiviat,
 - T_i est la toxicité et la génotoxicité détectée par les tests, exprimée en Unités toxiques (=100/ CE₅₀ %) et en Unités génotoxiques (=100/dilution seuil en %)

A titre d'exercice, le tableau 31 explicite le calcul d'après les essais réalisés sur les lixiviats. Pour les tests de toxicité aiguë ou chronique, le calcul des unités toxiques a été réalisé à partir des CE₅₀ (Ut = 100/CE₅₀) alors que pour les tests de génotoxicité, une unité génotoxique a été dérivée à partir de la dilution seuil (Ug = 100/Concentration seuil).

	S1	S2	D1	D2
<i>D. magna</i> (Ut)	pdr	pdr	pdr	2
<i>Vibrio fischeri</i> (Ut)	17	pdr	2	4
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (Ut)	8	pdr	4	20
<i>Vibrio fischeri</i> M169 (Ug)	143	67	250	pdr
N : Nombre total de tests	4	4	4	4
n : Nombre de tests présentant une réponse toxique	3	1	3	3
Somme (Ut + Ug)	168	67	257	25
A	127	18	194	20
Ig = Log A	2,1	1,25	2,3	1,3

pdr : pas de réponse

A : $1 + n \times [(\sum Ut \text{ et } UG) / N]$

Tableau 31. Calcul de l'indice global (Ig) sur les lixiviats pour les 4 tests biologiques réalisés

La somme des Unités toxiques et génotoxiques varie entre 25 (déchet D2) et 257 (déchet D1). L'indice global (Ig), calculé en tenant compte des tests présentant une réponse toxique par rapport l'ensemble des tests utilisés, varie de 1,25 à 2,3¹. Les écarts importants détectés sur la somme des unités toxiques et génotoxiques sont écrasés par l'utilisation du logarithme. Les matrices peuvent alors être classées les unes par rapport aux autres, suivant un indice Ig croissant. Le classement relatif obtenu est le suivant : S2 < D2 < S1 < D1. En intégrant la réponse génotoxique, le déchet D1, non toxique d'après le classement proposé par le Ministère (réalisé sans les essais terrestres, et sans l'essai *Ceriodaphnia dubia*), est alors considéré comme le plus dangereux par cette méthode. Cette différence est due, d'une part, à l'agréation des différentes réponses des tests biologiques de toxicité et, d'autre part, à l'ajout

¹ Dans le cadre d'études sur les effluents, Constant *et al.* (1993) montrent que dans la pratique, l'indice PEEP varie entre 0 et 10, sachant que le débit et la biodégradabilité de l'effluent viennent également pondérer cette valeur (dans le cas des solides, il pourrait s'agir des volumes ou masses contaminées, des pluviométries annuelles sur le site.....).

d'un critère de génotoxicité.

Suivant la méthode de détermination et les tests biologiques utilisés, les matériaux peuvent être classés différemment. Les deux méthodes sélectionnées permettent de situer la toxicité et la génotoxicité des matrices solides par rapport à un seuil déterminé ou dans l'absolu. Cette démarche peut être utilisée dans un cadre réglementaire à condition de choisir et de valider un seuil. Cette étape est la plus délicate à réaliser puisque les réponses des tests à un même lixiviat peuvent être très variables.

b) Comparaison du danger toxique et génotoxique observé après extraction à celui mis en évidence à l'aide de tests terrestres de toxicité

Les différents tests utilisés pour statuer sur le danger toxique des matériaux ont été réalisés après lixiviation. Ils intègrent donc essentiellement la fraction polluante toxique mobilisable à l'eau. Il est alors nécessaire de valider les résultats obtenus par rapport à des tests directs, réalisés sur des organismes telluriques qui intègrent des voies d'exposition autres que l'eau. Ce travail a été réalisé en partie à l'aide des essais bactériens directs (Microtox® en phase solide et MetPLATE®) qui restent cependant proches du milieu aqueux puisqu'ils sont effectués sur des suspensions de l'échantillon. Dans le cadre du programme ADEME "Ecotoxicité de sols et des déchets", les matrices solides industrielles S1, S2, D1 et D2 ont été évaluées avec une gamme de tests biologiques terrestres (tableau 32). Ces essais ont été réalisés sur des plantes (orge, blé, lentille) et sur des invertébrés terrestres (lombrics et cétoines).

	Test biologique	Toxicité exprimée en CE ₅₀ %				Référence
		S1	S2	D1	D2	
Toxicité Aiguë	Germination orge	14.6	N.T.	n.r	n.r	Guérin, 1999
	Mortalité lombric	N.T.	N.T.	N.T.	31.25	Bouché, 1994
	Mortalité cétoine	12	N.T.	N.T.	17,4	Martinet, 1997
Toxicité Chronique	Croissance lentille	3,9	N.T.	n.r	n.r	Arnold <i>et al.</i> , 1996
	Croissance Blé	31	N.T.	n.r	n.r	Arnold <i>et al.</i> , 1996
	Biomasse Cétoine	5,2	N.T.	N.T.	6,15	Martinet, 1997

N.T. : Non toxique
n.r : non réalisé

Tableau 32. Toxicité des matrices industrielles évaluée à l'aide des tests biologiques terrestres réalisés dans le cadre du programme ADEME

Ces essais terrestres mettent en évidence la toxicité des échantillons S1 (les CE₅₀ mesurées sont inférieures ou proches de 10% pour les tests sur orge, lentille et cétoine) et D2 d'incinération (CE₅₀ de 17% et 6,15%, respectivement pour la mortalité et la croissance pondérale du cétoine). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors des essais sur lixiviat. Les matrices S2 et D1 ne présentent pas de toxicité pour les tests biologiques terrestres sélectionnés. Cependant, les tests réalisés sur orge (Guérin, 1999) et sur rat de laboratoire (*Rattus norvegicus*) (Fouchecourt, 1996) démontrent l'impact sur le génome et sur le métabolisme de l'échantillon S2¹ :

- les cellules méristématiques racinaires d'orge cultivées sur cet échantillon présentent des micronoyaux, démontrant l'effet clastogène des polluants absorbés au niveau de la racine. Un effet maximal est détecté pour la dilution à 35%.

¹ Aucune donnée sur le métabolisme ou l'effet sur le génome du déchet D1 n'est disponible.

- les activités enzymatiques desoxygénases pulmonaires et hépatiques de rats exposés par la litière à cette matrice sont activées significativement, démontrant l'absorption et la métabolisation des polluants issus de cet échantillon. Cette activation a lieu dès 0,008% de matrice dans la litière.

Les activations métaboliques et les altérations du patrimoine génétique des organismes exposés (également détectées pour la matrice S1) sont en accord avec les données obtenues lors de l'exposition indirecte des bactéries *Vibrio fischeri* M169 aux lixiviats issus des échantillons terreux S1 et S2.

Les données de toxicité et de génotoxicité obtenues après lixiviation concordent avec celles obtenues par exposition directe. Les essais réalisés sur lixiviat sont donc de bons indicateurs de la toxicité des matrices solides contaminées. Les réponses toxiques obtenues sur lixiviat sont donc indicatrices du danger de la matrice solide : une toxicité observée sur le lixiviat indique une forte probabilité d'enregistrer une toxicité par exposition directe. L'eau étant le vecteur principal de mobilisation des polluants, elle permet de les solubiliser et de mettre en évidence leur toxicité dans le lixiviat, mais également par contact direct puisque les vases expérimentaux sont maintenus en général entre 60 et 80% de la capacité de rétention en eau. Cette voie d'exposition n'est cependant pas la seule puisque les organismes exposés peuvent également s'intoxiquer par absorption de particules contaminées (Fouchecourt, 1996).

La lixiviation des matrices pour conduire des tests de toxicité pourrait donc être la première étape de la caractérisation écotoxique des matrices solides contaminées, les essais sur phase solide n'étant développés que si aucune toxicité n'est détectée sur les lixiviats, pour confirmer l'absence de toxicité. La procédure décrite en figure 27 décrit l'enchaînement pouvant être réalisé sur la base des résultats acquis dans le cadre de cette recherche et ainsi que par les différents partenaires du programme ADEME "Ecotoxicité de sols et des déchets". Cette démarche est actuellement discutée dans le cadre d'un projet de décret pour évaluer la dangerosité des déchets (Ministère de l'Environnement, 1997b). Cependant, celle-ci n'inclue pas les effets génotoxiques. Les tests biologiques permettant d'évaluer les matériaux sont, pour les essais aigus sur lixiviat *Vibrio fischeri* et *Daphnia magna* ; pour les essais chroniques sur lixiviat *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Ceriodaphnia dubia* et *Daphnia magna* (21 jours), et, pour les essais terrestres, les essais de germination et de croissance sur plantes ainsi que les tests de mortalité sur ver de terre (*Eisenia fetida*).

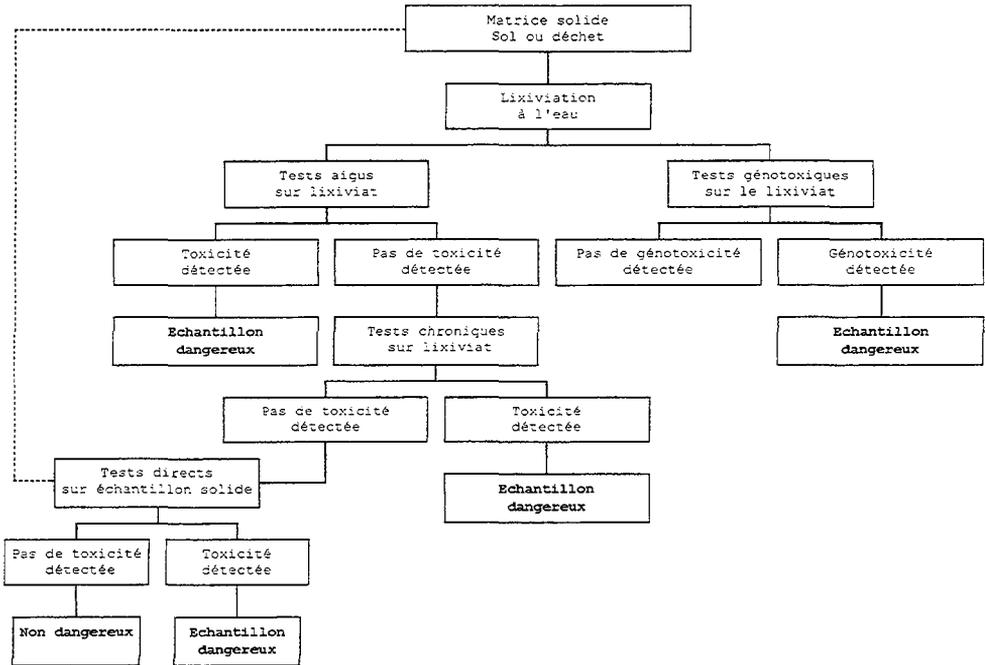


Figure 27. Organisation de la procédure de caractérisation du danger écotoxique lié aux matrices solides

L'enchaînement des différentes étapes et des différents tests permet de caractériser le danger toxique des échantillons solides pour les milieux aquatiques et terrestres mais ne permet pas de connaître la nature des polluants responsables de la toxicité. De même, il ne permet pas de décrire le comportement des polluants dans les matrices solides et d'anticiper sur leur devenir.

5.3.3 Nature des polluants responsables de la toxicité et comportement à long terme des matériaux évalués

La toxicité détectée sur les différentes matrices, par type d'extractant et de test, est regroupée dans le tableau 33.

Une hiérarchisation qualitative en classes de 1 à 6, des résultats a préalablement été réalisée à l'aide d'une échelle arbitraire de toxicité¹ :

- Non Toxique (1) : toxicité = 1 Ut
- Faiblement toxique (2) : 1 < toxicité < 10 Ut
- Moyennement Toxique (3) : 10 < toxicité < 30 Ut
- Toxique (4) : 30 < toxicité < 100 Ut
- Très Toxique (5) : 100 < toxicité < 1000 Ut
- Excessivement Toxique (6) : toxicité > 1000 Ut

Matrices	Extraits	Microtox®	Algue	Daphnie
S1	Eau	3	2	1
	Eau Acide	3	3	1
	Eau Basique	3	3	1
	Solvants organiques	5	5	4
S2	Eau	1	2	1
	Eau Acide	2	3	1
	Eau Basique	1	3	1
	Solvants organiques	5	6	5
D1	Eau	2	3	1
	Eau Acide	1	2	1
	Eau Basique	2	4	1
	Solvants organiques	3	1	2
D2	Eau	4	4	2
	Eau Acide	2	3	1
	Eau Basique	4	4	2
	Solvants organiques	5	6	1

Les cases grisées indiquent les classes supérieures à 3.

Tableau 33. Récapitulatif des toxicités mesurées sur les extraits des différentes matrices

Sur la base des conclusions obtenues lors de la caractérisation de la toxicité des matrices solides artificiellement contaminées (chapitre 4.3.1, tableau 21), la nature des polluants responsables de la toxicité mesurée dans les matrices industrielles peut être déterminée.

- **pour l'échantillon de terre S1** : Les extraits aqueux sont moyennement toxiques (classe 3) alors que les extraits organiques sont toxiques à très toxiques (classes 4 à 5). Il s'agit d'une toxicité liée à la présence de polluants organiques. Cependant le test MetPLATE présente une inhibition importante (supérieure à 98%) pour cet échantillon démontrant l'existence de métaux disponibles en solution. La toxicité peut donc être due à l'effet combiné d'éléments traces métalliques et de composés organiques.
- **pour l'échantillon de terre S2** : Les extraits aqueux ne sont pas toxiques et les extraits organiques sont très toxiques (classes 5 et 6) pour l'ensemble des tests et notamment le test sur les algues unicellulaires. Il s'agit d'une toxicité essentiellement liée à la présence de polluants organiques.
- **pour le déchet D1** : La toxicité de l'ensemble des extraits est relativement faible

¹ Cette échelle est calquée sur Bulich (1982) qui définit 6 catégories de toxicité comprises entre 1 et 100 Ut (classe 1 >100 Ut et classe 6 < 1 Ut). Elle a été modifiée pour tenir compte des toxicités élevées observées après certaines extractions, notamment à l'aide de solvants.

(classe maximale de 3), exception faite de l'extrait réalisé au tampon borate qui pourrait être due à la désagrégation de la matière organique du déchet sous l'action du pH basique. Le test MetPLATE présente une inhibition importante (supérieure à 70%) pour cet échantillon démontrant l'existence de métaux disponibles en solution. La toxicité peut être due à l'effet combiné d'éléments traces métalliques et de composés organiques.

- **pour le déchet D2** : Les extraits organiques sont beaucoup plus toxiques que les extraits aqueux (classes 5 et 6), ce qui a priori est révélateur d'une toxicité liée à des polluants organiques. Ce déchet provient d'un incinérateur d'ordures ménagères générant des cendres constituées, a priori, uniquement de matières minérales. La réponse observée peut s'expliquer par la présence des polluants organiques résistants ou néoformés à haute température. Les extraits aqueux présentent cependant une toxicité (classe 4) principalement liée au pH très élevé des lixiviats générés (les lixiviats neutralisés ou réalisés à pH 5 à l'aide du tampon phosphate présentent une toxicité très faible).

La comparaison des réponses des tests sur les différents types d'extractants peut donc renseigner sur la nature des polluants responsables de la toxicité observée. Cette démarche est à rapprocher de celle employée pour fractionner et identifier la toxicité des effluents (méthode TIE/TRE, US-EPA, 1989, 1991, 1992).

Les extractions complémentaires réalisées peuvent également renseigner sur la nature des interactions matrice/polluant et éclairer sur le comportement à long terme de la toxicité issue de cette matrice. L'emploi de solvants ou de protocoles d'extraction peu agressifs permet d'évaluer la fraction toxique des polluants échangeables, c'est-à-dire les polluants qui pourront être disponibles pour les êtres vivants sur le long terme. Cette démarche s'apparente aux extractions séquentielles développées en agriculture pour identifier les fractions polluantes ou nutritives disponibles pour les végétaux (Andreux *et al.*, 1991, Lebourg *et al.*, 1996, Fardeau, 1993, Morel, 1997a, 1997b, McLaren, 1998). D'après ce raisonnement, la quantité totale de polluants toxiques et/ou génotoxiques (quelle que soit leur nature) peut être segmentée et la toxicité et/ou la génotoxicité, liée à chaque compartiment, quantifiée (figure 28). La comparaison relative des réponses toxiques obtenues lors de la lixiviation à l'eau avec celles obtenues lors de lixiviations alternatives peu poussées (lixiviations au méthanol et à l'aide de tampons) permet ainsi d'explicitier les relations entre les constituants de la matrice et de prévoir la mobilité et la toxicité des polluants sur le long terme.

En appliquant ce raisonnement à l'échantillon de terre S2, la toxicité importante détectée dans les extraits méthanoliques par rapport à celle détectée dans les lixiviats aqueux laisse supposer la présence d'une fraction toxique (majoritairement liée à des polluants organiques mobilisés par l'extractant organique) peu disponible sur le court terme (polluants peu solubles ou liés à la matrice) mais potentiellement échangeable. Cette information peut être interprétée comme une fraction pouvant être relarguée instantanément si les conditions de milieu se modifient ou comme une réserve toxique, mobilisable sur le long terme. La première hypothèse est peu probable dans le cas de cette matrice puisque le relargage massif des polluants est du à l'emploi d'un solvant organique : conditions peu réalistes dans l'environnement bien qu'imaginables lors de l'emploi de tensio-actifs pour faciliter la dégradation bactérienne des polluants organiques *in situ*. Ces résultats peuvent alors être interprétés comme l'existence d'une réserve toxique mobilisable par à-coups successifs, à chaque nouvelle lixiviation. La toxicité mobilisée dans ces conditions, bien que faible, peut être disponible sur le long terme, générant un risque d'intoxication chronique. Dans le cas

présent, ce risque est d'autant plus considérable que la génotoxicité détectée sur les extraits aqueux est importante.

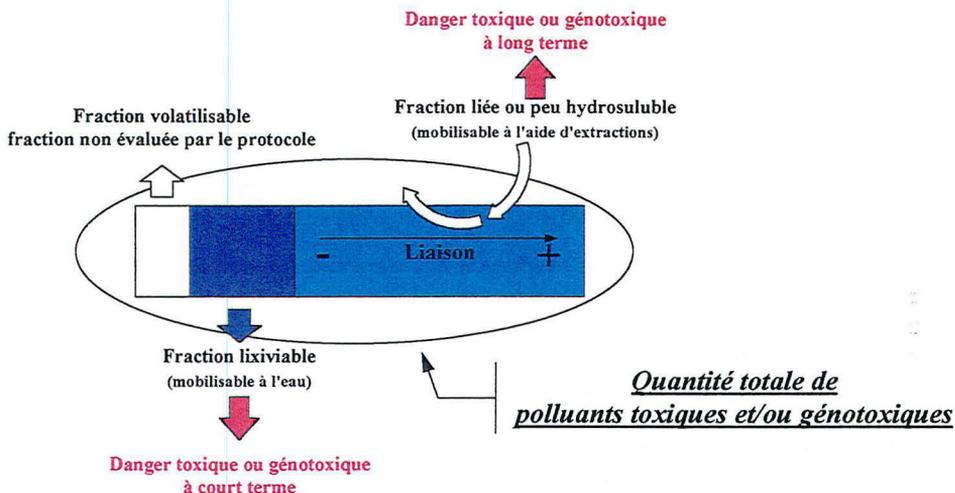


Figure 28. Compartimentation des fractions polluantes toxiques et interprétations en terme d'impact à court et long terme

L'analyse de l'ensemble des résultats, au travers du schéma de répartition des polluants abouti au tableau de synthèse 34. Il regroupe pour chaque matrice le danger toxique et génotoxique immédiat (toxicité liée aux fractions solubilisables à court terme par lixiviation à l'eau) et potentiel (toxicité liée aux fractions solubilisables par lixiviations alternatives et donc potentiellement disponibles sur le long terme, par lixiviation à l'eau).

	Danger immédiat		Danger potentiel
	Toxique	Génotoxique	Toxique
S1	Faible	Fort	Fort
S2	Faible	Moyen	Fort
D1	Faible	Fort	Faible
D2	Moyen	?	Fort

Danger toxique :
 Faible : toxicité dans le lixiviat < 30 Ut
 Moyen : 30 Ut < toxicité dans le lixiviat < 100 Ut
 Fort : 100 Ut < toxicité dans le lixiviat

Danger génotoxique :
 ? : non déterminé (pH trop élevé)
 Moyen : 1 < dilution seuil < 10%
 Fort : dilution seuil < 1%

Tableau 34. Interprétation, en termes de danger, des résultats obtenus sur les matrices industrielles

Pour l'ensemble des matrices, le danger toxique immédiat est faible alors que le danger à long terme (présence d'une réserve polluante, potentiellement mobilisable) est important pour les matrices S1, S2 et D2. *A contrario*, le danger génotoxique immédiat est prépondérant sur les matrices S1, S2 et D1. Ces matrices présentent donc un danger pour le long terme, tant du point de vue de la réserve toxique contenue dans les matrices que de celui de la nature du danger (intoxication chronique et interactions avec le génome).

5.4 Conclusion

Les différents essais réalisés ainsi que leur confrontation avec des résultats obtenus sur des essais terrestres permettent de définir deux procédures de caractérisation du danger toxique et génotoxique lié aux polluants contenus dans les échantillons solides¹. Les deux démarches proposées doivent être conservées mais n'ont pas la même finalité.

La première démarche, qui intègre des essais réalisés sur lixiviat et sur échantillon solide, est utilisable pour caractériser et hiérarchiser le danger lié aux polluants des matériaux solides, pour les systèmes terrestres et aquatiques. Elle ne permet pas d'explicitier la nature des relations entre la matrice et les polluants ni d'appréhender le devenir de la toxicité.

La seconde démarche permet par le couplage d'une étape d'extraction avec différents tests biologiques, non seulement de caractériser le danger lié aux polluants des matériaux solides (échantillons de terre et de déchets) mais également d'identifier la nature des polluants responsables de la toxicité, d'évaluer la nature du danger (toxique ou génotoxique) et son amplitude, pour finalement décrire les relations matrice/polluant et prévoir les évolutions à long terme. Cependant, cette caractérisation repose sur l'étape de lixiviation, modèle simplifié (statique) des conditions de lixiviation rencontrées *in situ*. De plus, la caractérisation réalisée reste ponctuelle : la toxicité de ces matrices peut se modifier dans le temps, en fonction des conditions biotiques ou abiotiques dans lesquelles sont placées les matériaux contaminés.

Deux questions subsistent :

1. Peut-on réellement prédire la toxicité sur le long terme à l'aide de ces outils de lixiviation statiques au laboratoire ? En d'autres termes, les hypothèses décrites sur la réserve toxique ou génotoxique des matrices peuvent-elles être confirmées ou infirmées ?
2. Que devient la toxicité de la matrice lors de son vieillissement ? En effet, la toxicité des échantillons est caractérisée à un instant donné mais aucune information n'est disponible ensuite lors de l'évolution de cette matrice (dégradation physico-chimique, biologique..).

¹ Le problème de l'échantillonnage des matériaux solides n'a pas été abordé dans le cadre de cette recherche. Il convient de signaler l'importance de cette étape puisque c'est elle qui définit la représentativité de l'échantillon et conditionne l'interprétation et l'extrapolation ultérieure des résultats.

VI. Comportement des polluants et devenir de la toxicité en essais dynamiques

6. Comportement des polluants et devenir de la toxicité en essais dynamiques

Jusqu'à présent, la mobilité et la toxicité des polluants des différentes matrices ont été appréhendées à travers les essais de lixiviation à l'eau ou à l'aide d'autres solvants. Lors des essais de lixiviation statiques par agitation du mélange eau/matériaux, l'eau d'extraction peut être saturée : les polluants migrent dans la limite de leur solubilité, leur mobilité et leur toxicité s'en trouvent alors sous estimées. Une information complémentaire est obtenue par l'utilisation de lixiviations au méthanol et à l'aide de tampons phosphate ou borate, qui permettent d'estimer la réserve polluante potentiellement toxique de la matrice. La toxicité observée sur les lixiviats, notamment ceux réalisés avec du méthanol a été interprétée comme l'existence d'une menace à long terme pour les écosystèmes, la matrice présentant une charge toxique mobilisable à chaque nouvelle lixiviation ou si les conditions de milieu se modifient. Ces essais statiques présentent l'avantage d'être rapides et simples d'application mais restent peu représentatifs des conditions naturelles de lixiviation sur le terrain. En effet, les phénomènes rencontrés *in situ* sont de nature dynamique, la pluie imbibé la matrice (sol ou déchet) puis percole de la surface vers la profondeur de l'échantillon considéré : le fluide percolant est renouvelé à chaque nouvelle lixiviation. Ces essais peuvent être reproduits au laboratoire par le biais d'essais en colonnes dans lesquelles sont placées les matrices à tester et où elles subissent la migration d'un fluide percolant. Ces expériences doivent également permettre de simuler la dégradation des polluants en conditions saturées et d'étudier le devenir de la toxicité, en conditions biotiques ou abiotiques.

6.1 Matériel et méthode

Pour ces expériences en colonne, l'échantillon terreux S1 a été sélectionné. Il présente l'intérêt d'être contaminé à la fois par des éléments en traces métalliques et des polluants organiques. Il est ainsi possible, sur un même échantillon, de suivre le comportement, dans la colonne de ces deux types de polluants.

Deux expériences en colonnes ont été menées sur cet échantillon : un essai de percolation gravitaire (avec une quantité d'échantillon introduite de 30 kg) et un essai de dégradation en colonne, avec flux ascendant (pour des quantités maximales de 80 g).

6.1.1 Caractéristiques et remplissage des colonnes

Le tableau 35 présente les caractéristiques des colonnes utilisées.

	Essai de percolation gravitaire	Essai de dégradation
Nature de la colonne	Plexiglas [®]	Verre
Quantité de matrice	30 kg	Jusqu'à 80 g
Dimensions	H : 80 cm, D : 37 cm	H : 18 cm, D : 3,5 cm
Sens du flux	Gravitaire	Ascendant
Tubulure entrée et sortie	Polyéthylène	Téflon [®]
Filtration en sortie	Filtre à sable (4 cm)	Laine de roche

Tableau 35. Caractéristiques des colonnes utilisées

Les figures 29 et 30 présentent ces colonnes.

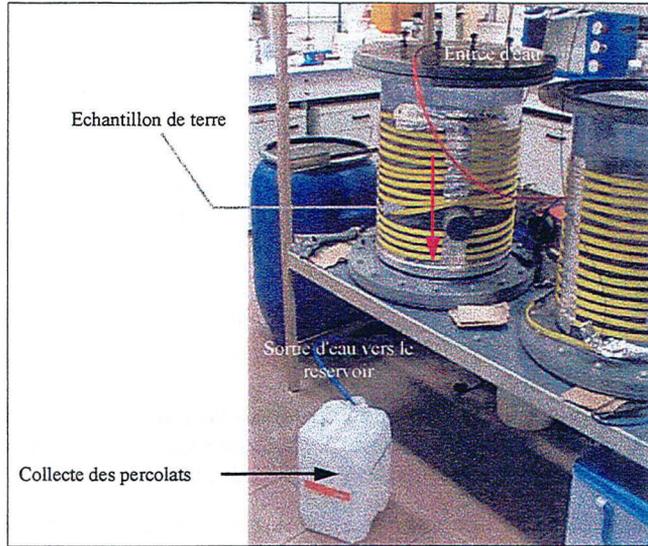


Figure 29. Colonne de percolation gravitaire

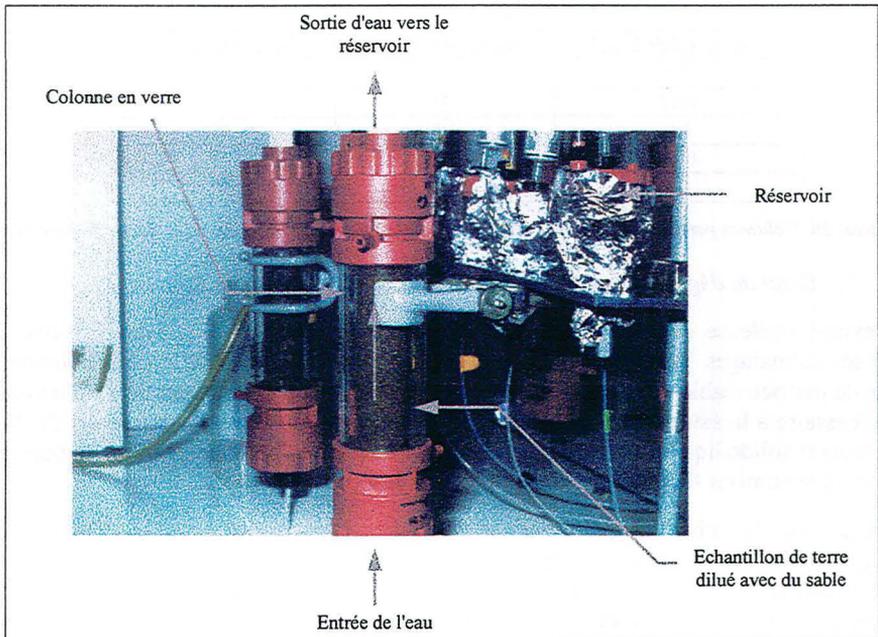


Figure 30. Colonne de percolation en flux ascendant

6.1.2 Fonctionnement et suivi des colonnes

a) Essai de percolation gravitaire (colonne non saturée)

La matrice est introduite dans la colonne sur un lit de sable (5 cm de hauteur) préalablement lavé à l'eau distillée. L'apport d'eau se fait en tête de colonne par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique fonctionnant en discontinu grâce à un programmeur, à raison d'une heure par jour à 26 ml/min, soit 10 litres par semaine. La circulation gravitaire de l'eau dans la colonne simule les conditions du terrain mais induit inévitablement le risque d'avoir des chemins préférentiels de l'eau à travers le matériau percolé (le long des parois, dans les interstices de l'échantillon, le long de microcavités...); toute la matrice n'est alors pas également explorée.

La percolation de l'eau est poursuivie jusqu'à l'obtention d'un rapport massique "solide/liquide percolé" de 1/10, correspondant à celui utilisé pour la lixiviation. Les percolats sont récupérés en sortie de colonne : les volumes collectés sont mesurés quotidiennement et stockés à 4°C à l'obscurité avant réalisation des analyses chimiques, des tests biologiques de toxicité et de génotoxicité. Ceux-ci sont réalisés sur les percolats moyens (mélange des différents volumes collectés entre deux durées de percolation).

La quantité d'échantillon S1 introduite dans la colonne est de 30 Kg. Contrairement aux essais de lixiviation où le rapport sol/eau reste constant et égal à 1/10, celui-ci est différent en fonction de la durée de percolation. Le tableau 36 renseigne sur les quantités percolées et les différents points de prélèvement réalisés après 2, 9, 15, 21 et 30 semaines pour le sol S1.

Rapport solide/liquide	Volume percolé (litres)	Durée (semaines)
1,5	20	2
0,33	91	9
0,2	150	15
0,14	214	21
0,1	300	30

Tableau 36. Volumes percolés et rapports massiques solide/liquide en fonction de la durée de percolation

b) Essai de dégradation en colonne (flux ascendant, colonne saturée)

La texture argileuse de l'échantillon S1 nécessite une dilution au ¼ avec du sable afin d'éviter les colmatages, la montée en pression et la destruction éventuelle de la colonne. La quantité de matrice (sable + S1) introduite est de 80 g par colonne, soit 20 g de S1. Le volume d'eau nécessaire à la saturation de la matrice et à la circulation dans le système est de 70 ml soit un rapport solide/liquide voisin de 1 au départ. Cet essai en colonne noyée a été dupliqué, il permet de maximiser l'évolution (la dégradation) de l'échantillon.

Afin d'éviter les chemins préférentiels rencontrés lors d'un écoulement gravitaire de l'eau, et d'augmenter la vitesse de dégradation, les colonnes ont été noyées par l'utilisation d'une alimentation par le bas (circulation ascendante), sous pression, régulée par une pompe péristaltique. Avant son entrée en tête de colonne, l'eau peut être saturée en air ou en azote suivant la colonne. Cette alimentation en gaz peut également être supprimée pour les réacteurs en circuit fermé. En sortie de colonne, l'eau est dégazée dans un réservoir avant d'être ré-injectée en tête de colonne. Ce réservoir permet également le prélèvement régulier du percolat et l'apport d'eau compensant ce prélèvement (figure 31). A l'équilibre, le volume total d'eau circulant dans chaque colonne est de 80 ml.

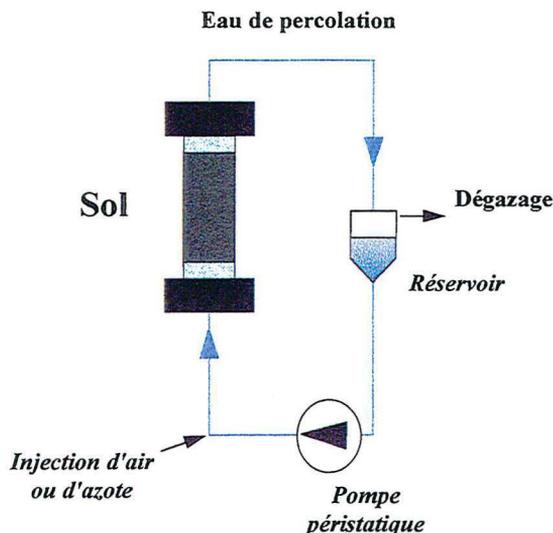


Figure 31. Schéma de principe du montage pour une colonne

L'alimentation en gaz et la température (tableau 37) imposées aux colonnes créent différentes conditions permettant d'étudier le devenir de la toxicité en fonction de l'évolution des matrices.

Colonne	Objectif d'étude	Type de système	Gaz introduit	Température
1	Témoin	Fermé	-	4 ± 1 °C
2	Volatilisation	Ouvert	Azote	4 ± 1 °C
3	Anaérobie	Fermé	-	Ambiante (20 ± 5 °C)
4	Aérobie	Ouvert	Air	Ambiante (20 ± 5 °C)

Tableau 37. Conditions environnementales des réacteurs

Chaque colonne simule des conditions différentes :

- l'activité biologique de la colonne *témoin* (fermé, à 4°C) doit être minimale. La mesure de la toxicité étant un paramètre de suivi, il n'est pas possible d'introduire des inhibiteurs biologiques toxiques comme le chlorure mercurique ou des biocides. L'option choisie est de maintenir la colonne à + 4°C (température limitant la prolifération microbienne). De plus, aucune alimentation en gaz n'étant réalisée, les phénomènes de volatilisation sont limités.
- la colonne *volatilisation* est également maintenue à + 4°C, sous un courant d'azote. Elle doit simuler en l'absence de dégradation bactérienne, les pertes dues à la volatilisation des polluants.
- la colonne *anaérobie* est maintenue à température ambiante, en système fermé pour simuler la dégradation anaérobie des polluants.
- la colonne *aérobie* est maintenue à température ambiante, sous un courant d'air pour simuler la dégradation anaérobie des polluants.

Après remplissage des colonnes, la percolation est démarrée pendant 24 h afin d'humidifier complètement l'échantillon introduit et de permettre l'installation des différentes conditions d'étude. Le premier prélèvement est alors réalisé. Les prélèvements sont effectués dans le réservoir de dégazage. La fréquence des prises d'échantillon (notées P1 à P8) est différente en début et en fin d'expérience (voir tableau 38).

Durée (jours)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Remplissage	■																												
Démarrage	■																												
Stabilisation	■																												
Prélèvements		P1		P2		P3			P4			P5							P6								P7		P8
Démontage																													■

Tableau 38. Liste des prélèvements effectués par colonne

Le volume prélevé (15 ml) est remplacé dans le système par de l'eau ultra-pure préalablement dégazée à l'azote pour éviter un apport d'oxygène. Ces prélèvements successifs occasionnent une réintroduction d'eau et engendrent une dilution des polluants dans le système :

- soit x (en mg/l) la concentration d'un polluant dans le système à l'équilibre (80 ml d'eau),
- la quantité de polluants dans le système à l'équilibre est donc égale à $[(80.x)/1000]$ mg,
- le premier prélèvement (15 ml) soustrait au système une quantité $[(15.x)/1000]$ mg de polluant,
- la quantité de polluant restant dans le système est donc égale à $[(80-15).x/1000]$ mg,
- en complétant le volume à 80 ml par ajout d'eau dégazée, la concentration est alors égale à $[65.x/80]$ mg/l,

Ainsi, la concentration d'un polluant non interactif dans le système après n prélèvements est égale à :

$$[C]_{P_n} = x \left[\frac{V - V_p}{V} \right]^n$$

où : $[C]_{P_n}$: concentration dans le système après n prélèvements

x : concentration initiale dans le système, avant tout prélèvement,

n : nombre de prélèvements

V : volume total d'eau dans le système

V_p : volume prélevé

6.1.3 Analyses physico-chimiques

Différents paramètres ont été suivis sur les percolats issus des dispositifs de percolation gravitaire et sur les prélèvements réalisés dans le réservoir des essais de dégradation. Il s'agit de paramètres physico-chimiques globaux et de paramètres chimiques spécifiques choisis en fonction des concentrations mesurées sur les matériaux.

a) Paramètres globaux

Les paramètres globaux concernent le suivi des deux percolations (essai de percolation gravitaire et essai de dégradation). Le pH, le rH ont été suivis pour les 2 essais de percolation. Compte tenu du faible volume récupéré (15 ml) lors des essais de dégradation, il n'a pas été possible de mesurer d'autres paramètres chimiques.

b) Paramètres de suivi des colonnes en en percolation gravitaire

Les traceurs chimiques spécifiques choisis sont :

- des métaux (Cr, Cu, Pb, Zn et Cd), obtenus après minéralisation du percolat, et dosage en émission atomique
- le carbone organique dissous
- des composés organiques chlorés (PCB, des congénères Arochlor 1242, 1254, 1260) obtenus par extraction liquide/liquide et quantification en CG-ECD
- les composés halogénés adsorbables (ou AOX), obtenus par adsorption sur du charbon actif et dosage par microcoulométrie.

6.1.4 Tests biologiques de toxicité et de génotoxicité

Pour les essais en percolation gravitaire, le suivi régulier de la toxicité des percolats issus des colonnes a été réalisé par l'intermédiaire du test Microtox[®]. La toxicité des percolats intégrés a été complétée par la batterie de tests précédemment définie :

- *Daphnia magna*,
- *Pseudokirchneriella subcapitata*,
- *Vibrio fischeri* M169 (Test Mutatox[®]).

En complément, dans le cadre de cette étude, les mêmes percolats ont été également analysés à l'aide des tests d'Ames (*Salmonella typhimurium*) et Micronoyaux Amphibiens (*Xenopus laevis*), respectivement par le CSE de Metz et l'UPS de Toulouse.

Les volumes prélevés (15 ml) lors de l'essai de dégradation des matériaux sont insuffisants pour la réalisation de la batterie de tests biologiques ; seul le test Microtox[®] en phase liquide a été utilisé. La toxicité de l'échantillon solide a été déterminée avant et après dégradation (état initial et état final) à l'aide du test Microtox[®] en phase solide. Le test Mutatox[®] a également été réalisé en début et en fin de suivi sur les échantillons après lixiviation à l'eau (rapport solide/liquide 1/10, pendant 2 h, suivie d'une décantation de 12 h).

6.2 Résultats

Les résultats sont présentés en fonction de l'essai réalisé (colonne lysimétrique et essais de dégradation en colonne).

6.2.1 Essais en colonne lysimétrique

a) Suivi chimique

Le suivi des différents paramètres chimiques des percolats issus de la colonne contenant l'échantillon S1 est présenté dans le tableau 39. Il regroupe les paramètres physico-chimiques globaux et les paramètres spécifiques.

Durée de percolation		2 semaines	9 semaines	15 semaines	21 semaines	30 semaines
Rapport massique solide/liquide		1.5	0.33	0.2	0.14	0.1
Paramètres Globaux	pH	7,01	7	7	6,85	6,85
	rH (mV)	22,9	23	25	20	20
	Conductivité (mS/cm)	2,41	0,85	0,53	0,46	0,46
	COT (mg/l)	1152	280	58,5	33	24
Métaux (mg/l)	Cd	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
	Cu	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
	Cr	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
	Pb	0,6	0,28	0,1	<0,05	<0,05
	Zn	10,35	2,5	2,5	1,2	1,2
PCB (µg/l)	Arochlor 1242	29,2	17	1,8	1,5	3,4
	Arochlor 1254	2,2	5,5	2,2	1,6	2,7
	Arochlor 1260	3,6	3,1	0,2	0,1	0,2
	28	-	0,6	0,07	0,04	0,02
	52	2	-	0,04	0,03	0,05
	101	0,2	-	0,06	0,001	0,05
	118	0,9	1,4	0,09	0,2	0,2
	153	0,06	0,13	0,02	-	-
	138	0,07	0,04	0,03	0,004	0,04
	128	0,03	-	0,002	0,05	-
	180	-	0,07	-	0,001	-
170	0,003	-	0,2	0,1	-	
AOX (µg/l)		3347	6443	7067,5	880	255

Tableau 39. Concentration des polluants dans les différents percolats du sol S1

Le pH et le rH des percolats collectés évoluent très peu tout au long du suivi : il n'y a pas de phases d'anaérobie, ni d'acidification de la colonne. La mesure de la conductivité montre une diminution de la concentration des éléments en solution.

Concernant les éléments en traces métalliques, seul le zinc et le plomb sont détectés lors du suivi : les concentrations des autres métaux en solution sont inférieures aux limites de détection.

Les concentrations en zinc, en matières carbonées dissoutes (COT), et en composés halogénés adsorbables (AOX) diminuent dans les percolats en fonction de la durée de percolation. La diminution du zinc et du carbone en solution est continue et progressive alors que la teneur des composés halogénés adsorbables augmente en début de suivi, entre la seconde et la 9^{ème} semaine, leur concentration passe de 3350 à plus de 6000 µg/l, se stabilise entre la 9^{ème} et la 15^{ème} semaine avant de décroître progressivement lors des deux derniers prélèvements.

En fonction du type d'Arochlor suivi, le profil de concentration obtenu dans les percolats est très différent. Les concentrations en Arochlor 1242 et 1260 diminuent d'un facteur 10 au cours du temps de suivi, passant d'une valeur de 30 µg/l à une valeur de 3 µg/l pour l'Arochlor 1242 alors que dans le même temps, la concentration en Arochlor 1254 est restée constante dans les différents percolats collectés (voisine de 3 µg/l).

Les différences enregistrées sur les concentrations détectées ne renseignent pas sur la migration des polluants dans la colonne. Cette migration et donc la mobilité des différents polluants peut être mieux appréhendée par le suivi des quantités exportées. En effet, connaissant la concentration moyenne des percolats et le volume total percolé pour chaque point de prélèvement, il est possible de calculer, entre chacun de ces points, les quantités de polluants relarguées par le sol. Ces données, pour les paramètres suivis, sont présentées dans le tableau 40.

	2 semaines	9 semaines	15 semaines	21 semaines	30 semaines	Total exporté
Rapport solide/liquide	1.5	0.33	0.2	0.14	0.1	
COT (en g)	23,0	19,6	3,5	2,0	2,1	50,2
Zn (en mg)	207,0	177,1	150,0	74,4	105,3	713,8
AOX (en mg)	66,9	451,0	424,1	52,8	23,0	1017,7
Arochlor 1242 (en µg)	584,0	1190,0	109,2	88,7	306,0	2277,9
Arochlor 1254 (en µg)	43,6	385,0	134,4	95,4	246,6	905,0
Arochlor 1260 (en µg)	71,2	219,8	10,8	8,4	14,4	324,6

Tableau 40. Quantités de carbone et de polluants exportés (Zn, AOX, Arochlor 1242,1254 et 1260) lors de la percolation de la terre contaminée S1

Deux comportements sont identifiables : le carbone dissous et le zinc sont exportés dès le début du suivi (2^{ème} semaine) alors que le front de sortie des AOX et des Arochlor se situe entre la 9^{ème} et la 15^{ème} semaine.

b) Suivi écotoxique

Les résultats du suivi régulier des percolats sur le sol S1, réalisé à l'aide du test Microtox est présenté dans la figure 32.

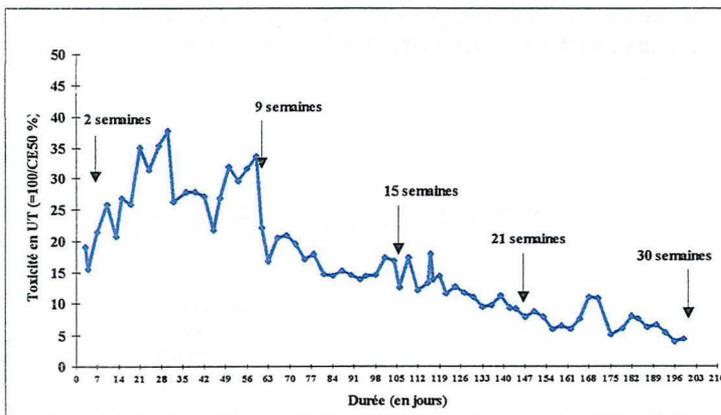


Figure 32. Evolution de la toxicité des percolats de la colonne de terre S1 (test Microtox®)

Ce suivi montre une augmentation de la toxicité sur les 9 premières semaines de percolation suivie d'une lente diminution. La toxicité résiduelle après 30 semaines étant d'environ 5 UT soit une CE₅₀ de 20 %. La toxicité ne franchit le seuil des 10 Ut (soit une CE₅₀ de 10%) qu'après une durée d'environ 21 semaines.

Les percolats ont également été analysés à l'aide de la batterie constituée des tests

Daphnia magna, *Pseudokirchneriella subcapitata*, et *Vibrio fischeri* M169 (Mutatox®). Le tableau 41 présente les réponses obtenues par ces tests biologiques sur l'ensemble des percolats moyens collectés. Les valeurs sont exprimés en Ut pour les tests aigus et chroniques, en seuil de positivité et en facteur d'amplification pour le test Mutatox®.

Durée de percolation	2 Semaines	9 Semaines	15 Semaines	21 Semaines	30 Semaines
Rapport solide/liquide	1,5	0,33	0,2	0,14	0,1
Daphnies	1	Non toxique	non toxique	non toxique	non toxique
Algues	100	20	3	non réalisé	6
Microtox®	33	33	17	10	6
Mutatox® (facteur d'amplification)	9	19	3	3	-
Mutatox® (seuil de positivité, %)	5%	45%	100%	100%	Suspect

Tableau 41 . Réponse de la batterie de tests aux les percolats collectés

Quel que soit le test utilisé, la toxicité des percolats diminue avec la durée de percolation. Contrairement aux tests sur algues unicellulaires sur *Pseudokirchneriella subcapitata* et Microtox® (*Vibrio fischeri*), le test utilisant *Daphnia magna* ne détecte aucune toxicité dans les différents percolats. Pour les deux premiers tests, cette toxicité diminue progressivement jusqu'à atteindre une valeur comprise entre 10 et 20%.

La toxicité détectée s'accompagne de génotoxicité : le test Mutatox® met en évidence la présence de polluants à caractère mutagène, et ce, dans l'ensemble des percolats.

6.2.2 Essais de dégradation en colonne

a) Suivi Chimique

Le suivi chimique a été réalisé par mesure du pH et du rH à chaque prélèvement. Ce suivi est présentés dans les figures 33 et 34, par les points moyens obtenus sur les duplicats. Les écarts types des duplicats sont systématiquement inférieurs à 10%.

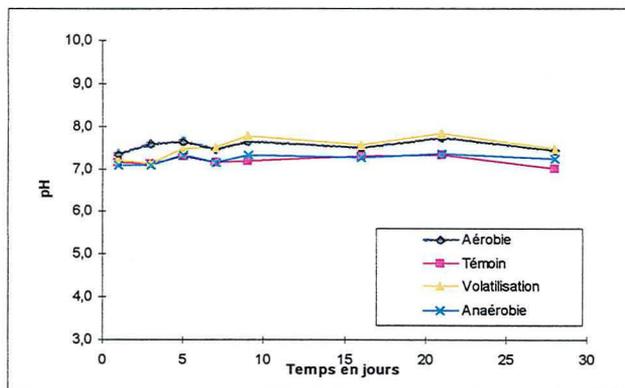


Figure 33. Suivi du pH, dans chaque colonne, pour le sol S1

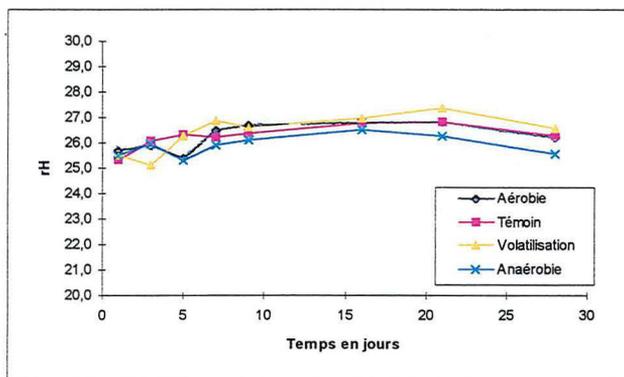


Figure 34. Suivi du rH, dans chaque colonne, pour le sol S1

Le suivi de ces paramètres physico-chimiques ne montre aucune différence entre les différentes colonnes : les pH sont compris entre 7 et 7.6 alors que le rH reste voisin de 26 mV.

b) Suivi écotoxique des percolats

Les valeurs de toxicité mesurées au cours du suivi, pour chaque duplicat, sont différentes en raison de la quantité initiale de toxicité libérée le premier jour. Ces disparités peuvent s'expliquer par le remplissage des colonnes et par l'efficacité de la filtration sur laine de roche.

La répartition dans la colonne de l'échantillon testé et du diluant (sable) n'est pas homogène entre les colonnes : lors du remplissage par tranches successives, le mélange échantillon/sable sec est versé à l'intérieur du cylindre en verre et réparti par une légère agitation de la colonne. Cette agitation fait que les particules fines de l'échantillon S1 ont tendance à se regrouper dans le bas du profil contrairement au sable qui reste en surface de la tranche constituée. De même, en sortie de colonne, la laine de roche utilisée n'agit pas à proprement parler comme un filtre : l'enchevêtrement des fibres fait qu'elle retient plus ou moins les particules. En fonction des colonnes, certaines peuvent laisser passer plus ou moins de matières en suspension lors de l'étape de mise en équilibre.

Ainsi, pour le suivi de la toxicité, les valeurs obtenues pour chaque point de prélèvement ont été transformées en pourcentage par rapport au point initial (premier prélèvement). Ce suivi est présenté en figure 35, par les points moyens obtenus sur les duplicats. La courbe simulant la dilution théorique de la toxicité due aux prélèvements et aux ajouts compensatoires de volume (en appliquant la formule définie dans le chapitre 6.1.2.2) est également présentée.

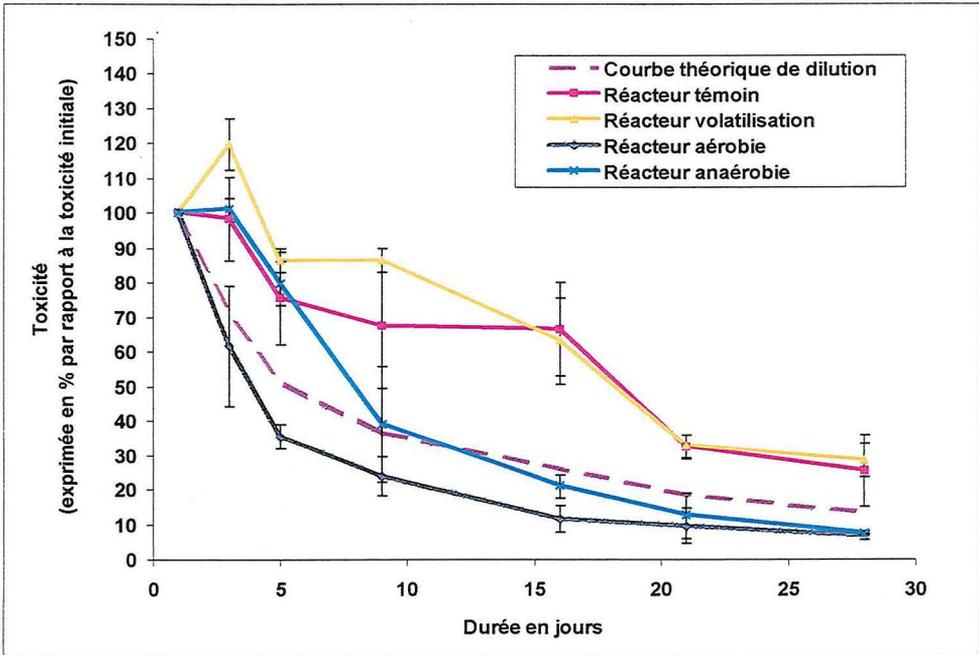


Figure 35. Suivi de la toxicité (exprimée en % de la toxicité initiale) dans différentes conditions environnementales pour le sol SI

Un abattement important de la toxicité (plus de 90%) a eu lieu dans les traitements biologiques alors que les réacteurs abiotiques conservent en fin de suivi une toxicité élevée (plus de 20% de la toxicité initiale). L'évolution de la toxicité permet d'identifier deux comportements différents : celui observé avec les colonnes placées en conditions abiotiques (réacteurs témoin et volatilisation, à + 4°C) et celui des deux autres colonnes, susceptibles de développer une activité biologique (réacteurs aérobic et anaérobic, placés à 20 ± 5°C) :

- dans les réacteurs témoin et volatilisation, la toxicité reste supérieure à la toxicité théorique liée à la dilution.

- dans les réacteurs simulant la biodégradation aérobic et anaérobic, la toxicité diminue plus vite que la chute théorique due à la dilution. Pour le réacteur simulant une dégradation anaérobic, cette réduction n'est pas immédiate ; un temps de latence (environ 9 jours) est nécessaire. Après cette période, la toxicité mesurée sur ce réacteur est inférieure à la toxicité théorique. Au contraire, pour la colonne simulant la biodégradation aérobic, la réduction de la toxicité est immédiate et s'amplifie au cours du suivi.

La toxicité observée sur chaque modalité peut être comparée avec celle de la colonne témoin en réalisant des corrélations linéaires. Ainsi, un comportement identique au témoin se traduit par une droite de régression proche de $y = x$. Les paramètres des corrélations obtenues pour les duplicats sont rapportés dans le tableau 42.

		Réacteurs		
		Volatilisation	Anaérobie	Aérobie
Essai 1	Pente	1	1,25	0,9
	Ordonnée à l'origine	6,7	-27,7	-19,4
	Coefficient de corrélation	0,85	0,9	0,7
Essai 2	Pente	1,1	1,2	1
	Ordonnée à l'origine	-2,25	-31,7	-36,5
	Coefficient de corrélation (r^2)	0,9	0,7	0,7

Pente : pente de la droite de régression

Tableau 42 . Paramètres des régressions linéaires réalisées entre le réacteur témoin et les autres réacteurs (volatilisation, biodégradation aérobie et anaérobie)

Les coefficients de corrélation des régressions linéaires obtenues pour l'échantillon S1 varient entre 0,7 et 0,9. Les pentes obtenues par régression linéaire, sur les 2 essais, quels que soient les réacteurs, restent voisines de 1 (comprises entre 0,86 et 1,25). Les différences enregistrées portent sur les ordonnées à l'origine qui varient suivant les traitements de -36,5 à 6,6. En supposant les pentes égales à 1, les comportements des différents réacteurs peuvent être modélisés par rapport au réacteur témoin par leur ordonnée à l'origine. En moyenne, par rapport à la colonne témoin, pour les deux réplicats :

- la colonne de volatilisation réagit comme le témoin, l'écart par rapport au témoin étant compris entre 6.6 et -2.25 %,
- la colonne de biodégradation aérobie permet une diminution de la toxicité comprise entre 19.4 et 36.5%,
- la colonne de biodégradation anaérobie permet une diminution de la toxicité comprise entre 27.7 et 31.7%.

c) Bilan écotoxique et génotoxique des essais de dégradation

La caractérisation de la toxicité et de la génotoxicité des différentes colonnes a été réalisée après le 28^{ème} jour de suivi sur le contenu de chaque colonne à l'aide des test Microtox[®] en phase solide et Mutatox[®]. La toxicité, exprimée en Ut, détectée par le test Microtox[®] en phase solide sur le contenu de chaque colonne est comparé sur la figure 36 à la toxicité de l'échantillon initial (S1 initial).

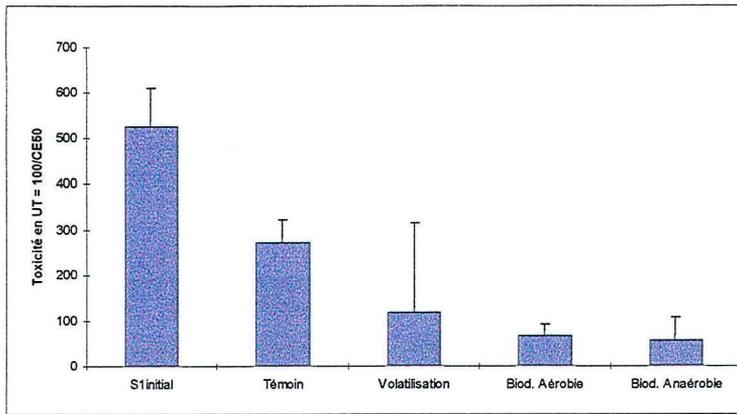


Figure 36. Toxicité en phase solide de l'échantillon de terre S1 avant (S1 initial) et après les essais de comportement

La toxicité mesurée en phase solide présente le même profil que celle obtenue en phase liquide. La toxicité enregistrée par ce test en contact direct après 28 jours confirme les résultats de la phase liquide : seuls les traitements biologiques présentent une réduction de la toxicité. L'abattement constaté sur ces réacteurs simulant des activités biologiques est cependant moins important que celui observé en phase aqueuse (la toxicité résiduelle pour les traitements biotiques reste voisine de 100 Ut).

La figure 37 présente la génotoxicité mesurée par le test Mutatox[®] avant (S1 initial) et après les essais de comportement, pour les différentes colonnes.

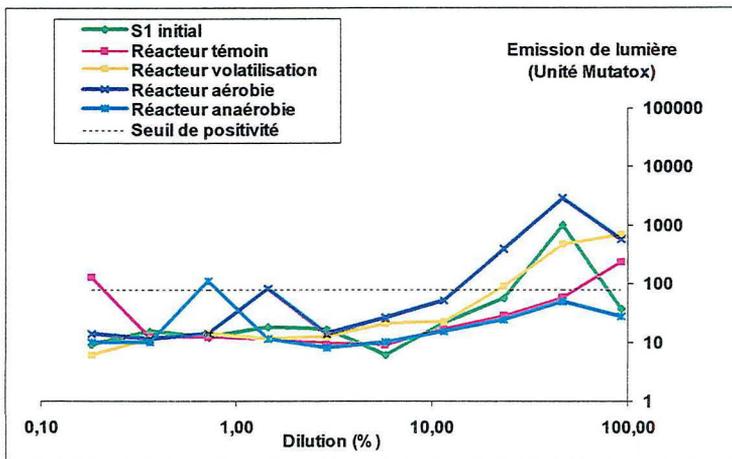


Figure 37. Génotoxicité de l'échantillon de terre S1 avant (S1 initial) et après les essais de comportement

Les résultats démontrent que la génotoxicité s'est maintenue sur cette matrice pour les réacteurs témoin, volatilisation et aérobie. Cette génotoxicité est accrue sur ce dernier traitement : l'émission de lumière est multipliée par 3 par rapport à l'extrait initial (avant tout traitement).

6.3 Discussion

Les essais réalisés en colonne doivent permettre de caractériser le comportement à long terme de l'échantillon de terre S1 et de le comparer à la prévision préalablement établie à l'aide du protocole de caractérisation du danger écotoxique et génotoxique. L'étude du comportement de l'échantillon S1 sera discuté en termes de mobilité et de toxicité des polluants à long terme, et, de devenir de la réponse toxique lors de l'évolution biotique ou abiotique de l'échantillon.

a) Suivi de la mobilité et de la toxicité des polluants de l'échantillon de terre S1 en percolation gravitaire

L'essai en colonne par percolation gravitaire permet d'approcher les conditions de migration des polluants dans un profil de sol. Les polluants suivis lors de cette percolation gravitaire ne présentent pas le même comportement à la migration : les polluants les plus solubles comme la matière carbonée et le zinc sont exportés dès le début de la percolation ; leur solubilisation et leur migration sont immédiates. Les apports successifs d'eau continuent à épuiser le stock mais les 2 premières semaines constituent pour le COT 50% de la part totale exportée et environ 30 % pour le zinc. A l'inverse, les polluants les moins solubles ou liés aux particules en suspension (Arochlor et AOX) ne sont entraînés qu'après les premières semaines de percolation : pour les AOX, par exemple, les deux premières semaines constituent seulement 6 % de la part totale exportée. Pour ces derniers, comme pour les Arochlor, les volumes percolés par la suite permettent leur migration, ce qui pourrait être mis en relation avec une déstructuration plus importante de l'échantillon qui relarguerait alors plus de colloïdes ou particules fines, ou bien avec le temps de latence nécessaire à la mise en place de phénomènes de dégradation permettant la mobilité des polluants dans la colonne par digestion de la matière organique ou production de biosurfactants. L'observation de l'activité bactérienne de la colonne de terre pourrait améliorer le dispositif de suivi.

Les polluants présentent des cinétiques de relargage différentes, sur la base des molécules suivies, la composition des percolats varie en fonction des prélèvements réalisés. Après les 2 premières semaines, les percolats contiennent plus de polluants organiques que métalliques. La comparaison des concentrations en polluants des percolats avec la toxicité et la génotoxicité mesurée peut permettre d'expliquer leur origine. Ainsi, la superposition du suivi régulier de la toxicité avec les concentrations en AOX laisse supposer que la toxicité mesurée pourrait être due à des composés halogénés. Cependant, la toxicité décroît à partir de la 9^{ème} semaine alors que les concentrations en AOX sont stables jusqu'à la 15^{ème} semaine. La liaison entre la toxicité et les polluants responsables est d'autant plus difficile à établir que tous les polluants ne sont pas suivis. En effet, compte tenu des différences de concentrations mesurées sur les percolats entre les AOX (de 255 à 7000 µg/l) et les PCB (moins de 2 µg/l), il semble évident que d'autres composés halogénés sont responsables des concentrations en AOX mesurées : des pesticides organochlorés comme le lindane ont par exemple été détectés en CG-MS. De plus, la toxicité peut être liée à une combinaison de polluants qui même à des concentrations faibles peuvent générer un effet.

Finalement, la toxicité des différents percolats obtenus au cours du suivi montre une lente décroissance. Cependant, après 30 semaines de percolation (à raison de 10 litres par semaine), l'échantillon S1 continue à générer des percolats chargés en polluants (AOX et Zinc notamment) et susceptibles de provoquer des réponses toxiques aiguës, chroniques et génotoxiques. Concernant la génotoxicité des percolats, celle-ci a été confirmée par les tests

biologiques d'Ames et micronoyaux sur xénopé (Vasseur *et al.*, 1998). L'échantillon de terre S1 présente donc un danger pour l'environnement, tant du point de vue des polluants relargués qui génèrent des effets toxiques et génotoxiques que du point de vue de la durée sur laquelle il est susceptible de maintenir cette action délétère (pour mémoire, le volume percolé durant les 30 semaines de percolation correspond à la pluviométrie lorraine moyenne cumulée sur 3 ans). Le danger à long terme pronostiqué lors de la réalisation du protocole de caractérisation du danger écotoxique et génotoxique. La présence d'une réserve toxique importante pour cet échantillon de terre S1 est confirmée.

b) Devenir de la toxicité et de la génotoxicité en fonction de l'évolution de l'échantillon

L'essai de percolation gravitaire permet la caractérisation de la mobilité et de la toxicité des polluants en conditions aérobies à température ambiante. Afin d'étudier le devenir de la toxicité des polluants dans différentes conditions d'évolution biotiques et abiotiques, des essais en petites colonnes ont été conduits.

Le suivi de la toxicité des différentes colonnes permet de différencier deux comportements différents : celui des colonnes placées en conditions abiotiques (réacteurs témoin et volatilisation, à + 4°C) et celui des deux autres colonnes susceptibles de développer une activité biologique (réacteurs aérobie et anaérobie, placés à 20 ± 5°C). Pour les colonnes témoin et volatilisation, la toxicité reste supérieure à la toxicité théorique liée à la dilution. L'échantillon relargue en continu, sur l'ensemble du suivi, des molécules générant un effet toxique. Ces 2 colonnes présentent des évolutions comparables ce qui tend à démontrer que la volatilisation n'intervient pas pour faire diminuer la toxicité de l'échantillon.

Pour les colonnes simulant la biodégradation aérobie et anaérobie, la toxicité diminue plus vite que la chute théorique due à la dilution. L'activité microbienne, par la dégradation des polluants permet de réduire la toxicité. Pour la dégradation anaérobie, un temps de latence (environ 9 jours) est nécessaire avant le début de l'action des micro-organismes. Après cette période, la toxicité mesurée sur ce réacteur est inférieure à la toxicité théorique (liée à l'effet de la dilution). Au contraire, pour la colonne simulant la biodégradation aérobie, la réduction de la toxicité est immédiate et s'amplifie au cours du temps. L'installation de conditions favorables au développement bactérien permet de réduire la toxicité de 20 à 36 % par rapport aux colonnes placées à 4°C pour lesquelles l'activité bactérienne est réduite.

Le suivi de la toxicité en phase solide par le test Microtox[®] confirme cette réduction : la toxicité des échantillons traités n'a diminué que pour les colonnes placées en conditions biotiques. Pour les autres colonnes, la toxicité finale est comparable à la toxicité initialement mesurée, avant le début de l'essai. Cependant, même après une phase de biodégradation (aérobie ou anaérobie), la toxicité résiduelle solide reste importante (de l'ordre de 100 Ut). Ce suivi a été complété par celui de la génotoxicité qui met en évidence la persistance, et même l'augmentation de la génotoxicité en conditions de dégradation aérobie. La toxicité peut donc être diminuée mais au détriment de la génotoxicité (apparition de molécules moins toxiques mais génotoxiques par exemple).

Ces essais en colonnes, simulant plusieurs conditions d'évolution, permettent de prédire le devenir de la toxicité en fonction des conditions biotiques et abiotiques dans lesquelles sont placés les matériaux testés.

Cependant, ces essais ont montré des limites. Le suivi physico-chimique des colonnes en

percolation n'a pas permis de mettre en évidence de différences de comportement. Les conditions de milieu des réservoirs de chaque réacteur ne sont pas assez marquées (les conditions au sein des colonnes semblent cependant différentes aux vues de l'évolution de la toxicité). Le pouvoir tampon de l'échantillon de terre peut imposer le pH mais le rH aurait du être différent notamment entre les réacteurs aérobie et anaérobie. Les équilibres entre la phase aqueuse et l'air du réservoir doivent niveler ce paramètre. Le réservoir devrait donc être balayé par un courant d'azote ou complètement fermé à l'aide d'une soupape de sécurité.

De même, les différences de comportement ont été détectées entre les colonnes abiotiques (témoin et volatilisation) et biotiques (biodégradations aérobie et anaérobie). Les colonnes abiotiques offrent le même comportement malgré la présence d'une fraction volatile potentiellement dangereuse dans l'échantillon S1 (dégagement de solvants chlorés, de benzène, de toluène...). Différentes explications sont possibles comme :

- une défaillance du système pour cette voie (le dégazage s'effectue pour l'ensemble des réacteurs dans le réservoir),
- la dissolution des polluants volatils qui échappent ainsi à la volatilisation, ou,
- une participation négligeable de la phase volatile à la toxicité globale de la matrice.

D'autres essais sur des matériaux contaminés exclusivement par des substances volatiles (formol..) sont à prévoir pour pouvoir améliorer ce système.

c) Conclusion : toxicité à long terme de l'échantillon S1

L'intégration des résultats issus des expériences de lixiviations dynamiques (ou percolation) permet de caractériser l'évolution à long terme des polluants de l'échantillon de terre S1 et d'évaluer les voies d'expositions principales :

1. Les polluants responsables de la toxicité et de la génotoxicité sont relargués progressivement à chaque nouvelle lixiviation, faisant de l'eau un facteur d'exposition à long terme.
2. La toxicité dans la phase aqueuse diminue progressivement après chaque étape de lixiviation ; elle peut être accélérée par dégradation biologique aérobie ou anaérobie.
3. La volatilisation des polluants est un phénomène peu marqué, ce qui limite l'exposition par inhalation.
4. La génotoxicité semble diminuer par dégradation anaérobie mais peut rester inchangée voire augmentée durant le suivi en fonction des conditions biotiques.
5. Une partie importante de la toxicité reste incluse dans le sol même si des conditions biotiques s'installent. Il subsiste donc un risque d'exposition par exposition directe à la matrice.

La figure 38 résume le comportement de l'échantillon de terre S1 (la taille des flèches sur le schéma représente l'importance du phénomène qui lui est associé).

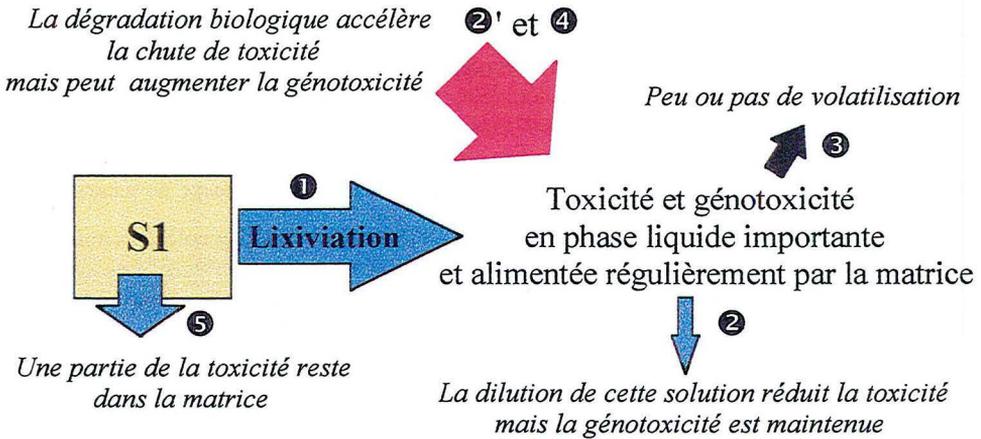


Figure 38. Comportement dans l'environnement de l'échantillon S1

6.4 Conclusion

L'essai de percolation gravitaire met en évidence la mobilité et la toxicité des polluants : il permet de modéliser le relargage des polluants et de connaître leur front de sortie. Les essais en petites colonnes de dégradation évaluent l'effet des différentes conditions biotiques et abiotiques sur le devenir de la toxicité en maximisant notamment les phases de dégradation aérobie ou anaérobie (colonnes noyées, eau re-circulée, aération lors de la dégradation aérobie), ce qui permet d'extrapoler la détérioration des matériaux et donc l'évolution de la toxicité dans ces conditions (élément qui faisait défaut lors de l'évaluation au laboratoire de ces matrices et qui manquait également lors du calcul de l'indice PEEP, chapitre 5.3.2). Les deux types d'essai sont nécessaires et complémentaires pour comprendre le comportement des polluants et celui de la toxicité.

Les essais de percolation (ascendante ou gravitaire) permettent d'appréhender le devenir des matrices dans l'environnement tout en estimant l'importance des voies de transfert (et donc d'exposition) et en quantifiant les impacts potentiels des conditions d'évolution. L'amélioration des différents points discutés (suivi de l'activité bactérienne, remplissage des colonnes, phénomènes de volatilisation, biotests..) ferait de cet outil une approche sûre pour l'analyse au laboratoire des matrices solides polluées.

L'hypothèse d'une réserve toxique détectée lors de la caractérisation réalisée à l'aide du couplage entre les lixiviations et les tests biologiques a pu être confirmée par ces essais de percolation. Ainsi, les essais de lixiviation pourraient dans un premier temps être utilisés pour caractériser le danger des matériaux solides contaminés. Dans un second temps, si une connaissance plus approfondie, en termes de migration des polluants et de détérioration des échantillons est nécessaire, celle-ci peut être réalisée à l'aide des protocoles de percolation. Ils permettraient d'évaluer les voies d'exposition et le devenir des polluants pour appréhender les risques liés aux matrices solides polluées.

VII. Discussion générale

Alors que Descartes nous recommande de tenir pour faux tout ce qui peut être mis en doute, il convient au contraire face à des risques de type planétaire, de traiter le doute comme une certitude possible et donc un élément fondamentalement positif de la décision.

H. Jonas

L'homme politique devra à l'avenir de plus en plus prendre des décisions dures sur des connaissances molles.

J. Ravetz

7. Discussion générale

Le but de cette recherche était de qualifier et de quantifier dans l'espace et dans le temps le transfert des polluants des matériaux solides vers les compartiments de l'environnement, de préciser l'exposition des organismes biologiques et de caractériser les effets de ces polluants. Le travail réalisé a permis de définir des méthodes d'étude pour appréhender le devenir des polluants dans les matériaux solides et de caractériser leurs effets. Les dispositifs expérimentaux développés décrivent le transfert des polluants en conditions statiques et dynamiques, pour des échantillons de complexité variable (échantillons contaminés au laboratoire, échantillons industriels issus de sites contaminés et de sites de production ..). L'impact des polluants mobilisés sur les organismes a été appréhendé à différents niveaux d'organisation biologique et trophique.

Après un point sur les techniques actuellement employées pour caractériser la mobilité et la toxicité des polluants, les choix techniques réalisés seront exposés. Ensuite, la discussion abordera les connaissances acquises sur l'étude du comportement à court et à long terme des polluants dans les matériaux solides pollués. Elle précisera les conséquences de la mobilité de ces substances sur l'exposition des organismes et sur les effets toxiques et génotoxiques ultérieurs. Finalement, une démarche d'utilisation des techniques développées sera proposée afin de permettre la caractérisation du danger et l'évaluation des risques liés à la présence dans l'environnement de matériaux solides contaminés.

7.1 Rappel des choix

L'étude bibliographique réalisée a fait le point sur les outils disponibles pour caractériser la mobilité des polluants et quantifier leur impact sur les êtres vivants. Elle a permis d'orienter la sélection des matériaux, et des techniques pour mettre en évidence la mobilité des polluants et des tests biologiques de toxicité. De même, cette revue de littérature a mis en évidence des points peu documentés, à éclaircir.

Dans un premier temps, différents matériaux ont été sélectionnés. Notre choix s'est porté sur la contamination au laboratoire et le prélèvement de matrices solides. La contamination au laboratoire d'échantillons solides permet de contrôler les quantités et la nature des polluants. Ces échantillons deviennent alors des modèles simplifiés d'étude pour lesquels il est plus facile d'expliquer la mobilité et la toxicité des polluants. Cependant, les conditions de contamination au laboratoire étant différentes de celles rencontrées sur les sites et sols contaminés ou dans des déchets industriels, la confrontation des résultats obtenus sur des matériaux modèles à ceux obtenus sur les matériaux complexes issus de pollutions ou de productions industrielles est nécessaire.

Les principales méthodes d'étude du transfert des polluants d'un milieu solide vers un milieu liquide consistent en une extraction statique (ou lixiviation en bûchée) dans laquelle l'échantillon est agité en vase clos avec un solvant (en général l'eau), et en une extraction dynamique (ou élution par percolation) dans laquelle l'échantillon est traversé par un fluide percolant. Les essais de lixiviations statiques simples et rapides à réaliser manquent de réalisme par rapport aux essais de percolation en colonne qui simulent les phénomènes de terrain. Les lixiviations en bûchées sont les plus employées mais les protocoles recensés sont nombreux et ont été généralement normalisés pour la caractérisation chimique des déchets. Leur application à la caractérisation de la toxicité est possible et a déjà été réalisée mais les

protocoles sont alors très variables (non standardisés) et dépendent clairement de l'utilisateur. Les variations les plus courantes portent sur le rapport massique solide/liquide utilisé pour la lixiviation, la nature du solvant de lixiviation et la durée de contact entre le matériau à étudier et le solvant. L'impact de ces différents paramètres sur la mobilité et la toxicité des polluants étant peu documenté, il a été étudié afin de définir et de justifier un protocole de lixiviation. Dans le but de comparer ce protocole aux conditions de migration des polluants sur le terrain, un essai de percolation en colonne a également été réalisé. Après les étapes d'extractions statiques ou dynamiques, l'extrait récupéré peut être utilisé directement pour la réalisation de tests biologiques de toxicité ou décanté et/ou filtré. L'impact de ces pré-traitements sur la réponse toxique a également été étudié.

Pour l'évaluation de la toxicité, de nombreux protocoles ont été recensés. Ils utilisent des organismes très différents -des poissons aux bactéries, en passant par les plantes terrestres et les vers de terre- et peuvent détecter des niveaux d'atteinte variables (atteinte moléculaire, sur le génome, sur la survie individuelle, sur la croissance ..). Chacun de ces niveaux doit être pris en considération car les polluants n'ont pas tous le même mode d'action. De même, des organismes issus de niveaux trophiques différents doivent être considérés puisque les réactions métaboliques sont différentes selon les organismes. Lors de leur application aux échantillons solides, les tests peuvent être divisés en deux catégories : ceux pour lesquels l'exposition a lieu directement au contact du matériau à évaluer (exposition directe) et ceux pour lesquels l'exposition se fait par le biais d'un extrait obtenu à partir d'un échantillon (exposition indirecte). La sélection des tests biologiques a été dictée par la volonté d'évaluer l'ensemble des impacts possibles liés à la présence des polluants dans les matériaux solides. Or, actuellement, seuls les tests par exposition indirecte (via une étape de solubilisation des polluants) présentent ce panel complet de caractérisation. Cependant, l'évaluation des différents impacts ne peut se faire avec un seul test de toxicité et nécessite l'élaboration d'une batterie de tests complémentaires. Cette batterie a été constituée par deux tests bactériens (test Microtox[®], et Mutatox[®], respectivement sur *Vibrio fischeri* et *Vibrio fischeri* M169), un test sur microcrustacé (*Daphnia magna*) et un test sur une algue (*Pseudokirchneriella subcapitata*). Ces tests permettent respectivement d'évaluer les impacts moléculaires et génétiques, les effets sur la survie et les effets sur la croissance d'une population. La batterie ainsi constituée permet d'appréhender différents niveaux d'effet, sur différents types d'organismes. De plus, afin de comparer les méthodes d'exposition directes et indirectes, deux protocoles complémentaires ont également été utilisés : le test Microtox[®], dans sa version dite de contact et le test sur *Escherichia coli*, MetPLATE[®].

7.2 Mobilité et expression de la toxicité des polluants dans les matériaux solides

Dans le but de comprendre les facteurs modifiant le transfert des polluants des matériaux solides vers les compartiments environnementaux (essentiellement le milieu aquatique) et leur toxicité, le travail a été organisé en étapes de complexité croissante : en étudiant le transfert des polluants en conditions statiques, pour des échantillons de terre agricole contaminés au laboratoire, puis pour des échantillons prélevés sur des sites industriels. Finalement, ces résultats ont été comparés et complétés par ceux obtenus en conditions dynamiques (essai de percolation en colonne).

7.2.1 Facteurs affectant la mobilité des polluants en conditions statiques et modifiant l'expression de leur toxicité

L'utilisation d'échantillons contaminés au laboratoire permet de connaître exactement la nature et la quantité des polluants introduits dans un échantillon. L'étude de ces différents facteurs a été réalisée en combinant différentes conditions de lixiviation, les lixiviats récupérés étant ensuite évalués par une batterie de tests biologiques. La première étape de cette recherche a permis de conclure sur les trois rapports massiques solide/liquide utilisés (pâte saturée, 1/5 et 1/10). Ainsi, le rapport 1/10 présente une meilleure capacité d'extraction mais, en contrepartie, la dilution qu'il engendre (due au volume important d'eau par rapport à la masse d'échantillon lixivié) limite l'expression de la toxicité. A l'opposé, le rapport massique pâte saturée est à sélectionner pour garantir une meilleure expression de la toxicité. L'étude réalisée sur la durée d'extraction n'a pas montré de différences entre les durées de 2 heures et de 24 heures. Le dernier point étudié quant aux conditions de lixiviation concernait la nature du solvant d'extraction. Deux solvants ont été étudiés : le méthanol et un tampon phosphate à pH 5. Le premier, en favorisant la solubilisation des polluants organiques peu ou non hydrosolubles, augmente leur concentration dans les milieux d'essai et permet une meilleure expression de leur toxicité. De même, le tampon phosphate, à pH 5, utilisé comme solvant de lixiviation augmente la solubilisation des polluants métalliques et l'expression de la toxicité.

Le prétraitement de l'échantillon par filtration, étudié sur les matériaux contaminés au laboratoire, peut également avoir un impact sur l'expression de la toxicité : le filtre, en interceptant les matières en suspension et les colloïdes sur lesquels peuvent être adsorbés des polluants, limite la concentration des polluants dans le lixiviat à la fraction soluble. Les équilibres entre les fractions polluantes liées et la fraction soluble ne peuvent alors plus avoir lieu. La décantation permet au contraire d'exposer les organismes à la fraction soluble des polluants mais également à certaines fractions liées.

L'effet de ces différents facteurs a été confirmé sur la lixiviation des matériaux industriels prélevés. Cependant, à l'exception de la lixiviation réalisée au méthanol, l'amplitude des différences entre les autres protocoles de lixiviation est moins marquée. Ainsi, les lixiviations réalisées avec le tampon phosphate ou le tampon borate (ajouté à la batterie d'extractants pour étudier la mobilité des polluants en conditions basiques) offrent des résultats inférieurs ou comparables à ceux obtenus par simple lixiviation à l'eau. Les comportements différents des polluants dans les échantillons industriels s'expliquent par la spéciation des métaux dans ces matériaux et par un temps de vieillissement plus long qui font que les polluants sont organisés au sein de la matrice de manière plus stable. Ils sont donc moins mobiles que dans les matériaux contaminés au laboratoire pour lesquels les durées de vieillissement sont beaucoup plus courtes (quelques jours contre plusieurs années pour les terres issues de sites pollués).

Les différents facteurs étudiés influencent la mobilité des polluants en conditions statiques et l'expression ultérieure de leur toxicité.

7.2.2 Mobilité et toxicité des polluants en conditions dynamiques

L'échantillon de terre (S1), contaminé par des micropolluants organiques et métalliques, a été choisi comme substrat d'étude pour l'essai dynamique. L'essai de percolation gravitaire en colonne, réalisé sur une période de 30 semaines, a permis de caractériser la migration des

polluants dans un profil. Ainsi, les polluants les plus solubles (comme le zinc) sont exportés dès les premières semaines de percolation alors qu'une déstructuration de l'échantillon, certainement due à l'action combinée de l'eau et de l'activité microbienne, est nécessaire avant la migration des polluants peu solubles (composés chlorés par exemple). Ceux-ci sont entraînés ensuite par les particules en suspension et/ou les colloïdes hors de la colonne. D'une manière générale, la charge polluante dans les percolats récoltés diminue avec la durée de percolation. La composition des percolats est modifiée durant la percolation, ce qui se répercute sur la toxicité et la génotoxicité mesurées. Celles-ci décroissent lentement entre la 2nde et la 30^{ème} semaine de percolation, sur la base des percolats analysés. Cependant, la toxicité régulièrement suivie à l'aide du test Microtox[®] (tous les 3 jours) met en évidence une augmentation au début du suivi (entre la 2^{ème} et la 9^{ème} semaine), ce qui pourrait être lié à l'accroissement sur cette période du relargage de polluants halogénés. Malheureusement, l'incrimination de la toxicité ou de la génotoxicité à une catégorie ou à une famille de polluants est difficile puisque, d'une part, toutes les molécules polluantes potentiellement toxiques ou génotoxiques n'ont pas été suivies et que, d'autre part, l'impact sur les organismes testés peut être lié à l'action combinée de plusieurs polluants. Sur l'ensemble du suivi (30 semaines), l'échantillon libère une charge toxique importante susceptible de provoquer des réponses toxiques aiguës, chroniques et génotoxiques. Cet échantillon de terre présente donc un danger pour l'environnement, tant du point de vue des polluants relargués qui génèrent des effets toxiques et génotoxiques que du point de vue de la durée sur laquelle il est susceptible de maintenir cette action nuisible (pour mémoire, le volume percolé durant les 30 semaines de percolation correspond à la pluviométrie moyenne lorraine cumulée sur 3 ans).

La caractérisation de la mobilité et de la toxicité des polluants est possible à l'aide des lixiviations en bâchées. Les facteurs affectant la mobilité des polluants et l'expression de leur toxicité ont été identifiés et le choix des conditions de lixiviation dépend alors des objectifs de la caractérisation. Ainsi, si l'objectif est de maximiser la réponse toxique, une lixiviation avec un rapport massique solide/liquide élevé (1/1, 1/2 par exemple), sans étape de filtration préalable, doit être employée. A contrario, si l'objectif est de mobiliser le plus de polluants et d'appréhender le relargage maximum de l'échantillon, des rapports massiques solide/liquide faibles (1/10 par exemple) doivent être utilisés. L'étude de l'influence de la température de lixiviation, de la granulométrie de l'échantillon lixivié et du type d'agitation devraient également être entreprise pour compléter la compréhension des facteurs modifiant la mobilité et la toxicité des polluants en conditions statiques. Par rapport aux extractions statiques, la percolation en colonne permet de discriminer le comportement des polluants à la migration. Elle rend également compte de l'échelle de temps nécessaire à épuiser le contenu toxique de l'échantillon. Ainsi, pour l'échantillon de terre percolé, un danger toxique et génotoxique a été identifié sur l'ensemble du suivi, soit pendant 30 semaines.

La lixiviation statique permet d'appréhender la mobilité et la toxicité des polluants, sans pouvoir exactement préciser l'échelle de temps sur laquelle ce danger va s'exercer. L'essai de percolation en colonne renseigne alors sur la durée prévisible du danger toxique.

7.2.3 Importance du test biologique et de la méthode d'exposition sur l'expression de la toxicité

Différents tests de toxicité ont été utilisés pour permettre la caractérisation des effets toxiques au niveau moléculaire (*Vibrio fischeri* et *Vibrio fischeri* M169), individuel (*Daphnia magna*) et d'une population (*Pseudokirchneriella subcapitata*). De plus, le recours à ces

organismes permet également d'envisager les effets sur différents niveaux trophiques, respectivement, décomposeur, consommateur et producteur primaire.

Les différents tests biologiques ont montré, sur un même extrait, des réponses d'amplitude différentes : certains lixiviats n'ont pas été considérés comme toxiques sur la base du test *Daphnia magna* alors qu'ils l'étaient sur la base du test sur algue ou sur bactérie. Au vu de l'ensemble des matériaux évalués, les tests qui sont apparus comme les plus sensibles quant à la détection de la toxicité sont les tests Microtox® (*Vibrio fischeri*) et sur algue unicellulaire *Pseudokirchneriella subcapitata*. Cependant, bien que ces tests présentent de meilleures réponses (sur les matériaux évalués), il est nécessaire de maintenir le test sur *Daphnia magna* pour conserver une batterie complémentaire. De même, les résultats de mutagenèse obtenus sur les échantillons industriels démontrent l'utilité d'ajouter à cette batterie un test de génotoxicité capable de détecter les effets des polluants sur le génome. Les effets toxiques classiquement mesurés (mortalité, croissance...) ne sont pas liés aux effets génétiques, et inversement : un échantillon peut alors ne pas présenter d'impact toxique mais être mutagène (comme les lixiviats du sol S2 et du déchet D1).

La durée et la méthode d'exposition modifient également la sensibilité de la réponse. Il apparaît que le test Microtox® est plus sensible aux métaux quand la durée d'exposition augmente jusqu'à une heure. De même, la plus grande sensibilité du test algue peut également être due à la durée d'exposition utilisée (72 h, contre 24 h pour le test sur *Daphnia magna* et 30 minutes à 1 heure pour le test Microtox®). Les tests Microtox® et MetPLATE®, réalisés par exposition directe (création d'une suspension d'échantillon en contact avec les bactéries) se sont montrés plus sensibles, détectant des réponses toxiques sur des échantillons évalués comme peu ou non toxiques par les tests réalisés après lixiviation. Cependant, concernant le test Microtox® en phase solide, des problèmes d'interprétation des résultats subsistent par manque d'un blanc interne rendant compte de la perte des bactéries sur l'échantillon.

Finalement, la batterie de tests biologiques proposée pour la caractérisation de la toxicité des matériaux solides intègre des tests réalisés sur échantillon liquide (lixiviat) et des tests directs. Elle présente une complémentarité d'effet (toxicité aigue, chronique et génotoxicité), de niveau d'intégration biologique (moléculaire, individuel et population), de niveau trophique (producteur primaire, consommateur et décomposeur) et d'exposition (tests directs et indirects).

7.3 Caractérisation du danger lié aux matériaux utilisés

Le couplage d'une étape de lixiviation avec la batterie de tests a permis de caractériser la toxicité des différents matériaux industriels contaminés. Bien que l'objectif du travail était la compréhension des mécanismes permettant le transfert des polluants et l'expression ultérieure de leur toxicité, il est apparu nécessaire de statuer sur l'interprétation des résultats des biotests sur les extraits et leur utilisation pour prédire leur comportement des polluants dans les matériaux.

La toxicité des lixiviats aqueux issus des différents échantillons a été hiérarchisée à l'aide de deux méthodes : celle proposée par le Ministère de l'Environnement dans le cadre de la classification des déchets dangereux (1997b) et celle adaptée de Costant *et al.* (1993). La première méthode repose sur l'utilisation des réponses individuelles de différents tests de toxicité (*Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* et *Pseudokirchneriella subcapitata*, notamment) par

rapport à des seuils de toxicité. Par cette méthode et dans la limite des tests utilisés¹, seul l'échantillon de terre S1 était classé comme dangereux suite à la réponse du test Microtox® sur *Vibrio fischeri* (la CE₅₀ % mesurée est de 6% alors que le seuil est fixé à 10%). La seconde méthode intègre dans un même indice la réponse des différents tests de toxicité et de génotoxicité. La classification des matériaux est alors modifiée puisque, compte tenu de la forte génotoxicité de l'échantillon D1, ce déchet est alors classé comme le plus dangereux, devant l'échantillon S1. Ces deux méthodes illustrent la difficulté d'intégrer les réponses de différents tests biologiques et le choix des seuils à partir desquels un échantillon doit être considéré comme toxique. Dans la mesure du possible, les seuils devraient reposer sur des critères écologiquement représentatifs pour l'espèce testée ; or de tels seuils sont difficiles à établir dans la mesure où les variations naturelles rencontrées dans les écosystèmes ne sont que très partiellement connues et que le manque de données, ils sont généralement choisis arbitrairement. Cependant, la mise en place d'une réglementation intégrant des critères écotoxiques doit s'appuyer sur des seuils pour pouvoir être appliquée, même s'ils doivent ensuite être revus à la lumière de nouvelles connaissances.

La toxicité détectée dans les lixiviats des différents matériaux a été comparée à celle mesurée par exposition directe sur des invertébrés du sol (*Eisenia fetida*, *Oxythera funesta*) et sur des plantes supérieures (blé, orge et lentille) (Guérin, 1999, Arnold *et al.*, 1996, Bouché, 1994, Martinet, 1997). Il apparaît que les réponses obtenues sur les lixiviats sont en accord avec celles obtenues par exposition directe. Ainsi, par exemple, l'échantillon de terre S1, présentant la réponse toxique la plus importante pour les tests sur *Vibrio fischeri* et *Pseudokirchneriella subcapitata*, est également le plus toxique par exposition directe pour le coléoptère *Oxythera funesta* et la lentille. De même, les réponses génotoxiques mesurées sur l'échantillon S2 sont en accord avec la génotoxicité mesurée sur les racines d'orge (Guérin, 1999) et sur le métabolisme du rat (Fouchecourt, 1996). La lixiviation des matrices couplée à des tests de toxicité pourrait donc être la première étape de la caractérisation écotoxique des matrices solides contaminées, les essais sur phase solide n'étant développés que si aucune toxicité n'est détectée sur les lixiviats, pour confirmer l'absence de toxicité. Cette démarche est actuellement celle envisagée par le Ministère de l'Environnement.

Cependant, le recours à la lixiviation pour évaluer la toxicité des matériaux solides est parfois discuté. En effet, les tests par exposition directe permettent d'évaluer l'intoxication des organismes sans avoir recours à une étape d'extraction et sont plus représentatifs du milieu terrestre. L'étape de lixiviation est alors perçue comme une dérive pour faciliter l'utilisation des tests biologiques les plus couramment utilisés (à savoir Microtox®, *Daphnia magna* et *Pseudokirchneriella subcapitata*). Cependant, rappelons que cette approche indirecte permet d'estimer le danger lié au transfert des polluants par l'eau qui représente le vecteur principal, avec l'air, des pollutions ; elle permet la mobilisation des polluants par solubilisation directe ou par entraînement des particules ou des colloïdes, transportant ainsi les pollutions vers les milieux aquatiques (nappes phréatiques, rivières..) par lixiviation, ruissellement et/ou lessivage, facilitant le contact entre ces polluants et les cibles environnementales (aquatiques ou terrestres). De plus, la diversité des tests biologiques réalisables sur des extraits liquides permet de caractériser les différentes formes de toxicité (aiguë, chronique et génétique), ce qui n'est pas encore le cas des tests terrestres. L'approche

¹ La méthode proposée par le Ministère intègre également les essais sur *Ceriodaphnia dubia*, les tests biologiques sur vers de terre (*Eisenia fetida*) et sur plantes terrestres (germination et croissance) sur matrice brute. Ces essais complémentaires n'étant pas réalisés, la toxicité des matériaux testés ne peut pas être établie définitivement d'après cette méthode.

indirecte est donc tout à fait justifiée dans le cadre de la caractérisation du danger lié aux matériaux solides contaminés. Elle apporte une réponse, certes partielle -mais faut-il attendre de connaître l'ensemble de l'information pour pouvoir prendre une décision ?- qui peut être utilisée pour statuer sur la toxicité des matériaux testés. Ainsi, les méthodes de caractérisation précédemment discutées permettent de caractériser le danger à un instant donné (à court terme) ce qui reste insuffisant au vu des objectifs fixés au départ du travail. Les résultats obtenus peuvent également être interprétés pour déterminer le danger à long terme pour l'environnement.

7.4 Prévoir le danger à long terme

L'essai de percolation en colonne préalablement discuté permet de modéliser le devenir des polluants à long terme et l'impact de leur relargage. Il a permis de démontrer l'existence pour l'échantillon testé (S1) d'une réserve polluante pouvant générer un effet toxique ou génotoxique.

L'utilisation de différents solvants d'extraction comme le méthanol permet également d'estimer la réserve toxique des polluants. Ainsi, pour un échantillon donné, la comparaison d'une réponse toxique faible détectée dans l'eau avec une réponse toxique exacerbée dans le méthanol signale la présence de polluants organiques toxiques potentiellement mobilisables ou disponibles. Cette indication peut alors être interprétée comme l'existence, dans l'échantillon, d'une réserve toxique disponible à long terme ou libérable si les conditions de milieu se modifient. La libération soudaine du stock polluant, suite aux modifications de milieu est peu vraisemblable puisqu'elle nécessiterait des conditions extrêmes difficiles à envisager dans l'environnement (acidification brutale, apports de tensioactifs...). L'interprétation la plus plausible de ces informations consiste à envisager que la réserve polluante va, à chaque nouvelle lixiviation (ou nouvelle pluie sur le site), enrichir la solution du sol en produits organiques et générer une pollution chronique des eaux souterraines et superficielles. Pour l'échantillon S1 par exemple, il apparaît que la toxicité à court terme est moyennement importante (toxicité détectée dans l'eau pour l'essai Microtox[®]) et qu'au contraire, la génotoxicité à court terme et la réserve toxique organique de cet échantillon sont importantes (forte toxicité détectée dans le méthanol pour l'essai Microtox[®] et *Pseudokirchneriella subcapitata*). Ainsi, bien que ne produisant qu'une très faible toxicité sur les organismes utilisés, cette dose délivrée à long terme peut cependant avoir des conséquences sur les écosystèmes environnants. Conséquences d'autant plus imprévisibles que, si la toxicité générée par le lixiviat est très faible, la génotoxicité est au contraire importante pour cet échantillon. Le danger de chaque échantillon peut alors être décliné en terme de danger toxique et génotoxique à court (immédiatement mobilisable à l'eau) et long terme (présence d'une réserve toxique).

Cette vision à long terme du danger doit être complétée par des essais de dégradation puisque le danger toxique et génotoxique peut être modifié en fonction des altérations chimiques et biologiques des matériaux. Les essais de dégradation ont été réalisés en colonnes, alimentées par percolation ascendante et placées dans des conditions d'évolution différentes (dégradation abiotique et, biotiques aérobie et anaérobie). Après 28 jours de percolation, pour l'échantillon de terre S1, il apparaît que l'installation de conditions favorisant la biodégradation des polluants permet de réduire la toxicité en solution dans le système (mesurée par le test Microtox[®]) mais augmente la génotoxicité sur le traitement aérobie (mesurée avec le test Mutatox[®]). De même, la réalisation du test Microtox[®] en phase solide sur le contenu après percolation des différentes colonnes montre un résidu toxique

important (entre et 100 Ut), ce même en conditions favorisant la biodégradation.

Les essais de lixiviation (à l'eau et à l'aide d'autres solvants), de dégradation (percolation ascendante) et de percolation par voie gravitaire permettent de statuer sur le devenir de la toxicité issue des matériaux solides. Pour l'échantillon S1, il est par exemple possible de pronostiquer son devenir dans l'environnement : les polluants responsables de la toxicité et de la génotoxicité sont relargués progressivement à chaque nouvelle lixiviation, faisant de l'eau un facteur d'exposition sur le long terme. La toxicité relarguée dans la phase aqueuse peut être atténuée par l'installation de processus de biodégradation (aérobie ou anaérobie) qui peuvent également augmenter la génotoxicité de l'échantillon. Finalement, une partie importante de la toxicité reste présente dans l'échantillon générant un risque par exposition directe à la matrice ou par lixiviation ultérieure. Ainsi, les essais de percolation (ascendante ou gravitaire) peuvent donc permettre d'appréhender le devenir des matrices dans l'environnement tout en estimant les voies de transfert (et donc d'exposition) et en quantifiant les impacts potentiels des conditions d'évolution. De plus, ces essais confirment les hypothèses formulées sur la base des lixiviations statiques (à l'eau et au méthanol) concernant la présence d'une réserve toxique et génotoxique importante, libérable à long terme. Ces outils sont une approche pour la caractérisation au laboratoire des matrices solides polluées et pourraient être intégrés dans un ensemble d'analyses pour déterminer le danger écotoxique et évaluer les voies d'exposition afin d'appréhender les risques liés aux matrices solides polluées.

7.5 Utilisation des outils de caractérisation de la mobilité et de la toxicité des polluants

Avant d'aborder l'utilisation adéquate des procédures développées pour caractériser la mobilité et la toxicité des polluants des sols et des déchets, il convient de redéfinir les notions de risque et de danger et d'envisager les différents cadres possibles d'utilisation de ces outils. En effet, ces outils de diagnostic et de décision peuvent être intégrés dans de nombreux processus d'expertise : de la simple caractérisation de la toxicité d'un échantillon à la prévision des risques pour l'environnement. Les intérêts et les limites des procédures décrites peuvent alors être différents d'une utilisation à l'autre.

7.5.1 Cadre d'utilisation des outils de caractérisation de la mobilité et de la toxicité des matériaux solides contaminés

L'évaluation des dangers et l'estimation des risques liés aux polluants sont deux aspects différents, trop souvent confondus. Le danger toxique¹ correspond à une caractéristique intrinsèque de l'échantillon testé qui fait qu'il peut générer un effet négatif sur des organismes vivants. Il est déterminé en dehors de toute considération d'exposition, de cibles et de milieu. Le danger toxique est donc le potentiel d'un échantillon à générer un impact : il va être déterminé par rapport à des seuils de toxicité. Le risque, au contraire, est une notion probabiliste qui dépend de l'existence d'un danger mais également de l'exposition d'une cible à ce danger (un produit extrêmement dangereux, enfermé dans un placard ne présente

¹ Le danger peut être toxique (acception étudiée ici), mais également explosif, corrosif, radioactif...

pas de risque pour l'environnement). C'est donc une notion bidimensionnelle et il n'y a risque que s'il y a exposition d'une cible à un danger. Si ces notions et leurs conditions d'étude ont été définies pour les substances pures, il n'en est pas de même pour les matériaux solides pour lesquels les outils d'évaluation sont encore au stade du développement.

Face aux matériaux solides contaminés, deux questions sont généralement posées : l'échantillon est-il dangereux (ou toxique) ? Et si oui, présente-t-il des risques pour l'environnement ? La première question peut être posée face à un déchet, une boue, un échantillon de terre contaminé qui doit être évalué pour une valorisation future, une mise en décharge, une étude de traitabilité... La seconde question, si l'échantillon testé est dangereux, nécessite de connaître l'utilisation future ou le site duquel il est issu. Il faudra ensuite évaluer l'exposition des organismes à ce danger.

7.5.2 Utilisation des outils de caractérisation de la mobilité et de la toxicité des polluants

Ces outils peuvent être utilisés pour la caractérisation du danger ou l'estimation des risques.

a) Estimation des risques

La percolation gravitaire et, dans une moindre mesure, les essais de lixiviation (réalisés avec des rapport massiques solide/liquide élevés) permettent de définir la migration des polluants de la matrice contaminée vers les compartiments environnementaux ou les êtres vivants, et d'estimer les voies de transfert préférentielles. L'essai de percolation, mené sur des durées importantes (plusieurs mois), permet de cerner les relations entre les polluants et la matrice (mobilité différentielle des polluants solubles et peu solubles, cinétiques de relargage..) et d'estimer le devenir de la pollution (pollution continue du milieu, lixiviation rapide des molécules toxiques et disparition de la toxicité et/ou de la génotoxicité...). Le couplage de ces essais de mobilisation et des tests biologiques de toxicité permet non seulement d'estimer le relargage des polluants mais d'évaluer immédiatement le ou les impacts de ce transfert. Ces essais de mobilisation sont essentiellement focalisés sur les transferts vers l'eau et les milieux aquatiques ; des développements sont à apporter pour évaluer le transfert et l'impact des polluants sur le milieu aérien.

b) Caractérisation du danger

La caractérisation du danger lié aux polluants des matériaux solides a pour but de définir si l'échantillon présente ou peut présenter un danger pour l'environnement. Dans cet objectif, il nous semble important de ne pas évaluer uniquement la toxicité générée par la mobilisation immédiate des polluants mais aussi d'envisager la réserve toxique d'une part et le vieillissement des matériaux, d'autre part, c'est à dire leur détérioration sous l'action de processus biologiques ou chimiques.

Ainsi, les méthodes de lixiviation combinées eau et méthanol, développées dans le cadre de cette thèse, permettraient, par exemple, d'évaluer la toxicité de l'échantillon mais également la réserve toxique potentielle de l'échantillon. De plus, les essais en colonnes doivent permettre de pronostiquer le devenir de la toxicité dans différentes conditions de détérioration (biodégradation aérobie, anaérobie, évolution chimique..) et de pouvoir, le cas échéant, envisager et orienter les solutions de traitement (favoriser celle qui réduit la toxicité et la génotoxicité).

L'emploi de la batterie de tests biologiques définie (*Vibrio fischeri*, *Daphnia magna*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, et *Vibrio fischeri* M169) sur les différents extraits et sur les échantillons traités est nécessaire pour évaluer l'intégralité des impacts des polluants. Ces organismes, issus de niveaux trophiques différents, composent une batterie complémentaire en termes d'effets (toxicité aiguë, chronique et génotoxicité) et de niveau d'intégration biologique (moléculaire, cellulaire, individuel et population).

Ces outils, composés par le couplage d'une étape d'extraction (lixiviation ou percolation) et de dégradation avec une batterie de tests biologiques, permettent d'évaluer le danger immédiat d'un échantillon mais également de préciser son devenir. Ainsi, à chaque problématique donnée sur les matrices solides contaminées correspond une utilisation optimale des essais développés dans le cadre de cette thèse (figure 39). L'intégration de l'ensemble de ces méthodes dans une démarche globale participe également à l'évaluation des risques associés aux matrices solides contaminées. Ces outils de caractérisation doivent désormais être mis à l'épreuve sur une gamme plus vaste d'échantillons contaminés afin d'évaluer les limites de la méthode. Cependant, les résultats déjà obtenus sur d'autres échantillons par percolation gravitaire et ascendante permettent de confirmer ce qui a été observé pour l'échantillon S1.

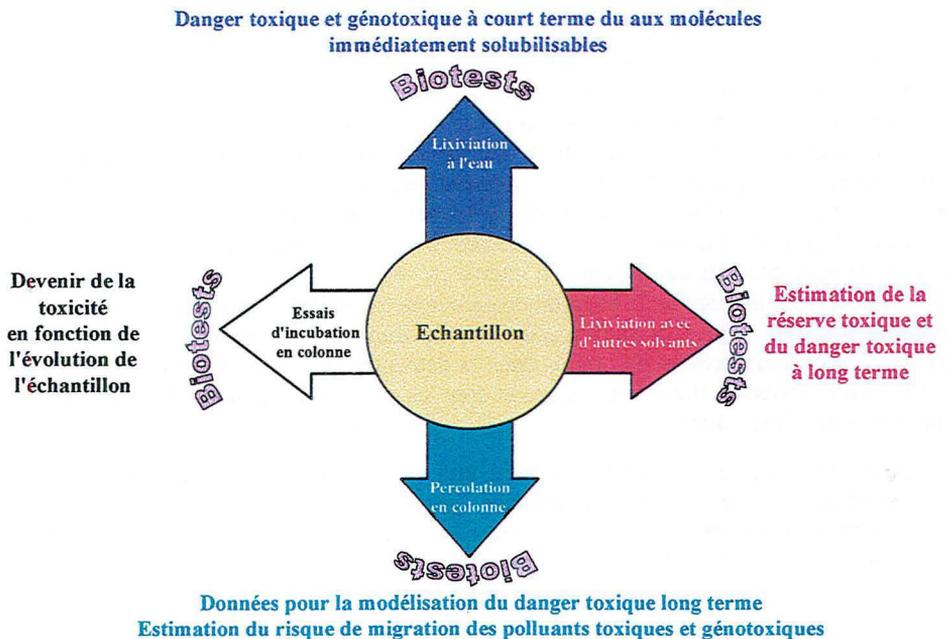


Figure 39. Utilisation des méthodes développées dans le cadre de la recherche pour caractériser le danger écotoxique des matériaux solides contaminés

7.6 Conclusion

Les objectifs de ce travail étaient dans un premier temps de comprendre les conditions permettant la mobilisation des polluants associés aux matériaux contaminés, et la détection de leur toxicité ; puis, dans un second temps, d'intégrer ces résultats dans une démarche susceptible de caractériser les dangers et les risques, à court et à long termes, associés à la

présence de polluants métalliques et/ou organiques dans les matériaux solides contaminées. Ainsi, l'étude de la mobilité et, de la toxicité et/ou génotoxicité des polluants dans différentes conditions d'extraction a permis d'optimiser les conditions de lixiviation en fonction de l'objectif fixé (maximiser l'extraction ou la réponse toxique). Les essais de percolation et d'incubation ont permis d'estimer le devenir des polluants (migration dynamique des polluants) et de la toxicité (amplification ou diminution de la réponse des tests biologiques en fonction des conditions d'incubation). Finalement, l'intégration de ces résultats a permis de définir différents outils méthodologiques qui intégrés dans une démarche globale contribuent à la caractérisation des dangers et des risques.

Cependant, la démarche développée est essentiellement destinée à la caractérisation du danger écotoxique des terres et des déchets. Elle estime à court et à long terme le danger d'un échantillon de terre contaminé ou le danger *a priori* d'un déchet (avant son émission dans l'environnement), en dehors de toute considération spécifique de cible biologique et d'exposition.

Pour l'analyse de l'impact des polluants *a posteriori* (après la contamination du site), les informations apportées par la démarche proposée sont insuffisantes et doivent être complétées par des données spécifiques du scénario étudié : type d'espèce, voies d'exposition, nature des polluants... Or, contrairement à l'analyse sanitaire du risque pour laquelle l'espèce cible (l'homme) et les niveaux d'effets tolérés sont bien définis (pas d'effet acceptés), pour l'analyse des risques écologiques, que ou qui doit-on protéger ? Le choix de l'espèce et des impacts tolérés ne sont pas aussi évidents : les espèces les plus couramment utilisées pour les tests de toxicité et d'écotoxicité ne peuvent être représentatives de toutes les espèces environnementales. De même, les effets renseignés concernent généralement la survie et la reproduction des espèces ; très peu de données sont disponibles concernant les effets des polluants sur les modifications physiologiques des organismes exposés aux polluants. Or, d'ores et déjà, des études ont montré que des polluants comme les PCB, les dioxines, le dieldrin et leurs produits de dégradation interfèrent avec les cycles endocriniens (directement ou indirectement) altérant la différenciation cellulaire des cellules germinales et empêchant la reproduction. De même, ils sont soupçonnés de diminuer la résistance immunitaire des espèces. La difficulté réside désormais dans la détection de ces effets, induits généralement par de faibles concentrations de polluants et dont les conséquences mesurables n'apparaissent que bien après l'exposition.

Le recours à des tests d'écotoxicité permettra de contrôler les émissions de déchet dans l'environnement et de juger de l'urgence de l'intervention sur un site contaminé, devenant ainsi un outil incontournable d'aide à la décision. Mais, il faudra, à terme envisager d'autres techniques de détection plus précoces pour éviter que ne se réalise la prédiction de Erwin.

VIII. Bibliographie

Références bibliographiques

Abdul Rida A.M.M. et Bouché M.B. 1994. A method to assess chemical biorisks in terrestrial ecosystems. In *Ecotoxicology of Soil Organisms*. Donker M.H., Eijsackers H. and Heimbach F. (Eds). Lewis publisher. 383-394.

ADEME. 1994. La contamination des sols. 62 p.

ADEME. 1995. Les déchets industriels spéciaux. 62 p.

ADEME. 1996. La faune, indicateur de la qualité des sols. 62 p.

Aecht et Foissner. 1993. Effects of organically enriched magnesite fertilizers on the soil ciliates of a spruce forest. *Pedobiologia*. 37 : 321-335.

AFNOR T90-301. 1996. Qualité des eaux. Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna*. Association Française de Normalisation.

AFNOR T90-304. 1993. Qualité des eaux. Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec *Scenedesmus subcapitatus* et *Selenastrum capricornutum*. Association Française de Normalisation.

AFNOR T90-320. 1991. Qualité des eaux. Détermination de l'inhibition de la luminescence de *Photobacterium phosphoreum*. Association Française de Normalisation.

AFNOR X31-201. 1982. Qualité des sols. Essai d'inhibition de germination de semences par une substance. Association Française de Normalisation.

AFNOR X31-202. 1995. Qualité des sols. Détermination des effets des polluants sur les plantes supérieures. Partie 2 : effets de substances sur l'émergence et la croissance des plantes supérieures. Association Française de Normalisation.

AFNOR X31-203. 1994. Qualité des sols. Détermination des effets des polluants sur les plantes supérieures. Partie 1 : méthodes de mesurage de l'inhibition de la croissance racinaire. Association Française de Normalisation.

AFNOR X 31-210. 1992. Essai de lixiviation. Association Française de Normalisation.

AFNOR X31-211. 1994. Essai de lessivage d'un déchet solide initialement massif ou généré par un procédé de solidification (Projet de norme). Association Française de Normalisation.

AFNOR X31-250. 1984. Qualité des sols. Détermination de la toxicité d'une substance vis-à-vis des lombriciens (espèce *Eisenia fetida*). Association Française de Normalisation.

AFNOR X31-251. 1994. Qualité des sols. Effet des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*). Partie 1 : Détermination de la toxicité aiguë en utilisant des substrat de sol artificiel. Association Française de Normalisation.

Alef K. et Nannipieri P. 1995. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Alef K. et Nannipieri P. (Eds). Academic Press Editor. London. 576 p.

Andreux F., Portal J.M., Schiavon M., Bertin G. et Barriuso E. 1991. The usefulness of humus fractionation methods in studies about the behaviour of pollutants in soils. *Tox. Env. Chem.* 31-32 : 29-38.

- Andreux F., Schiavon M., Munier-Lamy C., Mansour M. et Scheunert I. 1995. Factors affecting the movement, reaction and biotransformation of xenobiotics. In *Environmental impact of soil component*. Huang P.M., Berthelin J., Bollag J.M., McGill W.B. et Page A.L. (Eds.). Lewis publisher. CRC press. 1 : 383-408.
- Ankley G., Mihaich E., Stahl R., Tillitt D., Colborn T., McMaster S., Miller R., Bantle J., Campbell P., Denslow N., Dickerson R., Folmar L., Fry M., Giesy J., Earl Gray L., Guiney P., Hutchinson T., Kennedy D., Kramer V., LeBlanc G., Mayes M., Nimrod A., Patino R., Paterson R., Purdy R., Ringer R., Thomas P., Touart L., van der Kraak G. et Zacharewski T. 1998. Overview of workshop on screening methods for detecting potential (anti-) estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. *Environ. Toxicol. and Chem.* 17 (1) : 68-87.
- Aprill W., Sims R.C., Sims J.L. et Matthews J.E. 1990. Assessing detoxification and degradation of wood preserving and petroleum wastes in contaminated soil. *Waste Management and Research.* 8 : 45-65.
- Arnold M., Laloue H., Delmas G. et Rether B. 1996. Evaluation de la phytogénotoxicité des sols et des déchets contaminés basée sur la détection des adduits d'ADN par postmarquage radioactif : mise au point d'une méthode standardisable. *Rapport ADEME.* 22 p.
- Atkinson D.S., Ram N.M. et Switzenbaum M.S. 1985. Evaluation of the Microtox Analyser for assessment of sediment toxicity. *MICROBICS reference N° 53.*
- Belkin S., Stieber M., Tiehm A., Frimmel F.H., Abeliovich A. Werner P. et Ulitzur S. 1994. Toxicity and genotoxicity enhancement during polycyclic aromatic hydrocarbons' degradation. *Environ.Toxicol. and Water Quality.* 9 : 303-309.
- Bergé J.B. et Pasteur N. 1997. Ecotoxicology : genotypes, modification and biomarkers. In *Ecotoxicology : responses, biomarkers and risk assessment*. Zelikoff JT (Ed). OECD workshop, SOS Publications, Fair Haven. 311 -318.
- Bessi H., Féraud J.F., Vasseur P., Colin F. et Belkadir E. 1992. Genotoxicity of hazardous leachates from solid wastes evaluated for environmental impact with the Ames test. *Environ. Toxicol. and Water Quality.* 7 : 71-86.
- Bispo A., Martin A.C., Haag J.L., Rodriguez C., Jourdain M.J., Jauzein M. et Klein F. 1995a. Bioremediation of coke oven sites : study of toxicity reduction during a pilot scale landfarming test using tensioactives organic nutrients and hydrogen peroxyde. In *Fifth International FZK/TNO Conference on Contaminated Soils*. FZK/TNO (Eds.) Kluwer Academic. 1153-1154.
- Bispo A., Martin A.C., Rodriguez C., Jourdain M.J. et Jauzein M. 1995b. Fate of phenanthrene and the induced ecotoxicity under biodegradative conditions in five contrasted soil materials. In *Fifth International FZK/TNO Conference on Contaminated Soils*. FZK/TNO (Eds.). Kluwer Academic. 359-360.
- Bispo A., Jourdain M.J. et Jauzein M. 1996. Caractérisation écotoxicologique des sols contaminés. In *Cinquièmes journées nationales de l'étude des sols*. Rennes, 22 -25 Avril.
- Bispo A., Jourdain M.J. et Jauzein M. 1997a. A procedure to assess soil and waste ecotoxicity. In *Seventh Annual Meeting of SETAC-Europe*. Amsterdam. 6-10 April.

- Bispo A., Jourdain M.J. et Jauzein M. 1997b. Les apports des tests d'écotoxicité à l'analyse d'une terre contaminée. *Analysis Magazine*. 25 (9-10) : M66-M69.
- Bitton G. et Dutka B.J. 1996. *Toxicity Testing Using Microorganisms*. Lewis. CRC Press. Boca Raton.
- Bitton G. et Koopman B. 1986. Biochemical tests for toxicity screening. In *Toxicity Testing Using Microorganisms*. Bitton G. et Dutka B.J. (Eds). CRC Press. Boca Raton. 27-55.
- Bitton G. et Koopman B. 1992a. Bacterial and enzymatic bioassays for toxicity testing in environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 125 : 1-22.
- Bitton G., Koopman B., et Agami O. 1992b. MetPAD : a bioassay for rapid assessment of heavy metal toxicity in wastewater. *Water Environ. Res.* 64 : 834-836.
- Bitton G., Campbell M. et Koopman B. 1992c. MetPAD: a bioassay kit for the specific determination of heavy metal toxicity in sediments from hazardous waste sites. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 7: 323-328.
- Bitton G., Jung K. et Koopman B. 1994. Evaluation of a microplate assay specific for heavy metal toxicity. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27: 25-28.
- Bitton G., Garland E., Kong I.C. Morel J.L. et Koopman B. 1996. A direct solid-phase assay specific for heavy metal toxicity. I. Methodology. *Journal of Soil contamination*. 5(4): 385-394.
- Blaise C., Sergy G., Wells P., Bermingham N., VanCoillie R. 1988. Biological testing - Development, application and trends in Canadian environmental protection laboratories. *Toxicity Assessment*. 3 : 385-406.
- Blaise C., Forghani R., Legault R., Guzzo J. et Dubow M.S. 1994. A bacterial toxicity assay performed with microplates, microluminescence and Microtox reagents. *Biotechniques*. 16 (5) 932-937.
- Bollag J.M. et Loll M.J. 1983. Incorporation of xenobiotics into soil humus. *Experientia* 39. 1221-1231.
- Bollag J.M. et Myers C. 1992. Detoxification of aquatic and terrestrial sites through binding of pollutants to humic substances. *The Science of the Total Environment*. 117-118 : 357-366.
- Bouché M. 1994. Mise au point et évaluation de la signification d'une batterie de tests d'écotoxicologie utilisant les lombriciens. *Rapport ADEME*. 27 p.
- Boularbah A., Morel J.L., Bitton G., et Mench M. 1996. A direct solid-phase assay specific for heavy-metal toxicity. II. Assessment of heavy-metal immobilisation in soils and bioavailability to plants. *Journal of Soil contamination*. 5(4) : 395-404.
- Boxall A.B.A. et Maly L. 1995. The characterization and toxicity of sediment contaminated with road runoff. *Water Research*. 29 (9) : 2043-2050.
- Brady N.C. et Weil R.R. 1996. Organisms and ecology of soil. In *The nature and properties of soil, 11th Edition*. Prentice Hall International Edition.

BRGM et Ministère de l'Environnement. 1995. Gestion des sites (potentiellement) pollués. Les outils de cette gestion : le pré-diagnostic, l'étude des sols, l'évaluation simplifiée des risques. Version 0.

Brouwer H., Murphy T. et McArdle L. 1990. A sediment-contact bioassay with *Photobacterium phosphoreum*. *Environ. Toxicol. Chem.* 9 : 1353-1358.

Bruckert S. 1979. Analyse des complexes organo-minéraux des sols. chap IX. In *Pédologie, Vol 2*. Bonneau M. et Souchier B. (Eds.). Masson. Paris. 187-209.

Bulich A.A et Isenberg D.L., 1981. Use of the luminescent bacteria system for the rapid assessment of aquatic toxicity. *ISA transaction.* 20 : 29-33.

Bulich A. 1982. A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples. *Process Biochemistry.* March/April : 45-47.

Bulich A.A, 1986. Bioluminescence assays. In *Toxicity testing using Microorganisms*. Bitton G. et Dutka B.J (Eds). CRC Press. Boca Raton. 50-74.

Calleja A., Baldasano J.M. et Mulet A. 1986. Toxicity analysis of leachates from hazardous wastes via Microtox and *Daphnia magna*. *Toxicity Assessment.* 1 (1) : 73-83.

Campbell M., Bitton., Koopman B. ET Delfino J.J. 1992. Preliminary comparison of sediment extraction procedures and exchange solvents for hydrophobic compounds based on inhibition of bioluminescence. *Environ. Toxicol. and Water Quality.* 7 : 329-338.

CEN. 1998. Basic characterization tests for leaching behaviour. Part 1. CEN/TC 192/WG6. Document N°113. (draft February 1998).

CEN. 1994. State of the art document waste characterization CEN/TC 292. Comité Européen de Normalisation.

Constant G., Bermingham N., Blaise C. et Féraud J.F. 1993. Potential ecotoxic effects probe (PEEP) : a novel index to assess and compare the toxic potential of industrial effluents. *Environ. Toxicol. and Water Quality.* 8 : 115-140.

Côté C., Blaise C., Michaud J.R., Ménard L., Trottier S., Gagné F. et Lifshitz. 1998. Comparison between microscale and whole-sediment assays for freshwater sediment toxicity assessment. *Environ. Toxicol. and Water Quality* 13 : 93-110.

Crouau Y. 1996. Mise au point de tests d'écotoxicité applicables aux sols et aux déchets, utilisant les arthropodes du sol. Rapport ADEME.

Dasappa S.M. et Loehr R.C. 1991. Toxicity reduction in contaminated soil bioremediation processes. *Water Research.* 25 (9) : 1121-1130.

Debus R. et Hund K. 1997. Development of analytical methods for the assessment of ecotoxicological relevant soil contamination. Part B-Ecotoxicological analysis in soil and soil extracts. *Chemosphere.* 35 : 239-261.

DECHEMA. 1995. Bioassays for soils. Committee "Methods for toxicological/ecotoxicological assessment of soils. G. Kreysa et J. Wiesner (Eds). Frankfurt am Main. DECHEMA. 45 p

Département Fédéral de l'Intérieur. 1997. Explications relatives à l'ordonnance sur l'assainissement des sites pollués par des déchets (ordonnance sur les sites contaminés ; OSC). Avril 1997

Dickerson R.L., Matter J.M., Anthony A.B. et Sills-McMurry C. 1997. Development and validation of biomarkers of endocrine disruption in wildlife : studies in avian, mammalian and reptilian species. In *Seventh Annual Meeting of SETAC-Europe*. Amsterdam. 6-10 April.

Dombroski E.C., Gaudet I.D., Florence L.Z. et Qureshi A.A. 1996. A comparison of techniques used to extract solid samples prior to acute toxicity analysis using the Microtox test. *Environ. Toxicol. and Water Quality*. 11 : 121-128.

Doran J.W. et Linn D.M. 1994. Microbial ecology of conservation management systems. In *Soil biology : effects on soil quality*. Hatfield J.L. et Stewart B.A. (Eds). Lewis publisher. 1-27.

Duchaufour P. 1983. Pédologie. 1. Pédogenèse et classification. Duchaufour P. (Ed). Masson. Paris

Dutka B.J., Bourbonniere R., McInnis R., Kwan K.K. et Jurkovic A. 1995. Bioassay assessment of impacts of tar sands extraction operations. *Environ. Toxicol. and Water Quality*. 10 : 107-117.

Eijsackers H. 1994. Ecotoxicology of Soil Organisms : Seeking the way in a Pitch -Dark labyrinth. In *Ecotoxicology of Soil Organisms*. Donker M.H., Eijsackers H. et Heimbach F. (Eds). Lewis Publisher. 3-35

EN 12457. 1997. Essai de conformité pour la lixiviation des déchets fragmentés -Etude de la lixiviation des constituants des déchets fragmentés et des boues. Projet de norme. Comité Européen de Normalisation.

Environnement CANADA. 1996. Guidance document on the interpretation and application of data for environmental toxicology. Third draft. Environmental Protection Series. Environnement Canada. Ottawa. 227 p.

EPFL. 1996. Evaluation ecotoxicologique du risque de décharges inertes : élaboration d'une marche à suivre. Département des travaux publics, de l'aménagement et des transports. Lausanne. 46 p.

Fardeau J.C. 1993. Le phosphore assimilable des sols : sa représentation par un modèle fonctionnel à plusieurs compartiments. *Agronomie*. 13 : 317-331.

Foissner W. 1987. Soil Protozoa: Fundamental Problems , Ecological Significance, Adaptations in Ciliates and Testaceans, Bioindicators, and Guide to the Literature. *Progress in Protistology*. 2 : 69-212.

Forge T.A., Berrow M.L., Darbyshire J.F. et Warren A. 1993. protozoans bioassays of soil amended with sewage sludge and heavy metals using the common soil ciliate *Colpoda steinii*. *Biol. Fertil. Soils*. 16 : 282-286.

Fouchecourt M.O. et Riviere J.L. 1995. Activities of P450-dependent monooxygenases and antioxidant enzymes in different organs of norway rats inhabiting reference and contaminated sites. *Chemosphere*. 31 (11-12) : 513-522.

- Fouchecourt M.O. 1996. Bioévaluation de la contamination organique des sols : recherche des biomarqueurs chez des rats sentinelles et mise au point d'un bioessai avec le rat de laboratoire. *Thèse de doctorat en toxicologie de l'environnement. Université de Metz.*
- Fouchecourt M.O. et Riviere J.L. 1996. Activities of liver and lung cytochrome P450-dependent monooxygenases and antioxidant enzymes in laboratory and wild norway rats exposed to reference and contaminated sites. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 30. 513 : 522.
- Ghosh S.K., Doctor P.B. et Kulkarni P.K. 1996. Toxicity of zinc in three microbial systems. *Environ. Toxicol. And Water Quality.* 9 : 13-19.
- Giesy J.P. 1987. A comparison of three sediment bioassay method for Detroit river sediments. *MICROBICS reference N° 117.*
- Gill B.S. et Sandhu S.S. 1991. Detection of genetic hazards from environmental chemicals with plant test systems. In *Hazardous Waste Measurements*. Simmons M.S. (Eds). Lewis Publisher. 12 : 247-274.
- Gomot L. et Gomot A. 1996. Utilisation des escargots comme bio-indicateurs de pollution par les métaux : mise au point d'un test de toxicité. *Rapport ADEME n°4930015.* 30 p
- Gomot L. et Gomot A. 1997. Utilisation des escargots comme bio-indicateurs de pollution par les métaux : validation d'un test de toxicité et étude de la bioaccumulation. *Rapport ADEME n°9693019.* 32 p
- Grolières C.A. et Dupy-Blanc J. 1985. Action du Thiram (T.M.T.D) sur le cortex de *Tetrahymena pyriformis* au cours de la stomatogénèse. *Protistologica.* XXI (4) : 525-540.
- Guérin C. 1999. Mise au point d'un protocole d'essai micronoyau sur cellules somatiques de pousses de racines d'orge (*Hordeum vulgare* L.). *Thèse de doctorat. Université de Paris VI.* A paraître.
- Gunkel J., Rönnpagel A. et Ahlf W. 1993. Suitability of microbial bioassays for bound contaminants. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 21 (4) : 215-220.
- Haigh S.D. et Rennie A.F.K. 1994. Rapid methods to assess the effects of chemicals on microbial activity in soil. *Environ. Toxicol. and Water Quality.* 9 : 347-354.
- Hammel W., Steubing L. and Debus R. 1997. Assessment of the potential of soil contaminants using a soil algae test. In *Seventh Annual Meeting of SETAC-Europe.* Amsterdam. 6-10 April.
- Hartwell S.I. 1997. Demonstration of a toxicological risk ranking method to correlate measures of ambient toxicity and fish community diversity. *Environ. Toxicol. and Chem.* 16 (2) : 361-371.
- Harvey E. G. 1996. Mechanisms of carcinogenesis of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polycyclic Aromatic Compounds.* 9 : 1-23.
- Hayden N.J., Voice T.C., Annable M. D. et Wallace R.B 1992. Prediction of leachate concentrations in petroleum-contaminated soils. *Journal of Soil Contamination.* 1 (1) : 81-93.

- Heimbach U. 1994. Assessment of pesticide safety to the Carabid beetle, *Poecilus cupreus*, using different semifield enclosures. In *Ecotoxicology of Soil Organisms*. Donker M.H., Eijsackers H. et Heimbach F. (Eds). Lewis Publisher. 273-285
- Ho K.T, Mills L.J., Mueller C., Anderson S.C. et Malcolm A.M. 1994. The influence of sediment extract fractionation methods on bioassay results. *Environ. Toxicol. and Water Quality*. 9 : 145-154.
- Ho K.T, McKinney R.A., Kuhn A., Pelletier M.C. and Burgess R.M. 1997. Identification of acute toxicants in new harbor sediments. *Environ. Toxicol. and Chem.* 9 : 551-558.
- Hornsby A.G. et Davidson J.M. 1973. Solution and adsorbed fluometuron concentration distribution in water saturated soil : experimental and predicted evaluation. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 37 : 822-829.
- Hosy C. 1994. Détermination de la toxicité des métaux lourds dans les sols par le test microbiologique MetPLATE®. *Rapport de DEA "Sciences Agronomiques"*. ENSAIA-INPL.
- Howard P.H. 1991. Handbook of environmental degradation rates. Lewis Publisher.
- Hutzer N.J., Crittenden J.C. et Gierke J.S. 1986. Transport of organic compounds with saturated groundwater flow : experimental results. *Water Resources Research*. 22 (3) 285-295.
- ISO 11074-1. 1997. Qualité du sol-partie 1. Termes et définitions relatives à la protection et à la pollution des sols. *International Standart Organisation*.
- ISO 14240-1. 1997. Qualité du sol. Détermination de la biomasse microbienne du sol. Partie 1. Méthode par respiration induite par le substrat. *International Standart Organisation*.
- ISO 14240-2. 1997. Qualité du sol. Détermination de la biomasse microbienne du sol. Partie 2. Méthode par fumigation-extraction. *International Standart Organisation*.
- Jagers op Akkerhuis G.A.J.M. 1994. Effects of walking activity and physical factors on the short term toxicity of Deltamthrin spraying in adult epigeal money spiders (Linyphiidae). In *Ecotoxicology of Soil Organisms*. Donker M.H., Eijsackers H. and Heimbach F. (Eds). Lewis Publisher. 323-338
- Jauzein M., Jourdain M.J., Bispo A. et Savanne D. 1998. Tests biologiques applicables aux sols et aux déchets. A paraître.
- Jonhson B.T. 1992. Potential genotoxicity of sediments from Great Lakes. *Environ. Toxicol. and Water Quality*. 7 : 373-390.
- Jonhson B.T. 1993. Activated Mutatox assay for detection of genotoxic substances. *Environ. Toxicol. and Water Quality*. 8 : 103-113.
- Jung K., Bitton G. et Koopman B. 1995. Assessment of urease inhibition assays for measuring toxicity of environmental samples. *Water Research*. 29(8) : 1929-1933.
- Kong I. C., Bitton G. Koopman B. et Jung K. 1995. Heavy metal toxicity testing in environmental samples. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 142 : 119-147.
- Kooijman J.H. 1987. A safety factor for LC50 values allowing for differences in sensitivity among species. *Water Research*. 21 : 269-276.

- Kördel W. et Hund K. 1998. Soil extraction methods for the assessment of the ecotoxicological risk of soils. In *Contaminated Soil '98. FZK-TNO Conference on contaminated soils*. Edimburg 1998. Postscripts of the congress. Thomas Telford. 241-250.
- Kroes R. 1995. Toxicity testing and human health. In *Risk assessment of chemicals. An introduction*. Van Leeuwen C.J. et Hermens J.L.M. (Eds). Kluwer Academic Press. 147-174.
- Kwan K.K., Dutka B.J., Rao S.S. et Liu D. 1990. Mutatox test : a new test for monitoring environmental genotoxic agents. *Environmental Pollution*. 65 : 323-323.
- Kwan K.K. et Dutka B.J. 1990. Simple two step extraction procedure for use in genotoxicity and toxicity bioassays. *Toxicity Assessment*. 5 : 395-404.
- Kwan K.K. et Dutka B.J. 1992. A novel bioassay approach : direct application of the toxichromotest and the SOS-Chromotest to sediments. *Environ. Toxicol. and Water Quality*. 7 : 49-60.
- Kwan K.K. 1993. Direct solid phase toxicity testing procedure. *Environ. Toxicol. and Water Quality*. 8 : 345-350.
- Lagadic L., Caquet T. et Amiard J.C. 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. dans *Biomarqueurs en écotoxicologie-Aspects fondamentaux*. Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. et Ramade F. (Eds). Masson. Paris. 419 p.
- Lambalez L., Vasseur P., Féraud J.F. et Gisbert T. 1994. The environmental risks of industrial waste disposal : an experimental approach including acute and chronic toxicity studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 28, 317-328.
- Lebourg A., Sterckeman T., Ciesielski H. et Proix N. 1996. Intérêt de différents réactifs d'extraction chimique pour l'évaluation de la biodisponibilité des métaux en trace du sol. *Agronomie*. 16 : 201-215.
- Lecomte P. 1998. Les sites pollués : traitement des sols et des eaux souterraines. Lavoisier Tec et DOC. Paris.
- Legault R., Blaise C, Rokossh D. and Chong-Kit R. 1994. Comparative assessment of the SOS Chromotest kit and the Mutatox test with Salmonella plate incorporation (Ames test) and fluctuation tests for screening genotoxic agents. *Environ. Toxicol. and Water Qual.* 9 : 45-57.
- Leszczynska M. et Oleszkiwic J.A. 1995. Application of the fluoresceine diacetate hydrolysis as an acute toxicity test. *Environ. Technol.* 17 : 79-85.
- Leyval C., Weissenhorn I., Glashoff A. et Berthelin J. 1994. Influence des métaux lourds sur la germination des spores de champignons endomycorrhiziens à arbuscule dans les sols. *Acta bot. Gallica*. 141 (4) : 523-528.
- Leyval C., Singh B.R. et Joner E.J. 1995. Occurrence and infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in some norwegian soils influenced by heavy metal and soil properties. *Water, Air and Soil Pollution*. 84 : 203-216.
- Lokke H. 1994. Ecotoxicological extrapolation : Tool or Toy. In *Ecotoxicology of Soil Organisms*. Donker M.H., Eijssackers H. et Heimbach F. (Eds). Lewis Publisher. 411-425.

- Ma T. 1979. Micronuclei induced by X rays and chemicals mutagens in meiotic pollen mother cells of Tradescantia, a promising mutagen test system. *Mutation Res.* 99 : 307-313.
- Manceau A. 1996. Apports de la spéciation des éléments traces métalliques pour évaluer l'écotoxicité des sols et des déchets. *Rapport ADEME n°4930029*. 15 p.
- Martinet P. 1997. Développement d'essais de caractérisation de l'écotoxicité d'un sol et d'un déchet : utilisation des larves d'*Oxythyrea funesta*. *Rapport ADEME n°9593001*. 57 p.
- Matthews J.E et Hastings L. 1987. Evaluation of toxicity test procedure for screening treatability potential of waste in soil. *Toxicity Assessment*. 2 : 265-281.
- Mazidji C.N., Koopman B., Bitton G. et Neita D. 1992. Distinction between heavy metal and organic toxicity using EDTA chelation and microbial assays. *Environ. Toxicol. and Water Quality*. 7 : 339-353.
- McLaren R. 1998. Assessment of heavy metal contamination of soils using sequential fractionations. *16th World Congress of Soil Science. Montpellier. 20-26 August 1998*.
- Meink F. et Mühle H. 1983. Dictionnaire technique de l'eau et de l'assainissement. R. Oldenbourg Verlag.
- Mench M., Coussin F., Mocquot B., Bussièrre S., Prunet T. et Lagriffoul A. 1996. Evaluation d'un biotest végétal et de la spéciation des éléments traces métalliques à la mise au point d'une batterie de tests d'écotoxicologie terrestre applicable aux sols et aux déchets. *Rapport ADEME n°4930029*. 50 p.
- Microbics. 1995a. Microtox acute toxicity solid phase test. Version 3. Carlsbad, CA. 12 p.
- Microbics. 1995b. Mutatox manual. Version 1. Carlsbad, CA. 12 p.
- Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement. 1997a. Recensement 1996 des sites et sols pollués. Ministère de l'environnement. Direction de la prévention des pollutions et des risques. 430 p.
- Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement. 1997b. Critères et méthodes d'évaluation de l'écotoxicité des déchets. Version de Décembre 1997. Ministère de l'environnement. Direction de la prévention des pollutions et des risques. 20 p.
- Ministère de l'environnement du Québec. 1988. Guide standard de caractérisation des terrains contaminés. 19 p.
- Morel J.L. 1997a. Bioavailability of trace elements to terrestrial plants. In *Soil Ecotoxicology*. Tarradellas J., Bitton G. and Rossel D. (Eds). Lewis publisher, CRC Press, Boca Raton, FL. 141-176.
- Morel J.L. 1997b. Assessment of phytoavailability of trace elements in soils. *Analisis Magazine*. 25 (9-10) : M70-M72.
- Myers T.E., Gambrell R.P. et Tittlebaum M.E. 1991. Design of an improved column leaching apparatus for sediment and dredged materials. *Miscellaneous paper D-91-3 - Final report*. US Army Corps of Engineers. Washington. 1-43.

- Nannipieri P., Badalucco L., Landi L. et Pietramellara C. 1997. Measurements in assessing the risk of chemicals to soil ecosystems. In *Ecotoxicology : responses, biomarkers and risk assessment*. Zelikoff J.T. (Ed). OECD workshop. SOS Publications, Fair Haven. USA.
- Notenboom J., Römbke J., Folkerts A.J. et de Groot A. 1997. Effects of heavy metals on enchytraeid worms : comparison between observation in the field and laboratory toxicity data. In *Seventh annual meeting of SETAC-Europe*. Amsterdam. 6-10 April.
- OCDE. 1981. Summary of considerations in the report from the OECD expert group on ecotoxicology. *OCDE Guidelines for testing of chemicals*.
- OCDE 207. 1984. Earthworms, acute toxicity tests. *OCDE Guidelines for testing of chemicals*.
- OCDE 208. 1984. Terrestrial plants, growth tests. *OCDE Guidelines for testing of chemicals*.
- O'Connor G.A., Van Genuchten M.T. et Wierenga P.J. 1976. Predicting 245-Trichlorophenol in soil columns. *J. Environ. Qual.* 5 (4) : 375-378.
- Ongley E.D., Birkholz D.A., Carey J.H. and Samoiloff M.R. 1988. Is water a relevant sampling medium for toxic chemicals. An alternative environmental sensing strategy. *J. Environ. Qual.* 17 : 391-401.
- Palmer G., McFadzean R., Killham K., Sinclair A. et Paton G.I. 1998. Use of a lux-based biosensor for rapid diagnosis of pollutants in arable soils. *Chemosphere*. 36 (12) : 2683-2697.
- Perrin-Ganier C., Schiavon M., Portal J.M., Breuzin C. et Babut M. 1994. Dynamics of precipitations and evolution of the herbicide isoproturon in the topsoil. In *Proceedings of the 5th international workshop "Environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects"*. Brussels. April 26-29.
- Perrodin Y. et Abdelghafour M. 1996. Test de Percolation sur colonne pour l'étude du relargage des polluants des sols (ou déchets granulaires). Protocole établi par Polden à l'issue de l'étude Inter Agences de l'Eau sur le relargage des sols des sites pollués. *Document Polden*.
- Persooone G. 1991. Cyst based toxicity tests I : a promising new tool for rapid and cost-effective toxicity screening of chemicals and effluents. *Zeitschrift für Angewandte Zoologie*. 78 (2) : 235-241.
- Petz W. et Foissner W. 1989. The effects of mancozeb and lindane on the soil microfauna of a spruce forest : a field study using a completely randomized block design. *Biol. Fertil. Soils*. 7 : 22-231
- Poinsot-Balaguer N., Racon L., Sadaka N. et Le Petit J. 1993. Effects of tanins compounds on two species of Collembola. *Eur. J. Soil Biol.* 29 : 13-16
- Ramade F. 1992. Précis d'écotoxicologie. Masson. Paris.
- Ribo J.M et Kaiser L.E. 1987. *Photobacterium phosphoreum*. Toxicity bioassay. I. Test procedures. *Toxicity Assessment*. 2 : 305-323.
- Ribo J.M et Kaiser L.E. 1988. *Photobacterium phosphoreum*. Test Procedures. II Toxicity data compilation. *Toxicity Assessment*. 3 : 195-237.

Ringwood A.H., DeLorenzo M.E., Ross P.E. et Holland A.F. 1997. Interpretation of Microtox solid phase toxicity tests : the effects of sediment composition. *Environ. Toxicol. and Chem.* 16 (6) : 1135-1140.

Rivière J.L. 1993. Les animaux sentinelles. *Courrier de l'Environnement de la Cellule INRA.* 20 : 59-67.

Rivière J.L. 1997a. Ecotoxicologie : théorie et application. *Traduction de Ecotoxicology in theory and practice de V.E. Forbes et T.L. Forbes (Eds.).* INRA Edition.

Rivière J.L. 1997b. Evaluation du risque écologique des sols pollués. Lavoisier TEC et DOC. 230 p.

Rodriguez C. 1996. Extraction par fluide supercritique : contribution à la caractérisation des sols contaminés par des hydrocarbures polycycliques aromatiques. *Thèse de doctorat en génie des procédés, LSGC-INPL. Nancy.*

Römbke J., Knacker T., Förster B. et Marcinkowski. 1994. Comparison of effects of two pesticides on soil organisms in laboratory tests, microcosms and in the field. In *Ecotoxicology of Soil Organisms.* Donker M.H., Eijsackers H. et Heimbach F. (Eds). Lewis Publisher. 229-240.

Ross P.E. et Henebry M.S. 1989. Use of four microbial tests to assess the ecotoxicological hazard of contaminated sediments. *Toxicity Assessment.* 4 : 1-21.

Rossel D., Tarradellas J., Bitton G. et Morel J.L. 1997. Use of enzymes in soil ecotoxicology : a case for deshydrogenase and hydrolytic enzymes. In *Soil Ecotoxicology.* Tarradellas J., Bitton G. et Rossel D. (Eds). Lewis publisher. New York. 179 -206.

Rutgers M., van't Verlaat I., Wind B., Posthuma L. et Breure T. Rapid method to assess population induced community tolerance in contaminated soil. In *Seventh annual meeting of SETAC-Europe.* Amsterdam. 6-10 April.

Schiavon M. 1988a. Studies of the leaching of Atrazine of its chlorinated derivatives and hydroxyatrazine from soil using 14C Ring-Labeled compounds under outdoor conditions. *Ecotoxicology and Environmental safety.* 15 : 46-54.

Schiavon M. 1988b. Studies of the movement and the formation of bound residues of atrazine of its chlorinated derivatives and hydroxyatrazine in soil using 14C Ring-Labeled compounds under outdoor conditions. *Ecotoxicology and Environmental safety.* 15 : 55-61.

Schwartz, C., Bispo, A., Rothenflug, C., Jourdain, M.J., Jauzein, M., et Morel, J.L. Assessment of soil toxicity with two microbiological tests. In *Ecotoxicology and Environmental Safety.* SECOTOX Conference. Metz. 1996.

Sheppard S. C., Evenden W.G., Abboud S.A., Stephenson M. 1993. A plant cycle bioassay for contaminated soil, with comparison to other bioassays : mercury and zinc. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* (25 : 27-35.

Slooff W., Canton J.H. et Hermens J.L.M. 1983. Comparison of the susceptibility of 22 freshwater species to 15 chemicals compounds. I. (Sub)acute toxicity tests. *Aquat. Toxicol.* 4 : 113-128.

- Sims R.C. et Overcash R.M. 1983. Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil plant systems. *Residue Rev.* 88 : 1-58.
- Somasundaram J., Coats R. et Rocke K.D. 1991. Mobility of pesticides and their hydrolysis metabolites in soils.
- Sprague J.B. 1995. Invited dabate/Commentary : A brief critique of today's use of aquatic toxicity tests. *Human and Ecological Risk Assessment.* 1 : 167-170.
- Steinberg S.M, Piziomek E.J, Engelmann W.H et Rogers K.R, 1995. A review of environmental applications of bioluminescence measurements. *Chemosphere.* 30 (11) : 2155-2197.
- Stephan C.E. 1986. Proposed goals of applied aquatic ecotoxicology. In *Aquatic Toxicology and Environmental Fate.* Poston T.M. et Purdy (Eds). ASTM (3).
- Svenson A., Edsholte E., Ricking M., Remeberger M. et Rottorp J. 1996. Sediment contaminants and Microtox toxicity tested in a direct contact exposure test. *Environ. Toxicol. and Water Quality.* 11 : 293-300.
- Swanson M.B., Davis G.A., Kincaid L.E., Schultz T.W., Bartmess J.E. Jones S.L. et George E.L. 1997. A screening method for ranking and scoring chemicals by potential human health and environmental impacts. *Environ. Toxicol. and Chem.* 16 (2) : 372-383.
- Symons BD et Sims RC. 1988. Assessing detoxification of a complex hazardous waste using Microtox bioassay. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 17 : 497-505.
- Tarradellas J., Diercxsens P. et Bouché M.B. 1982. Methods of extraction and analysis of PCBs from earthworms. *Inter. J. Environ. Chem.* 13 : 55-67.
- Tarradellas J. et Bitton G. 1997. Chemical pollutants in soils. In *Soil Ecotoxicology.* Tarradellas J., Bitton G. et Rossel D. (Eds). Lewis publisher. Boca Raton. 3-32.
- Tas J.W et Van Leeuwen C.J, 1995. Glossary. In *Risk assessment of chemicals. An introduction.* Van Leeuwen C.J. et Hermens J.L.M. (Eds). Kluwer Academic Press. 339-361.
- Tay K.L., Doe K.G., Wade S.J., Vaughan D.A., Berrigan R.E. et Moore M.J. 1992. Sediment contaminants and Microtox toxicity tested in a direct contact exposure test. *Environ. Toxicol. and Chem.* 11 : 1567-1581.
- Tevissen E. 1993. Méthodologie d'étude et modélisation du transport de solutés en milieux poreux naturels. Application à la migration du chrome dans la nappe alluviale du Drac (Isère). *Thèse de doctorat. ENSIC-INPL.* 168 p.
- Torstenssen L. 1997. Microbial assays in soils. In *Soil Ecotoxicology.* Tarradellas J., Bitton G. et Rossel D. (Eds). Lewis publisher. Boca Raton. 207-234.
- Torsvik V., Goksoyr J. et Daae F.L. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. and Environ. Microbiol.* 782-787.
- True C.J. et Heyward A.A. 1990. Relationships between Microtox test results, extraction methods and physical and chemical composition of marine sediments samples. *Toxicity Assessment.* 5 : 29-45.

Truhaut R. 1977. Ecotoxicology : objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicol. Env. Safety*. 1 : 151-173.

US EPA. 175-B-97-001. 1997. Terms of environment : Glossary, abbreviations and acronyms, Revised December 1997. 70 p.

USEPA. 600/3-88/036. 1989. Methods for aquatic toxicity identification evaluation. Phase III Toxicity confirmation procedures. Environmental Research Laboratory. Duluth, MN.

USEPA. 600/6-91/003. 1991. Methods for aquatic toxicity identification evaluation. Phase I Toxicity characterization procedures of chronically toxic effluents. 2nd Edition. Environmental Research Laboratory. Duluth, MN.

USEPA. 600/6-91/005F. 1992. Toxicity Identification Evaluation. Characterization of chronically toxic effluents, Phase I. Environmental Research Laboratory. Duluth, MN.

Vallaëys T., Courde L. et Chaussod R. 1997. Assessing side effects of micropollutants on soil microflora. *Analisis Magazine*. 25 (9-10) : M60-M66.

Van Brummelen T.C. 1994a. Toxicity of 5 PAHs for the terrestrial Isopod *Oniscus asellus*. Communication personnelle.

Van Brummelen T.C. 1994b. Lethal and sublethal toxicity of Benzo(a)pyrene on the Collembolan *Orchesella cincta*. Communication personnelle.

Van Guchte C. et Maas-Diepeveen J.L. 1987. Screening sediments for toxicity : a water concentration related problem. In *14th Annual Aquatic Toxicology Workshop*. Toronto. November 1-4.

Van Leeuwen C.J. Ecotoxicological effects. 1995. In *Risk Assessment of Chemicals : an Introduction*. Van Leeuwen C.J. and Hermens J.L.M. (Ed). Kluwer Academic Publishers. 175-237.

Van Straalen N.M. et Denneman C.A.J. 1989. Ecotoxicological evaluation of soil quality criteria. *Ecotox. Environ. Saf.* 18 : 241-251.

Van Straalen N.M. et Van Gestel C.A.M. 1993. Soil invertebrates and micro-organisms. In *Handbook of Ecotoxicology*. Calow. P. (Eds). Blackwell Scientific Publications. 251-277.

Van Straalen N.M. 1994. Biodiversity of ecotoxicological responses in animals. *Netherlands Journal of Zoology*. 44 (1-2) : 112-129.

Vanhala P.T. et Ahtiaïnen J.H.I.V. 1994. Soil Respiration, ATP Content, and Photobacterium toxicity test as indicators of metal pollution in soil. *Environ. Toxicol. and Water Quality*. 9 : 115-121.

Vasseur P., Rast C., Bessi H., Bekaert C. et Ferrier V. 1996. Etude de la génotoxicité de déchets et de sols contaminés. *Rapport ADEME n° 4930031*. 92 p.

Vasseur P., Rast C., Fouchecourt M.O., S. Pozza, M. Jauzein, M.J. Jourdain, A. Bispo, V. Ferrier et C. Bekaert. 1998. Etude du relargage des polluants toxiques et génotoxiques par percolation de sols contaminés. *Rapport ADEME n°9693026*. 26 p

Verschaeve L. et Gilles J. 1995. Single cell gel electrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54 : 112-119

- VROM. 1983. Soil protection guideline. 1983/1990. Staatsuitgeverij, The Hague.
- Wahle U. et Kördel W. 1997. Development of analytical methods for the assessment of ecotoxicological relevant soil contamination. Part A-Development and improvement of soil extraction methods for the determination of the bioavailable parts of contaminants. *Chemosphere*. 35 : 223-237.
- Walker C.H. 1995. Biochemical biomarkers in ecotoxicology-some recent developments. *The Science of the Total Environment*. 171 : 189-195
- Walsh P., El Adlouni C., Mukhopadhyay M.J., Viel G., Nadeau D. et Poirier G.G. 1995. ³²P-
 poslabelling determination of DNA adducts in the earthworm *Lumbricus terrestris* exposed to PAH-contaminated soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54 : 654-661.
- Wang W. et Freemark K. 1995. The use of plants for environmental monitoring and assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 30 : 289-301.
- Wang X., Yu X. et Bartha R. 1990. Effect of bioremediation on polycyclic aromatic hydrocarbons residues in soil. *Envir. Sci. Technol.* 24 (7) : 1086-1089.
- Wetzel A. et Werner D. 1995. Ecotoxicological evaluation of contaminated soil using the legume root nodule symbiosis as effect parameter. *Environ. Toxicol. and Water Quality*. 10 : 127-133.
- Wong P.T.S. et Dixon D.G. 1995. Bioassessment of water quality. *Environ. Toxicol. and Water Quality*. 10 : 9-17.
- Wood M. 1995. Environmental soil biology. 2nd Edition. Chapman et Hall. 150 p.

Résumé

La recherche était destinée, dans un premier temps, à comprendre les conditions de mobilisation des polluants associés à des matériaux solides, tels que les terres ou les déchets, puis, dans un second temps, à élaborer une démarche et à proposer des méthodes pour caractériser les dangers et les risques, à court et à long terme, liés à la présence de composés toxiques, organiques et/ou métalliques. Dans ce but, des échantillons de terre contaminés au laboratoire ou prélevés directement sur des sites industriels ainsi que des déchets ont été constitués. Une batterie de tests biologiques (*Vibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* et *Vibrio fischeri* M169) a été appliquée sur des extraits obtenus par lixiviation statique en faisant varier le solvant (eau, méthanol, tampons phosphate et borate) et les conditions de l'extraction (rapport massique solide/liquide, durée de lixiviation, et filtration) ainsi que par percolation dynamique en colonne. Afin de prévoir l'évolution de la toxicité et de la génotoxicité, des essais de dégradation ont également été réalisés. Les résultats montrent que le rendement d'extraction et l'intensité de la réponse toxique dépendent des conditions de la lixiviation. En général, la toxicité des échantillons contaminés au laboratoire est plus forte que celle d'échantillons prélevés sur des sites industriels, traduisant l'influence des conditions et de la durée de vieillissement sur l'état et la mobilité des polluants dans les terres et les déchets. La percolation en colonne a permis de mettre en évidence une migration différentielle des polluants en fonction de leur solubilité dans l'eau, de plus, elle évalue la durée sur laquelle s'effectue leur relargage. La toxicité et la génotoxicité mesurées après 30 semaines de percolation démontrent l'existence d'une réserve polluante toxique qui est aussi révélée par les lixiviations statiques montrant une différence de toxicité entre les extraits aqueux et au méthanol. Enfin la toxicité et la génotoxicité des échantillons sont diminuées ou amplifiées par la dégradation, en fonction des conditions imposées. En conclusion, la caractérisation du danger toxique et génotoxique à court et à long termes devrait reposer sur l'utilisation d'une gamme de lixiviations statiques à l'eau et à d'autres solvants comme le méthanol, couplée à une batterie de tests biologiques complémentaires. Elle pourrait ensuite être complétée par des essais de percolation et/ou d'incubation, afin d'acquérir des informations sur l'évolution de la toxicité.

Abstract

This research was devoted to the understanding of the mobility of contaminants in soils and wastes and to the development of a procedure and methods to assess hazard and risks, at short- and long-term scale that are linked to the existence of metallic and/or organic toxic compounds in polluted solid samples. Both spiked and industrial soil samples, as well as wastes, were collected. A battery of bioassays (*Vibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri* M169) was run on soil and waste extracts obtained through static leaching procedures with various solvent (water, methanol, phosphate and borate buffers) and extraction conditions (solid/liquid ratio, contact time, and filtration) and through dynamic extraction conditions, in a percolation assay. Incubation assays were also conducted to evaluate the evolution with time of toxicity. Results indicated that both the extraction efficiency and the intensity of toxicity are dependent from leaching conditions. In general, toxicity of spiked soil samples was greater than toxicity of those collected on industrial sites as a result of ageing processes that regulate the reaction with the matrix and the mobility of pollutants. In the percolation assay, pollutants behaviour was different depending on their solubility, moreover it also evaluate the time-scale of the leaching of pollutants. Toxicity and genotoxicity detected after 30 weeks of percolation demonstrated the existence of a large pool of toxic pollutants, a result which is in agreement with data from leaching trials performed with water and methanol. Incubation assays indicated a decrease or an increase of toxicity and genotoxicity during degradation processes, according to the incubation conditions. In conclusion, the assessment of hazards and risks, at a short- and long-term scale, should be based on water and other solvent leachates coupled to a battery of bioassays. Such a characterisation should be completed with percolation and/or degradation studies if information on toxicity behaviour are needed.

Annexe I

Analyses de la terre S1

Prélèvement et préparation

Ce échantillon est souillé par des solvants organiques et des culots de distillation de régénération de solvants. Il a été prélevé en juin 1994 dans une lagune de stockage en six points différents sur 1 m² une profondeur max de 2,5 m. Il n'y avait pas de couvert végétal. La terre utilisée pour les biotests a préalablement été séchée à température ambiante pour ramener sur humidité à 10 %. Elle a ensuite été épierrée manuellement, broyée puis laminée à 5 mm. L'homogénéisation a été réalisée dans une bétonnière de travaux publics.

Analyse de l'échantillon

Humidité brute		10,40%	Polychlorobiphényles	
Fraction minérale	% de la MS	90,2		
Fraction organique	% de la MS	9,8		
Indice phénol	mg/Kg de prodbrut	<1		en mg/Kg de MS
			PCB Arochlor 1242	4,5
			PCB Arochlor 1254	204
			PCB Arochlor 1260	13,7
			PCB 28	0,8
			PCB 52	12,9
			PCB 101	17,1
			PCB 138	17,5
			PCB 153	14,5
			PCB 180	3,9
Métaux Lourds et Cyanures				
	en mg/Kg de MS			
Hg	2,24			
Cd	29,6			
As	12,03			
Cu	201			
Ni	50,3			
Cr	342			
Pb	1200			
Zn	2270			
Cyanures totaux	<1			
			Aromatiques Chlorés	
				en µg/Kg de MS
			dichlorobenzène 1-2	<10
			dichlorobenzène 1-3	<10
			dichlorobenzène 1-4	<10
			trichlorobenzène 1-2-3	221
			trichlorobenzène 1-2-4	558
			trichlorobenzène 1-3-5	<2
Composés organiques volatils				
	en µg/Kg de MS		Organo-halogénés volatils	
benzène	<500			en µg/Kg de MS
toluène	<500		bromoforme	<100
xylènes	<500		dibromométhane	<50
			dichlorobromométhane	<50
			1-2 dichloroéthane	<500
			1-1 dichloroéthylène	<100
			dichlorométhane	<1000
			chloroforme	<20
HAP			tétrachlorure de carbone	<10
	en mg/Kg de MS		1,1,1, trichloroéthane	<10
Fluoranthène	1,21		trichloroéthylène	<20
Benzo-b-fluoranthène	0,43		tétrachloroéthylène	<10
Benzo-k-fluoranthène	0,21			
Benzo-a-pyrène	0,25			
Benzo-ghi-pérylène	0,22			
Indéno-1,2,3-pyrène	0,33			
Somme des 6 HPA	2,65			

Analyse de la spéciation des métaux (Manceau, 1996)

- Le chrome est présent à l'état d'oxydation 3+. Aucune trace d'ions chromates n'a été détectée. Sa spéciation est multiple, il est fixé à la fois par les constituants organiques et inorganiques du sol.
- Le zinc est, pour un peu moins de la moitié, sous forme de ZnS et, pour le reste, majoritairement fixé de façon non-échangeable par les argiles. Cette dernière forme est a priori très peu disponible pour les êtres vivants. Par contre, la présence de sulfures présente un risque car le soufre est facilement oxydé en sulfate libérant par la même une partie du zinc. Une partie du zinc ainsi solubilisée serait ensuite immobilisée par la fraction argileuse. Autrement dit, on peut raisonnablement penser que les argiles Zn se formeraient suite à l'oxydation du stock de sulfures.
- Le plomb est présent sous au moins deux formes : PbS et Pb²⁺ - (O, OH). Il est possible qu'une partie du plomb soit fixée par les oxyhydroxydes de fer. La présence de sulfures confirme le caractère réducteur de ce milieu.

Analyses de la terre S2

Prélèvement et préparation

Cet échantillon est contaminé par des résidus de cokerie. Il a été prélevé en juillet 95, à la pelle mécanique dans d'anciennes cuves de rétention de cokerie comblées par des matériaux de démolition. La superficie échantillonnée est de 20 m² sur une profondeur maximale de 1,5 m. Son humidité de départ était d'environ 25 %, le sol a été épierré et tamisé à 5 mm en l'état avant d'être homogénéisé dans une bétonnière de travaux publics.

Analyse de l'échantillon

Humidité de départ	25%	Polychlorobiphénylés	<u>en mg/Kg de MS</u>
Fraction minérale	% de la MS	PCB Arochlor 1242	<1
Fraction organique	% de la MS	PCB Arochlor 1254	<1
Indice phénol	mg/Kg de prodbrut	PCB Arochlor 1260	<1
		PCB 28	<0.1
		PCB 52	<0.1
		PCB 101	<0.1
		PCB 138	<0.1
		PCB 153	<0.1
		PCB 180	<0.1
Métaux Lourds et Cyanures		Aromatiques Chlorés	
	<u>en mg/Kg de MS</u>		<u>en µg/Kg de MS</u>
Hg	12,56	dichlorobenzène 1-2	<10
Cd	<5	dichlorobenzène 1-3	113
As	68,1	dichlorobenzène 1-4	207
Cu	66,6	trichlorobenzène 1-2-3	<2
Ni	70,6	trichlorobenzène 1-2-4	81
Cr	134	trichlorobenzène 1-3-5	<2
Zn	2080		
Cyanures totaux	<1		
HAP	<u>en mg/Kg de MS</u>		
Naphtalène	115,09		
Acénaphtène	70,68		
Fluorène	87,21		
Phénanthrène	205,20		
Anthracène	242,28		
Fluoranthène	234,26		
Pyrène	171,79		
BnT	16,65		
BaA	93,09		
Chrysène	125,82		
BeP	60,33		
BbF	68,12		
BkF	44,49		
BaP	68,69		
Dbaha	42,12		
Bghipery	207,50		
Indénopyrène	59,49		
Somme HPA	1912,82		

Analyses du déchet D1

Prélèvement et préparation

Ce déchet est issu d'une entreprise de valorisation des résidus de broyage automobile. Il a été débarrassé des aciers et métaux spéciaux, broyé (3 fois) dans un broyeur à mâchoires et tamisé à 10 mm.

Analyse de l'échantillon

Humidité brute	% de la MS	20,9	Polychlorobiphénylés	
Carbone organique total	% de la MS	45,7		en mg/Kg de produit brut
Hydrocarbures	mg/Kg de prodbrut	25931	PCB Arochlor 1242	29
Indice phénol	mg/Kg de prodbrut	<1	PCB Arochlor 1254	15
			PCB Arochlor 1260	4,1
			PCB 28	3,54
			PCB 52	1,18
			PCB 101	1,26
			PCB 105	0,61
			PCB 118	1,43
			PCB 128	0,24
			PCB 138	1,39
			PCB 153	0,9
			PCB 170	0,28
			PCB 180	0,44
Métaux Lourds				
	en mg/Kg de MS			
Cd	32,1			
As	6,8			
Cu	18200			
Ni	113			
Cr	133			
Pb	2370			
Zn	10200			
Composés organiques volatils			Esters et acides organiques	
	en µg/Kg de MS			en µg/Kg de MS
Benzène	<20		isopropyl éther	<50
Diéthyl 1-2 benzène	<20			
Diéthyl 1-4 benzène	<20			
Ethylbenzène	<74		Cétones et aldéhydes	
Triméthyl 1-2-3 benzène	<20			en µg/Kg de MS
Triméthyl 1-2-4 benzène	<20		acétone	<1000
Toluène	28		méthylisobutyl cétone	<200
Xylènes	<20		méthylisopropyl cétone	<200
Hydrocarbures Polycycliques Aromatiques			Organo-halogénés volatils	
	en mg/Kg de MS			en µg/Kg de MS
Naphtalène	2,52		bromoforme	<1
Phénanthrène	6,68		dibromochlorométhane	<1
Anthracène	1,38		dichlorobromométhane	<1
Pyrène	6,03		1-1 dichloroéthane	<50
Fluoranthène	3,51		1-2 dichloroéthane	<50
Benzo-a-anthracène	1,58		1-1 dichloroéthylène	<5
Benzo-b-fluoranthène	0,97		dichlorométhane	65
Benzo-k-fluoranthène	0,7		chloroforme	4,8
Benzo-a-pyrène	1,08		tétrachlorure de carbone	<1
Benzo-ghi-pérylène	0,87		1,1,1, trichloroéthane	10
Indéno-1,2,3-pyrène	0,93		trichloroéthylène	11
			tétrachloroéthylène	1,6

Analyses du déchet D2

Prélèvement et préparation

Des cendres volantes non additionnées de chaux ont été choisies, afin de ne pas fournir des déchets dont la toxicité pourrait être principalement due à l'effet pH. Ces cendres volantes se caractérisent essentiellement par leur richesse en métaux lourds volatils et semi-volatils (plomb, zinc, cadmium, mercure, arsenic, ...), ainsi que par leur forte fraction soluble, due pour une bonne part à la présence de chlorures et de sulfates. Elles ont été prélevées dans une usine d'incinération d'ordures ménagères de forte capacité disposant d'un dispositif récent de traitement des fumées par voie humide.

Analyse de l'échantillon

Les résultats d'analyse de cinq échantillons sont présentés.

Echantillons	Plomb (g/kg)	Zinc (g/kg)	Cadmium (g/kg)	Mercure (g/kg)	Arsenic (g/kg)	Chlorures (g/kg)	Sulfates (g/kg)
1	1,77	6,62	1,21	16,7	1,0	56,66	10,67
2	1,55	7,3	1,2	11,9	0,9	58,62	16,69
3	1,72	7,37	1,22	5,23	0,9	58,05	16,16
4	1,73	6,57	1,2	10,5	0,87	60,94	15,54
5	1,81	6,64	1,23	13,6	<0,2	58,37	14,06

Analyse de la spéciation des métaux (Manceau, 1996)

Les atomes de zinc sont associés à des formes oxydées. Sa spéciation est pratiquement indépendante de la taille granulométrique des cendres volantes. Par contre, le plomb est majoritairement associé à des composés chlorés.

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Madame VASSEUR Paule, Professeur, Université de METZ,

Monsieur BITTON Gabriel, Professeur, Université de Floride Gainesville (U.S.A.).

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur BISPO Antonio

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une
thèse intitulée :

**"Contribution à l'élaboration d'une méthodologie pour évaluer les dangers
et les risques liés aux matériaux solides contaminés."**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : **"SCIENCES AGRONOMIQUES"**

Fait à Vandoeuvre le, **25 Septembre 1998**

Le Président de l'I.N.P.L.,


J. HARDY



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

Résumé

La recherche était destinée, dans un premier temps, à comprendre les conditions de mobilisation des polluants associés à des matériaux solides, tels que les terres ou les déchets, puis, dans un second temps, à élaborer une démarche et à proposer des méthodes pour caractériser les dangers et les risques, à court et à long terme, liés à la présence de composés toxiques, organiques et/ou métalliques. Dans ce but, des échantillons de terre contaminés au laboratoire ou prélevés directement sur des sites industriels ainsi que des déchets ont été constitués. Une batterie de tests biologiques (*Vibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* et *Vibrio fischeri* M169) a été appliquée sur des extraits obtenus par lixiviation statique en faisant varier le solvant (eau, méthanol, tampons phosphate et borate) et les conditions de l'extraction (rapport massique solide/liquide, durée de lixiviation, et filtration) ainsi que par percolation dynamique en colonne. Afin de prévoir l'évolution de la toxicité et de la génotoxicité, des essais de dégradation ont également été réalisés. Les résultats montrent que le rendement d'extraction et l'intensité de la réponse toxique dépendent des conditions de la lixiviation. En général, la toxicité des échantillons contaminés au laboratoire est plus forte que celle d'échantillons prélevés sur des sites industriels, traduisant l'influence des conditions et de la durée de vieillissement sur l'état et la mobilité des polluants dans les terres et les déchets. La percolation en colonne a permis de mettre en évidence une migration différentielle des polluants en fonction de leur solubilité dans l'eau, de plus, elle évalue la durée sur laquelle s'effectue leur relargage. La toxicité et la génotoxicité mesurées après 30 semaines de percolation démontrent l'existence d'une réserve polluante toxique qui est aussi révélée par les lixiviations statiques montrant une différence de toxicité entre les extraits aqueux et au méthanol. Enfin la toxicité et la génotoxicité des échantillons sont diminuées ou amplifiées par la dégradation, en fonction des conditions imposées. En conclusion, la caractérisation du danger toxique et génotoxique à court et à long termes devrait reposer sur l'utilisation d'une gamme de lixiviations statiques à l'eau et à d'autres solvants comme le méthanol, couplée à une batterie de tests biologiques complémentaires. Elle pourrait ensuite être complétée par des essais de percolation et/ou d'incubation, afin d'acquérir des informations sur l'évolution de la toxicité.