

# CONTRIBUTION À L'ÉVALUATION DE L'IMPACT SUR LES ÉCOSYSTÈMES AQUATIQUES DE LA VALORISATION EN BTP DE MÂCHEFERS D'INCINÉRATION D'ORDURES MÉNAGÈRES (MIOM)

Lucile Barthelet \*, Claude Durrieu \*, Sonia Kaïbouchi \*\*, Yves Perrodin\*

\* Ecole nationale des travaux publics de l'Etat ; Laboratoire des sciences de l'environnement

\*\* Insa de Lyon ; Laboratoire d'analyse environnementale des procédés et des systèmes industriels

Dans le cadre d'un programme de recherche portant sur la faisabilité de la valorisation de résidus de procédés thermiques en BTP, nous avons étudié l'impact sur les milieux aquatiques de l'utilisation de MIOM en sous-couches routières. Pour cela, nous avons choisi de travailler sur des algues unicellulaires, maillon de base des chaînes trophiques. Nous avons testé des lixiviats de mâchefers issus de collecte traditionnelle et issus de collecte sélective, chacun des deux étant étudié « frais » ou après carbonatation artificielle. Lorsque les mâchefers sont testés frais, qu'ils proviennent d'une collecte traditionnelle ou sélective, nous avons constaté une inhibition de la croissance algale et de l'activité enzymatique phosphatase alcaline (APA) de *Chlorella vulgaris*. La perturbation de cette activité enzymatique peut être corrélée à la présence de métaux lourds dans les lixiviats. Lorsque les mâchefers sont testés après carbonatation artificielle, on observe un abattement significatif de leur toxicité potentielle vis à vis des algues. D'autre part le développement du bio-essai basé sur la mesure de l'APA va permettre de mettre au point un biocapteur à cellules entières à fibre optique pour la surveillance en continu et *in situ* du relargage éventuel de polluants par ce type de matériaux. Nous pourrions ainsi suivre la cinétique de relargage de polluants métalliques au cours du temps lors du phénomène de maturation.

Our project takes place in a sustainable development programme on the utilization of Thermic Process Residues in civil engineering concrete. The aim of this project is to assess the effect on the aquatic environment of the use of MSWI bottom ash in road base material scenario. To assess the risk for the ecosystems submitted to MSWI bottom ash leachates, we have chosen to work with unicellular algae. Microalgae play an important role in the equilibrium of aquatic ecosystem, being the first level of the trophic chain to

produce organic matter and oxygen. Our bioassays are specific to a metabolic way. They allow the detection of early disturbance in organisms, which can generate more important disturbances. We test the enzymatic alkaline phosphatase activity (APA) of *Chlorella vulgaris*. In the same way, we achieved some normalized algal growth tests which concern the global metabolism of algae. We have tested MSWI bottom ash leachates from standard collection and from selective collection. The results showed an alkaline phosphatase decrease and an algal growth inhibition. APA displayed the presence of heavy metals in leachates. Some experiments conducted in the laboratory showed that APA of *Chlorella vulgaris* is disturbed by the presence of heavy metals. These tests showed that APA decrease is more important in case of standard collection than in case of selective collection. This project will contribute to define Thermic Process Residues enhancement conditions. Development of significant bioassays will contribute to develop whole-cell biosensors, which can allow the continuous bio-monitoring of MSWI bottom ash leachates. They will allow identification and orientation of physico-chemical and ecotoxicologic analysis, to realise urgency.

## INTRODUCTION

En vue d'une réduction de l'extraction, de la consommation de matières premières et de la quantité de mâchefers à stocker, les politiques actuelles de développement durable encouragent le recyclage et la valorisation des mâchefers d'incinération des ordures ménagères (MIOMs). Or, dans le cas de valorisation en BTP, il devient aujourd'hui nécessaire de mieux évaluer l'impact environnemental de ces matériaux en « situation ». Les MIOMs sont les résidus solides de la combustion des ordures ménagères collectées restant en sortie basse du four. Ils sont composés essentiellement de matériaux minéraux (métaux ferreux et non

ferreux, débris de verres et céramiques,...) et de matières organiques imbrûlées (3 à 7 % selon les installations) [3] [6]. Les polluants qu'ils contiennent, en particulier les métaux, peuvent être relargués par lixiviation lorsqu'ils sont soumis aux eaux de pluies [7]. Afin d'abaisser ce potentiel de transfert des polluants vers le milieu naturel, ces matériaux peuvent subir une période de maturation. Celle-ci correspond à une série de réactions physico-chimiques (comme le lessivage des chlorures, la carbonatation, le lessivage tardif des sulfates et nitrates, oxydation...) échelonnées dans le temps et sensées améliorer la qualité environnementale des mâchefers [1]. Afin de tester la toxicité potentielle de mâchefers variés (avant et après maturation, issus ou non de collecte sélective), nous avons choisi d'effectuer des tests d'écotoxicité sur leurs lixiviats. Nous avons choisi les algues unicellulaires comme bio-indicateurs de toxicité car elles jouent un rôle important dans l'équilibre et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques. Les algues constituent le maillon de base des chaînes alimentaires en servant de nourriture aux populations des niveaux supérieurs. L'impact d'un toxique sur ces micro-organismes peut se répercuter sur les maillons supérieurs. Des études antérieures menées au laboratoire ont montré que l'activité phosphatase alcaline (APA) de *Chlorella vulgaris* est sensible à la présence de métaux lourds [2]. Nous utilisons donc dans cette étude la mesure de l'APA de *Chlorella vulgaris* comme bio-marqueur de contamination métallique. Parallèlement à cette mesure, le test de croissance normalisé nous donne une indication sur la réponse globale des algues à la présence de lixiviats de MIOMs dans leur milieu.

## MATÉRIEL ET MÉTHODE

### Obtention des lixiviats de MIOMs

Deux types de mâchefers sont utilisés, le premier est un mâchefer issu d'une collecte traditionnelle (A), le second est issu d'une collecte sélective (B). Ces mâchefers sont utilisés frais, à leur sortie du four, et après avoir subi une carbonatation artificielle (phénomène majeur de la maturation). Dans ce cas le mâchefer est saturé en CO<sub>2</sub>.

Les échantillons de MIOM sont mis en présence d'eau distillée dans des flacons, avec un rapport massique liq/sol de 10. Ils sont mis à agiter pendant 24 heures, puis ils sont filtrés à 0,45 µm.

### Culture des algues

La souche *Chlorella vulgaris* CCAP 21112 est entretenue par un repiquage régulier tous les dix jours dans un milieu de culture autoclavé en erlenmeyers bouchés par du coton cardé, à raison de 1 ml de culture mère pour 50 ml de milieu Lefèvre-Czarda (Afnor T90-304). Les erlens sont placés sur un agitateur rotatif afin d'éviter la décanation des cellules algales. Les cultures sont maintenues dans une chambre thermostatée à une température de 21°C et soumises à un cycle nyctéméral de 16 h d'éclair-

ement à 5 000 lux et de 8 h d'obscurité.

### Préconditionnement des cultures algales pour la mesure de l'activité phosphatase alcaline

Après ensemencement en milieu Lefèvre-Czarda (Afnor T90-304), les ballons de culture sont mis en aération en chambre de culture jusqu'à ce que les algues atteignent leur phase exponentielle de croissance (environ quatre jours après le repiquage). La culture est alors transférée en milieu Afnor T90-304 sans phosphate, par centrifugation (4 000 tr/min pendant 10 minutes) puis remise en suspension. Pour obtenir une activité maximale, on laisse alors les algues 21 jours dans ce milieu en chambre de culture et sous aération. A l'issue de cette étape, la culture peut être conservée à 4°C, à l'obscurité, pendant un mois, sans dégradation notable de son APA.

### Mesure de l'activité phosphatase alcaline

Elle est réalisée au moyen d'un substrat fluorescent méthylumbelliféryl-phosphate (MUP) hydrolysé par les phosphatases en méthylumbelliférone (MUF), qui fluoresce à 460 nm pour une excitation à 355 nm. La lecture de la fluorescence se fait avec un fluorimètre (BMG) à microplaques. Nous avons effectué des tests pour différents temps de contact entre les algues et les lixiviats.

Pour des temps de contact de 30 minutes et 4 heures, les algues sont déposées dans des plaques de cultures cellulaires (Costar) 48 puits. Après adhésion des cellules au fond des puits, le milieu de culture est retiré et remplacé par des solutions de lixiviats à différentes concentrations (100 %, 40 %, 5 %). Au moment de la mesure les solutions de lixiviats sont retirées (ce qui évite les interférences avec la solution tampon), et les algues sont mises en présence de tampon TRIS (0,1 M, pH 8,5), d'ions MgCl<sub>2</sub> (0,1 M), de MUP (6,5 µM) et d'eau distillée (qsp 500 µl). La fluorescence est mesurée pour chaque puit. Toutes les mesures sont réalisées en triplicats.

### Test de croissance normalisé NF T 90-375

Les algues *Pseudokirchneriella subcapitata* sont cultivées dans un milieu nutritif. On place 104 cellules par millilitre de ces algues dans un milieu contenant différentes concentrations de lixiviats (0 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ; 20 ; 40 et 70 % de lixiviats) ainsi que du concentré nutritif, le volume final étant complété avec de l'eau distillée. Les tests sont menés en microplaques sur 3 jours. En fin d'essai, les cellules sont comptées au microscope avec une cellule de Thoma, de manière à déterminer les concentrations cellulaires obtenues. On détermine l'inhibition de croissance par rapport à un puit témoin (0 % de lixiviat).

## RÉSULTATS

Cette étude a été réalisée avec des lixiviats de mâchefers issus de collecte traditionnelle et sélective, ayant subi ou non une carbonatation artificielle.

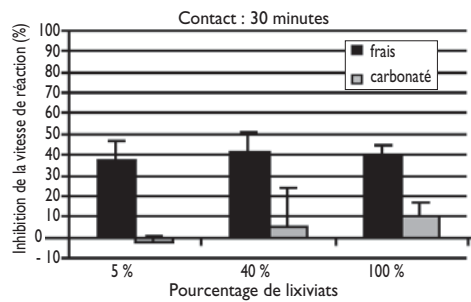
Nous comparons ici les résultats obtenus. Au cours des bioessais menés, nous avons cherché à déterminer la CE50, c'est-à-dire la concentration efficace en lixiviats inhibant 50 % de l'activité phosphatase alcaline ou 50 % de la croissance algale. Les résultats des tests enzymatiques sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la vitesse maximale de réaction de l'APA en fonction du pourcentage de lixiviats présent dans le milieu.

### Lixiviats de mâchefers issus de collecte traditionnelle

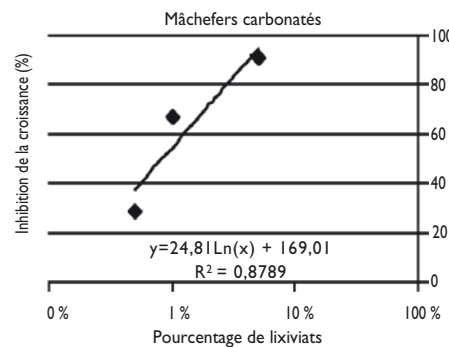
Lorsque les algues sont mises en contact avec les solutions contenant les lixiviats durant 30 minutes, nous constatons une différence entre les mâchefers frais et ceux ayant subi une carbonatation artificielle. L'APA est inhibée jusqu'à 40 % dans le cas des lixiviats de mâchefers frais, alors que les lixiviats de mâchefers carbonatés artificiellement n'ont pas d'effet sur l'APA. Les résultats montrent ici qu'il n'y a pas mise en évidence d'une relation dose-effet (fig 1).

Pour un temps de contact de 4 heures, l'APA est inhibée jusqu'à 35 % pour des lixiviats de mâchefers frais, les lixiviats de mâchefers carbonatés artificiellement n'ont pas toujours d'effet sur l'APA (résultats non présentés).

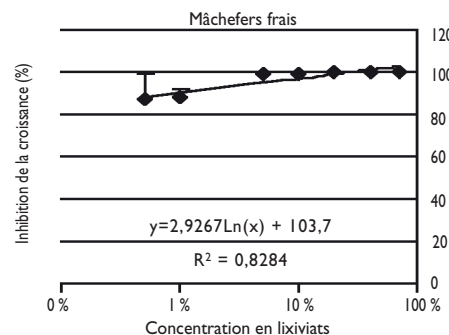
Le test de croissance montre une toxicité importante des lixiviats sur la croissance des algues. Dans le cas de lixiviats de mâchefers frais, la CE50 n'a pas pu être déterminée car la concentration minimale en lixiviats testée (0,5 %) inhibe



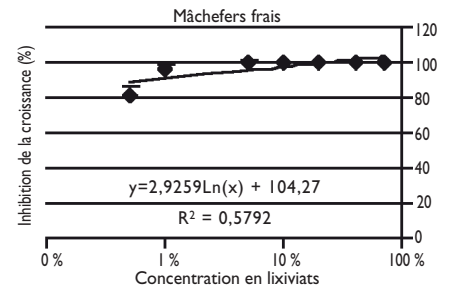
**Figure 1 : Effet des lixiviats de mâchefers issus de collecte traditionnelle, frais et carbonatés artificiellement, sur l'APA pour un temps de contact de 30 mn.**



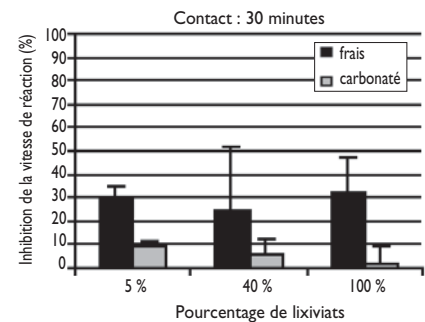
**Figure 3 : Inhibition de la croissance algale par différentes concentrations de lixiviats de mâchefers carbonatés artificiellement.**



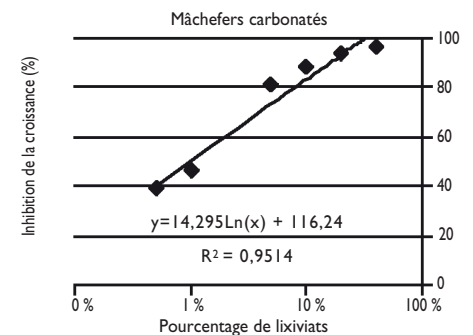
**Figure 5 : Inhibition de la croissance algale par différentes concentrations de lixiviats de mâchefers frais.**



**Figure 2 : Inhibition de la croissance algale par différentes concentrations de lixiviats de mâchefers frais.**



**Figure 4 : Effet des lixiviats de mâchefers issus de collecte sélective, frais et carbonatés artificiellement, sur l'APA pour un temps de contact de 30 minutes.**



**Figure 6 : Inhibition de la croissance algale par différentes concentrations de lixiviats de mâchefers carbonatés artificiellement.**

la croissance des algues de 80 % (fig 2). Lorsque il y a carbonatation artificielle des mâchefers, le potentiel toxique de ceux-ci diminue légèrement et la CE50 est de 0,83 % de lixiviats nécessaires pour inhiber 50 % de la croissance algale (fig 3).

### Lixiviats de mâchefers issus de collecte sélective

Pour un temps de contact de 30 minutes, les lixiviats de mâchefers frais inhibent jusqu'à 32 % de la vitesse de

**Tableau I : Comparaison entre les effets de lixiviats de mâchefers issus de collecte traditionnelle et sélective en sortie de four ou ayant subi une carbonatation artificielle**

	Lixiviats de mâchefers frais	Lixiviats de mâchefers carbonatés artificiellement
Collecte traditionnelle	pH : 11,1 APA : contact 30 mn : 40 % d'inhibition avec le lixiviat pur contact 4 heures : 35 % d'inhibition avec le lixiviat pur test croissance : CE50 < 0,5%	pH : 9,8 APA : contact 30 mn : pas d'effet avec le lixiviat pur contact 4 heures : pas d'effet avec le lixiviat pur test croissance : CE50 = 0,83 %
Collecte sélective	pH : 11,2 APA : contact 30 mn : 32 % d'inhibition avec le lixiviat pur contact 4 heures : CE50 = 84 % test croissance : CE50 < 0,5 %	pH : 9,2 APA : contact 30 mn : pas d'effet avec le lixiviat pur contact 4 heures : pas d'effet avec le lixiviat pur test croissance : CE50 = 0,88 %

réaction de l'APA. Lorsqu'il y a carbonatation artificielle, il n'y a pas d'inhibition significative de la vitesse de réaction de l'APA (fig 4). Comme pour les lixiviats de mâchefers issus de collecte traditionnelle, les résultats ne montrent pas de relation dose-effet.

Lorsque les algues sont mises en contact avec les différentes concentrations de lixiviats durant un temps de contact de 4 heures, la CE50 est de 84 % dans le cas de lixiviats de mâchefers frais. Lorsque les mâchefers ont subi une carbonatation artificielle, leur lixiviat n'ont pas d'action inhibitrice sur l'APA (résultats non présentés).

Le test de croissance mené sur des lixiviats de mâchefers frais n'a pas permis de déterminer une CE50, car la concentration la plus faible testée (0,5 % de lixiviats dans le milieu) inhibe de plus de 80 % la croissance algale (fig 5). Lorsqu'il y a carbonatation artificielle, la CE50 est de 0,88 % (fig 6).

## DISCUSSION

Le tableau I nous donne un état des lieux récapitulatif des résultats obtenus au cours des expérimentations ainsi que l'évolution des pH lorsqu'il y a carbonatation artificielle. Pour les échantillons testés, les résultats montrent que la carbonatation artificielle permet d'abaisser significativement le potentiel toxique des mâchefers vis à vis des algues. Pour un temps de contact de 4 heures, les résultats montrent une légère différence entre les lixiviats de mâchefers issus de collecte traditionnelle et ceux issus de collecte sélective, ces derniers semblant plus toxiques. Cependant, les tests de croissance ne montrent pas de différences significatives entre les toxicités potentielles des lixiviats des mêmes mâchefers. Pour les lixiviats de mâchefers issus de collecte traditionnelle, il n'y a pas de différence significative d'inhibition de l'APA entre un temps de contact de 30 minutes et un temps de contact de 4 heures. On constate que les lixiviats de mâchefers ont une action inhibitrice rapide sur l'APA. Le manque de relation dose-effet peut trouver plusieurs explications, en effet, les taux d'inhibition atteints semblent être le maximum. Cela peut être dû à des phénomènes de complexation, empêchant la toxicité de s'exprimer à 100 %. La relation dose-effet pourrait aussi se faire pour des concentrations inférieures à 5 % ou des temps de contacts inférieurs à 30 minutes.

En ce qui concerne les outils biologiques utilisés, le test de croissance algale s'est révélé beaucoup plus sensible, cette constatation est en accord avec Ferrari et al. [5]. La mesure de l'APA, si elle est moins sensible, n'en est pas moins importante (probablement en raison de sa sensibilité aux métaux lourds) et surtout très rapide : détection d'une inhibition en 30 minutes au lieu de 3 jours pour le test de croissance.

Nous utilisons actuellement au LSE cette propriété pour développer des biocapteurs à cellules entières à fibres optiques, destinés au monitoring en continu de ce type d'effluent sur le terrain ou au laboratoire (suivi de planches routières pilotes par exemple) [4].

**Lucile Barthet\***, **Claude Durrieu\***, **Sonia Kaïbouchi\*\***, **Yves Perrodin\***

\* Ecole nationale des travaux publics de l'Etat ; Laboratoire des sciences de l'environnement - rue Maurice Audin, 69518 Vaulx-en-Velin

\*\* Insa de Lyon ; Laboratoire d'analyse environnementale des procédés et des systèmes industriels 20, avenue Albert Einstein, 69621 Villeurbanne cedex

## Remerciements :

Ces travaux s'inscrivent dans le cadre d'un programme de recherche financé par la Région Rhône-Alpes, et coordonné par le Laepsi de l'Insa de Lyon. Tous les partenaires du programme sont ici sincèrement remerciés.

## Bibliographie

- [1] Amokrane A., Blanchard J.-M., Billard H., Chatelet-Snidara L., Delineau T., Bourdier C. Le devenir des mâchefers d'incinération d'ordures ménagères. – Partie 2 : traitement des mâchefers. Effet de la maturation, du tamisage, du déferrailage et du lavage à l'eau. Déchets, sciences et techniques, 1998. n° 11. pp 31-38.
- [2] Badreddine, I. Mise au point d'un test de toxicité basé sur la mesure de l'activité de la phosphatase alcaline de microphytes. Thèse biologie et biochimie appliquée : Université de Savoie et ENTPE, 1996. 195 p.
- [3] Blanchard J.M., Comel, C., Navarro, A., Revin, Ph., Veron, J., Pillay, G. Les mâchefers d'incinération d'ordures ménagères. I. principales propriétés. Techniques Sciences et Méthodes, 1989. Vol. 3. pp 127-140.
- [4] Durrieu, C., Tran Minh C. Optical Algal Biosensor using Alkaline Phosphatase for Determination of Heavy Metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2002. Vol. 51. pp 206-209
- [5] Ferrari, B., Radetski, C.M., Veber, A.-M., Ferard, J.-F. Ecotoxicological assessment of solid wastes : a combined liquid- and solid-phase testing approach using a battery of bioassays and biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1999. Vol. 18, n° 6, pp 1195-1202.
- [6] Wicker, K., Blanchard, J.M., Veron, J. Caractérisation physico-chimique des mâchefers d'incinération de déchets par percolixiviation. *Techniques Sciences et Méthodes*, 1995. Vol. 4. pp 369-374.
- [7] Wiles, C.C. Municipal solid waste combustion ash : state-of-the knowledge. *Journal of Hazardous Materials*, 1996, vol. 47, pp. 325-344.