



**HAL**  
open science

# Techniques de localisation et de mesure de la biodisponibilité dans les sols et les organismes

Laurence Denaix

► **To cite this version:**

Laurence Denaix. Techniques de localisation et de mesure de la biodisponibilité dans les sols et les organismes. Master. Ecotoxicologie et Chimie de l'Environnement, Talence (33), France. 2023. hal-04660862

**HAL Id: hal-04660862**

**<https://hal.inrae.fr/hal-04660862v1>**

Submitted on 24 Jul 2024

**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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

# Techniques d'études des métaux dans les sols et les organismes

Laurence DENAIX

UMR ISPA – INRAE

[laurence.denaix@inrae.fr](mailto:laurence.denaix@inrae.fr)

# Techniques d'études des métaux dans les sols et les organismes

- Quels sont les contaminants ?
- Quels sont les niveaux de contamination ? (quantification)
- Où sont localisés les métaux (localisation)?
- Quelles sont leurs formes chimiques (spéciation) ?
- Sont-ils disponibles pour les organismes vivants ? (biodisponibilité)

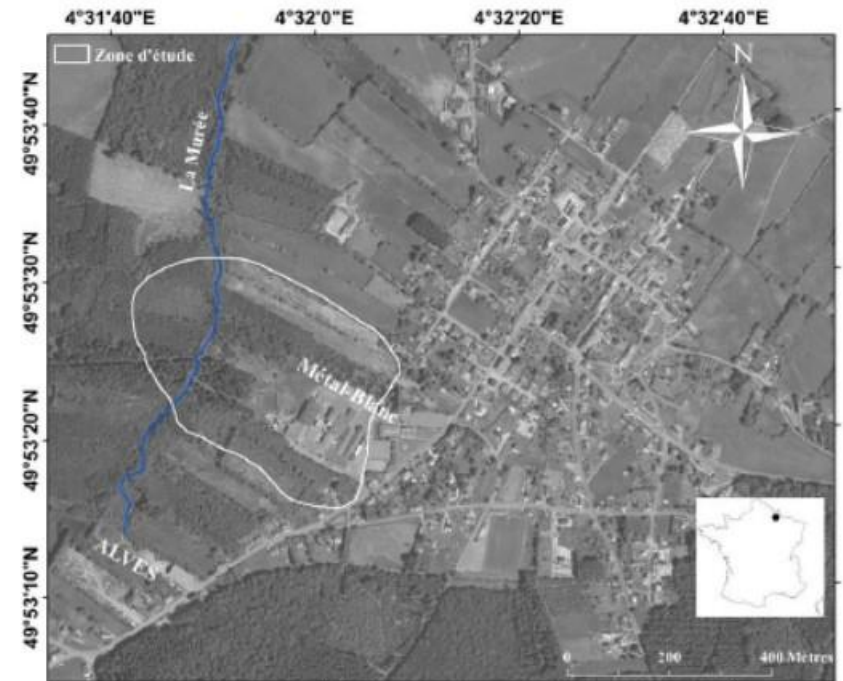
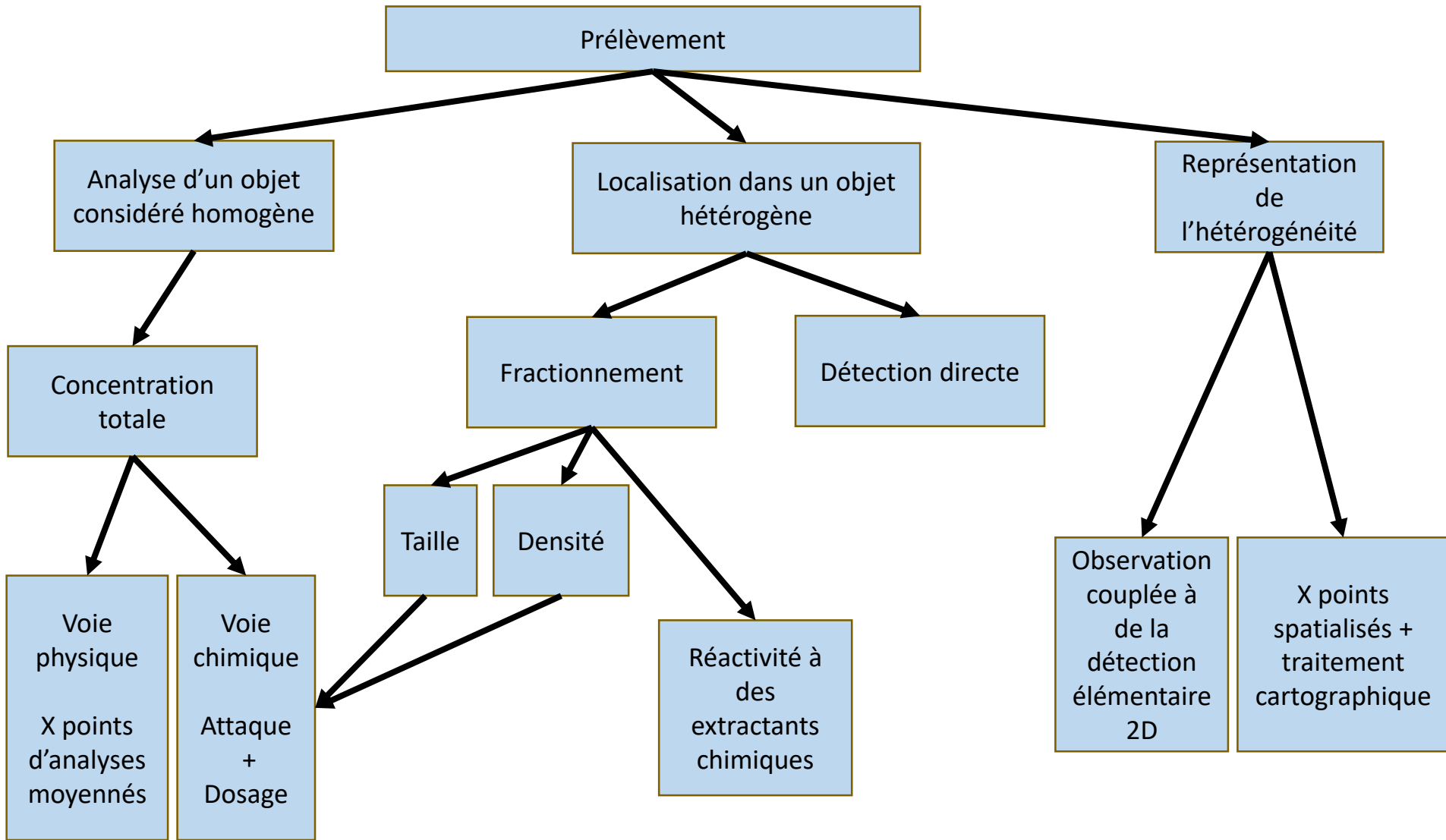
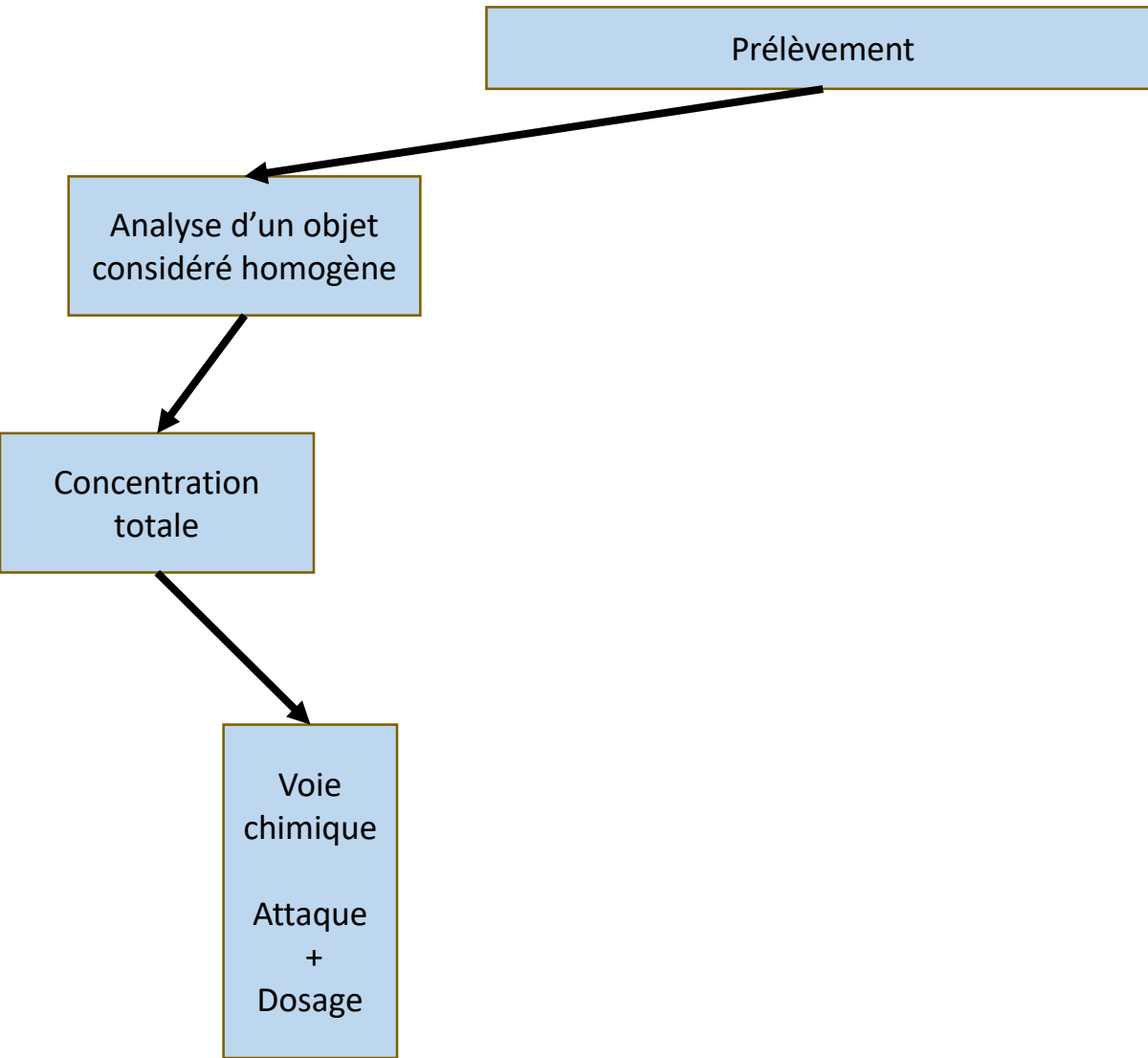


Figure II-3 : Localisation de la zone d'étude de 17 ha.

# Démarche générale



# Démarche générale



# Prélever un échantillon

- Pour quoi ?
- Pour qui ?
- Analyser l'environnement
- Récolter des informations sur l'historique d'usage, sur les pratiques actuelles, sur les sources de contamination, sur la nature du sol = un échantillonnage est toujours associé à une enquête

***En absence de connaissance des « liens de terrain » d'un échantillon, un prélèvement de sol n'est qu'un tas de boue (Daniels, 1988)***

Norme AFNOR NF ISO 10381-5 relative à l'échantillonnage des sols pollués

# LE PRELEVEMENT

Définir une stratégie d'échantillonnage



Evaluation globale

Echantillon considéré  
comme homogène

A partir d'un objet  
hétérogène



Echantillon composite  
homogénéisé



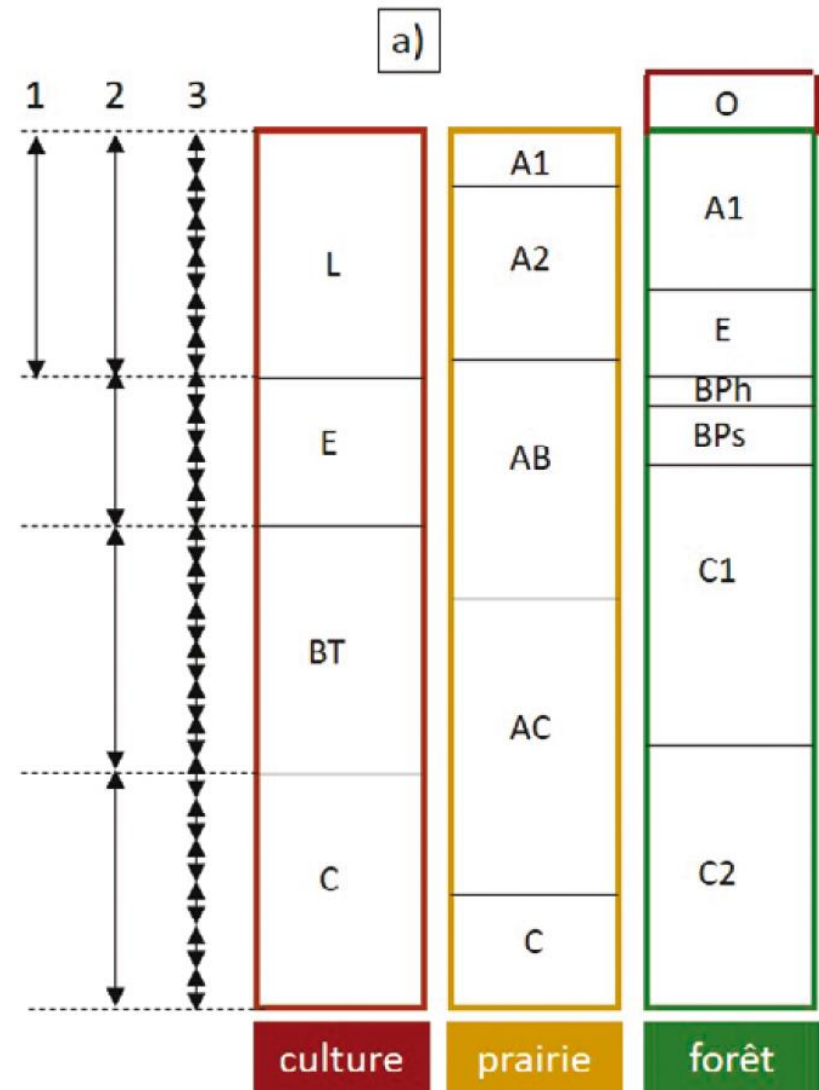
Caractérisation de  
l'hétérogénéité



Plusieurs échantillons  
spatialisés

# Particularité des sols

- Organisation en horizons pédologiques, de profondeur variable
- Possibilité de redistribution entre ces horizons
- Quelle profondeur choisir ?
- Combien d'horizons prélever ?





# LE PRELEVEMENT

1ha de terre sur 20 cm

≈

3000 t

1ha de maïs

≥

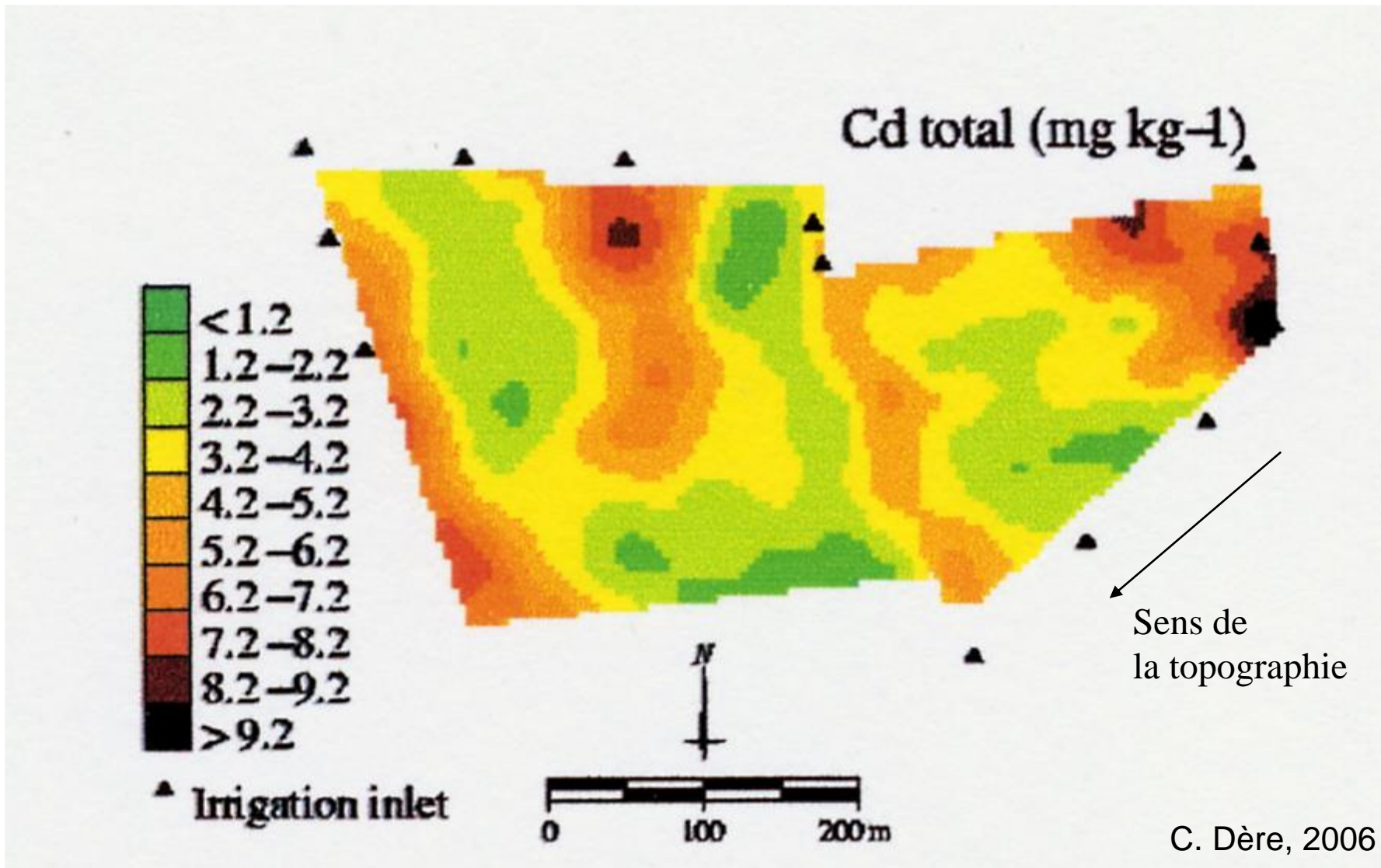
8 t matière végétale

**Echantillon analysé in fine ≈ 1g**



- 1 – Etudier l'homogénéité de la parcelle
- 2 – Définir une stratégie d'échantillonnage

# Exemple du site de Pierrelaye : Cadmium dans la parcelle



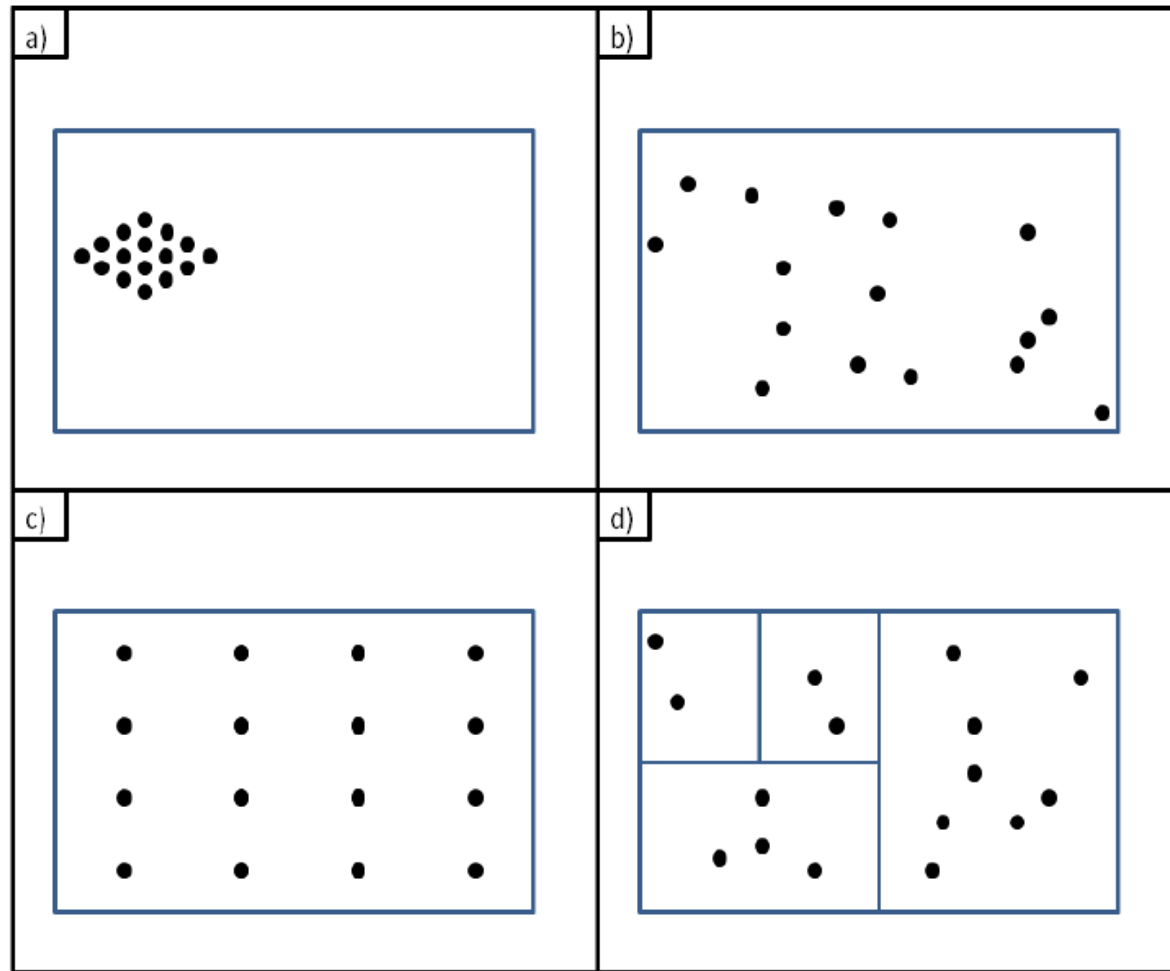
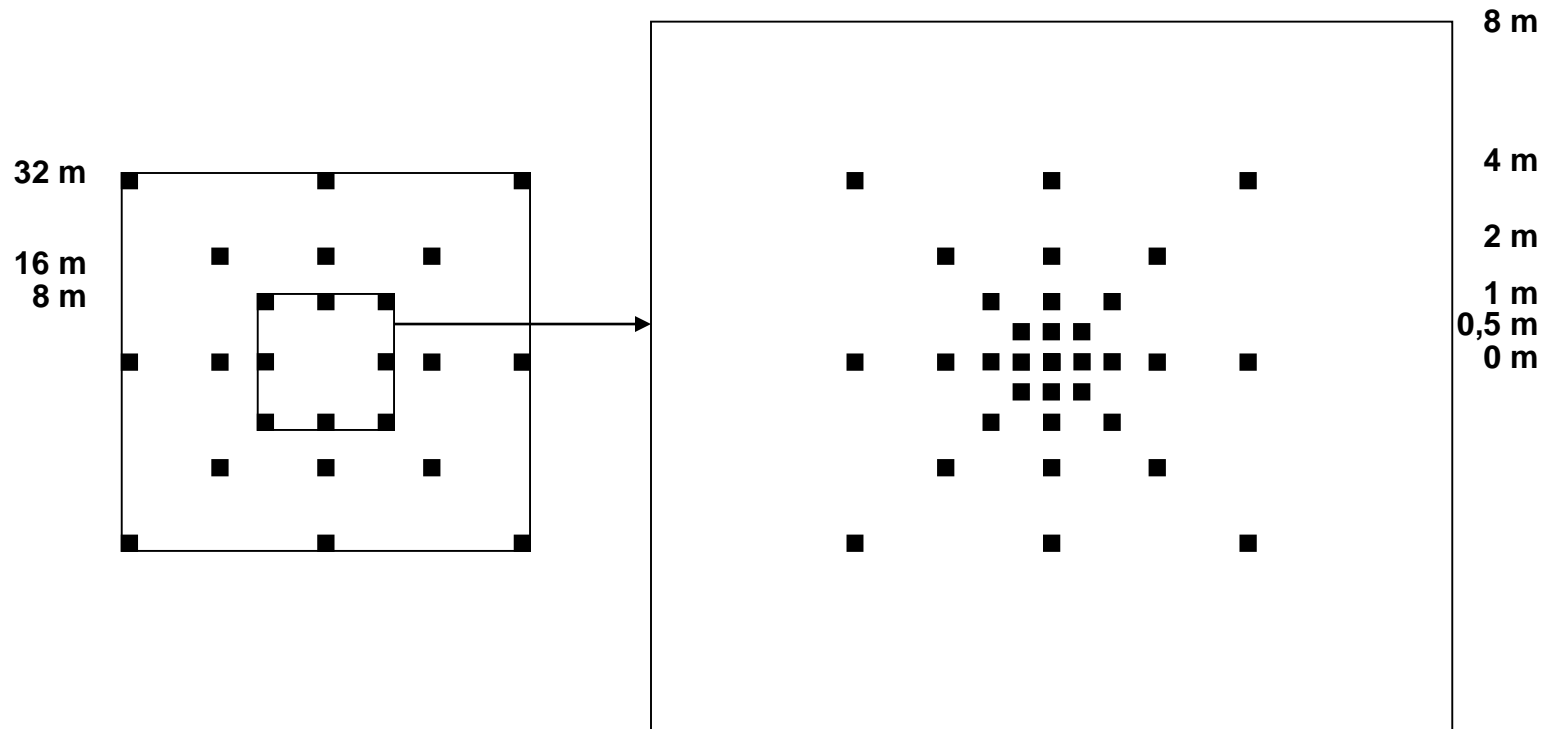


Figure 1.12 : Les différents plans d'échantillonnage : a) Ciblé ; b) aléatoire simple ;  
c) Systématique ; d) aléatoire stratifié

# Stratégies de prélèvement de sol



*Bourrié et Gascuel-Odoux 1987*

# LE PRELEVEMENT

## Comment ?

Outils de prélèvement :

- Adaptés
- Non contaminants
- Limitant les pertes



Prélèvement de sol à la tarière



Couteau à revêtement de téflon



Ciseaux en  
céramique

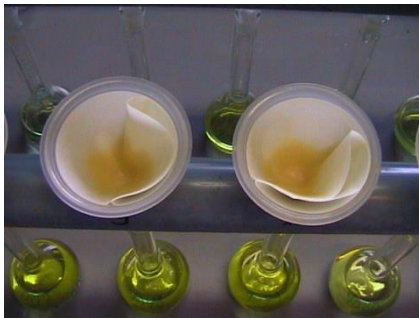
# LE PRELEVEMENT

## Conditionnement

Dans un récipient :

- Adaptés à la matrice (liquide, solide)
- Propre
- Inerte chimiquement
- Assure la protection de l'échantillon contre :
  - La lumière
  - Les poussières
  - Les contaminants biologiques
  - L'air (oxygène)
  - La chaleur
  - L'humidité
  - .....

# Déroulement d'une analyse



Blancs,  
Echantillons de contrôle

Végétal / sol à analyser

Séchage / Congélation

Broyage

Homogénéisation

Prise d'essai (100mg - 1g)

Extraction / Minéralisation

Mise en solution

Analyse instrumentale

Contrôle qualité

Calculs

Résultats



# Influence de la méthode sur le résultat

La concentration totale d'un élément dans un échantillon est indépendante de la méthode employée pour la mesurer. Toutes les méthodes ayant prouvé leur justesse donnent le même résultat.

**Mais** les méthodes de minéralisation peuvent attaquer plus ou moins les constituants.

Pour les sols

=> HNO<sub>3</sub> (norme suisse OSOL)

=> HNO<sub>3</sub> + HCl (eau régale NF ISO 11466 ; 1995)

=> HF + HClO<sub>4</sub> (NF X 31-147 ; 1996) : Attaque totale

Pour les végétaux

=> HNO<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (+HF)

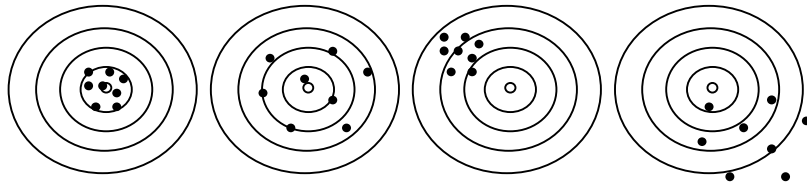
Méthodes :

- Minéralisation à sec
- Minéralisation par voie humide
  - Micro-ondes,
  - Bain marie



# La qualité des analyses

- Justesse, Reproductibilité, Sensibilité



- Blancs d'analyse
- Echantillons de référence



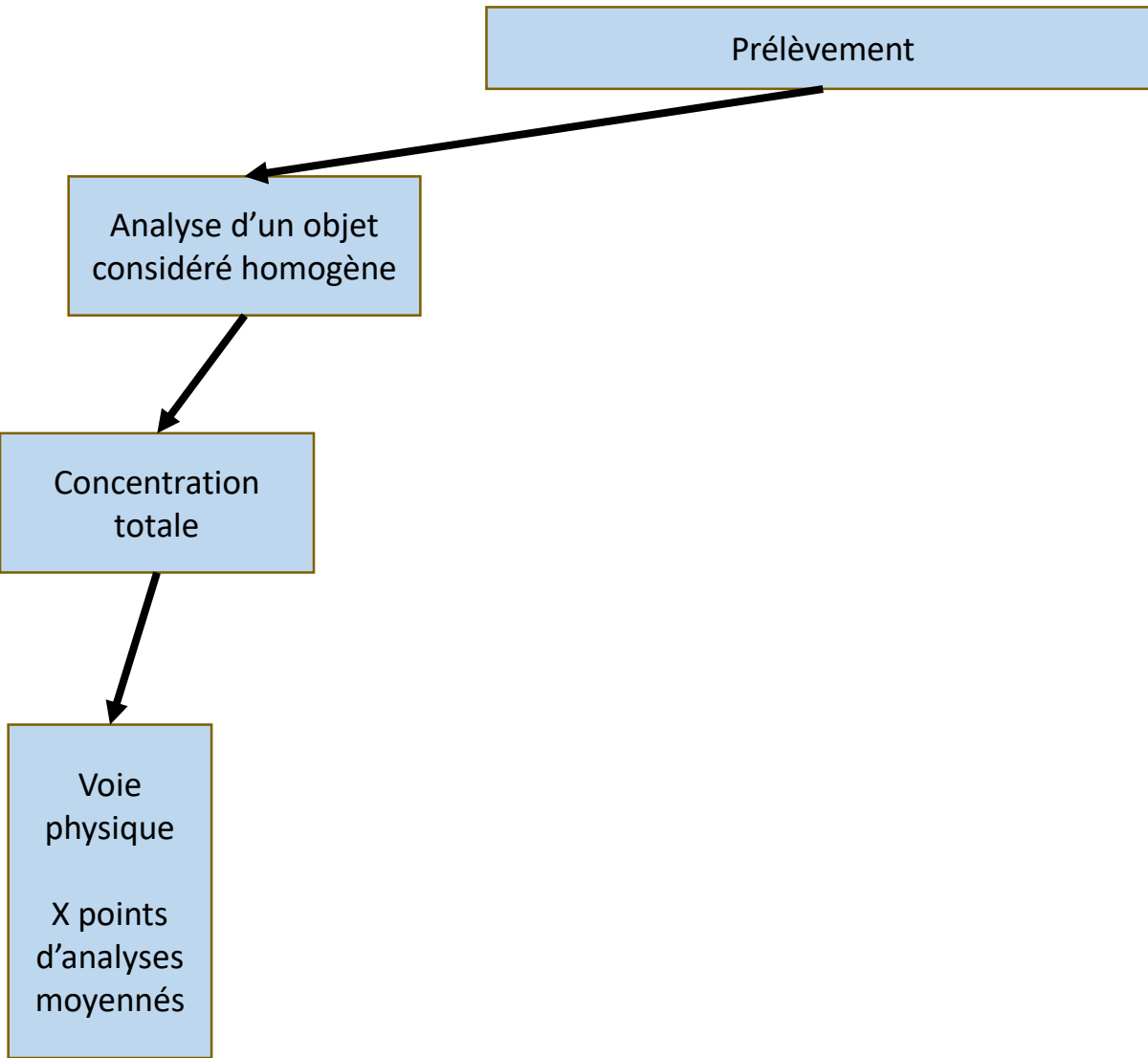
*Si analyses faites par un laboratoire externe :*

Toujours obtenir :

- les méthodes utilisées,
- les modes opératoires,
- les valeurs des blancs et des échantillons de référence
- Les limites de quantifications

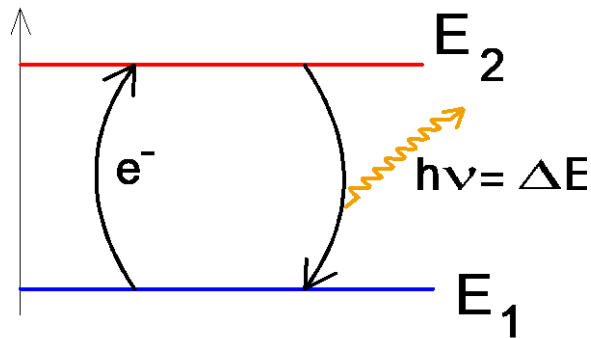


# Démarche générale

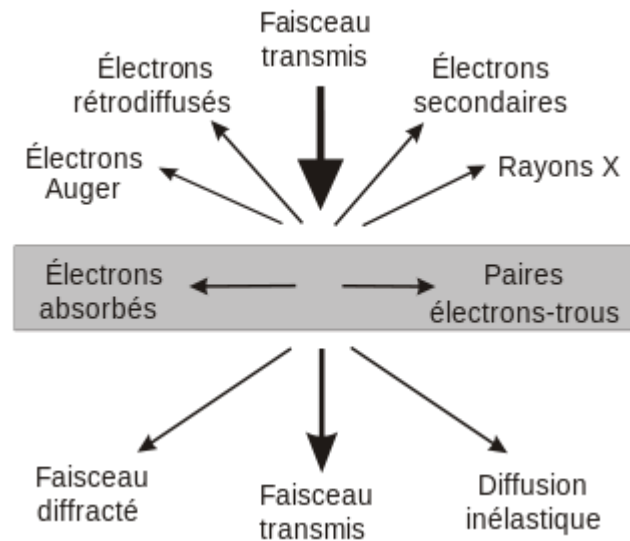


# Méthodes physiques de détection

Basées sur l'interaction Rayonnement-Matière



$E = h.c / \lambda$   
Energie des photons  
caractéristiques des éléments



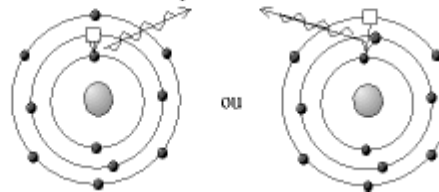
fluorescence UV-visible

photon lumineux



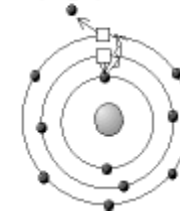
fluorescence X

photon X

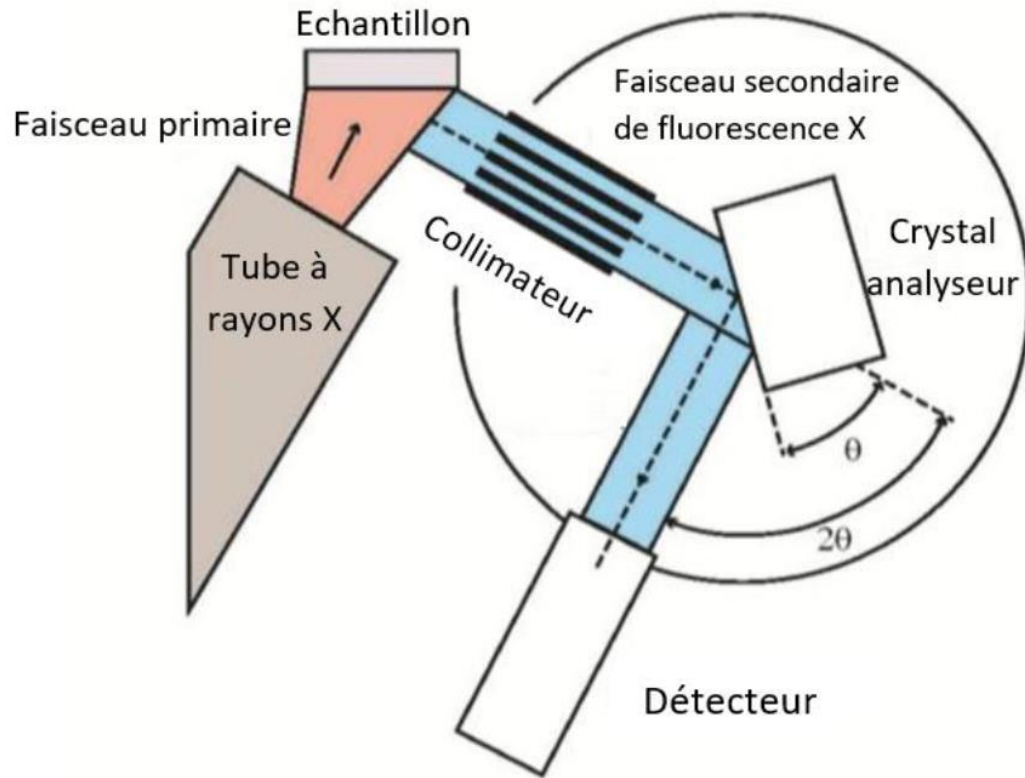


émission Auger

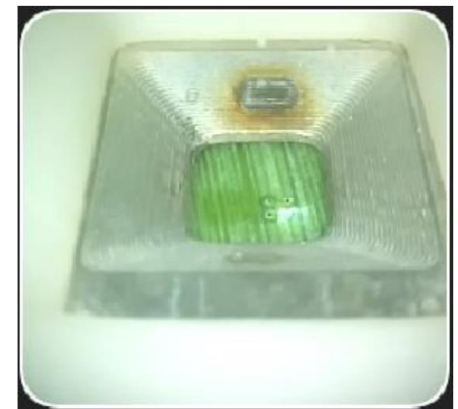
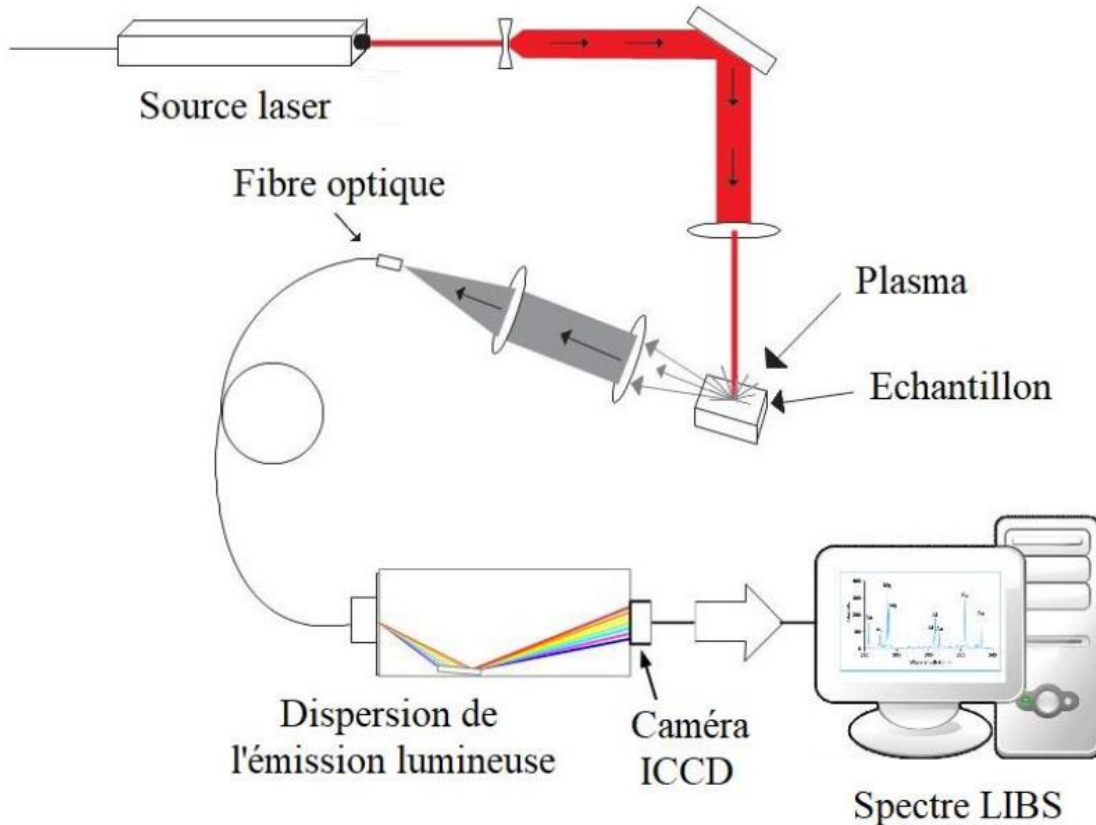
électron éjecté (Auger)



# Nouvelles techniques de détection : la XRF (Fluorescence de Rayons X)



# Nouvelles techniques de détection : le LIBS (Spectroscopie d'émission à partir d'un plasma induit par laser )



# LIBS (Spectroscopie d'émission à partir d'un plasma induit par laser )

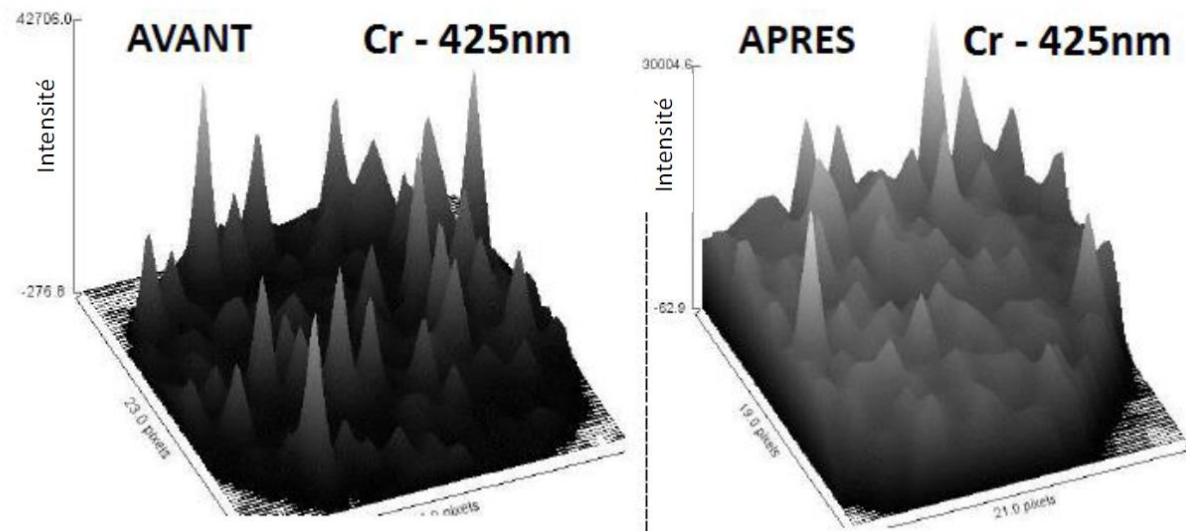
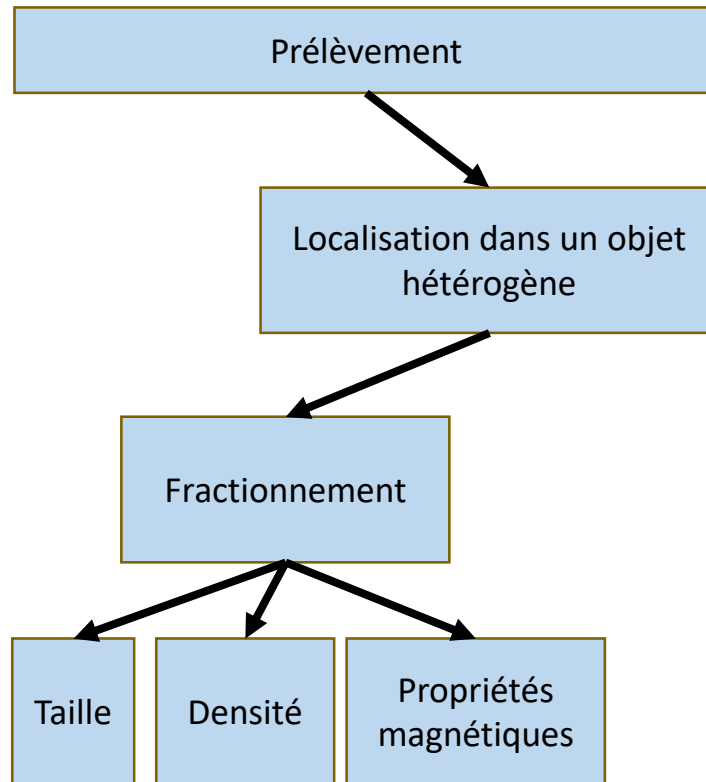


Figure 7: Représentation de la variabilité de l'intensité associée à la raie du Cr à 425nm pour un échantillon de sol avant et après broyage fin.

# Démarche générale



# Fractionnement granulométrique

**Principe :**  
**les fractions les plus fines sont les plus réactives**



> 2mm  
 2 mm -200 µm  
 200µm -50 µm  
 50µm-20µm  
 20µm – 2 µm  
 2µm – 0,2 µm  
 >0,2 µm

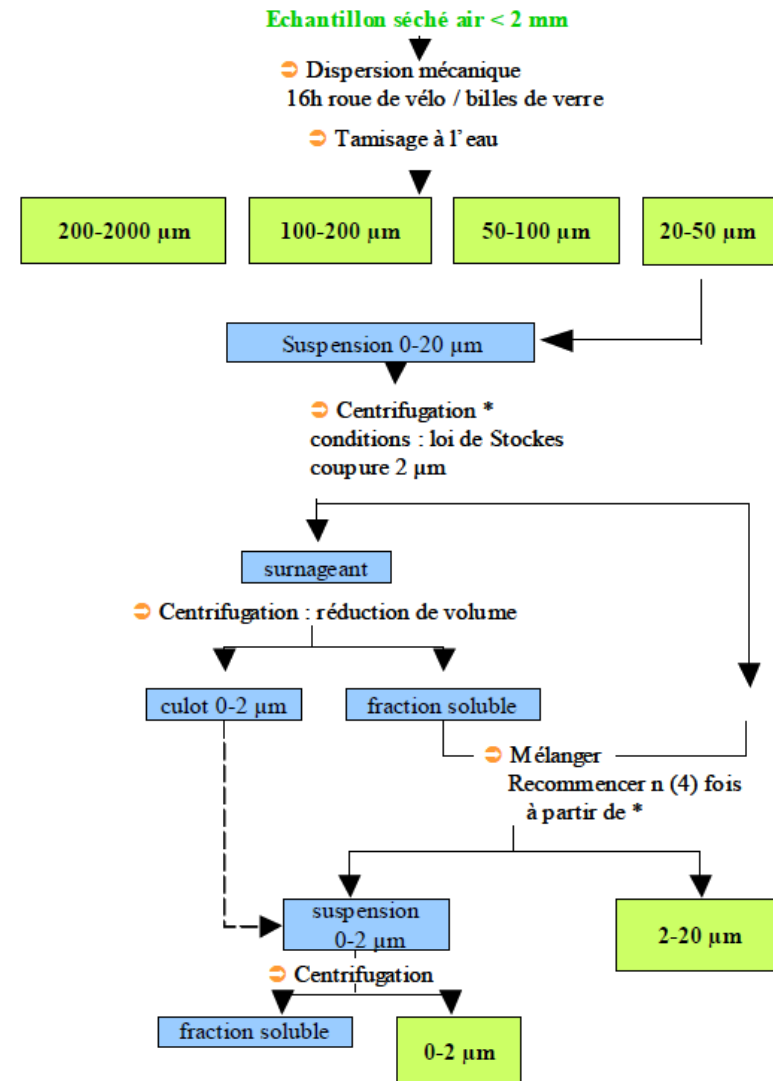
## Loi de Stockes

$$\text{Vitesse de sédimentation} = [2 \cdot r^2 \cdot g \cdot (d_{\text{particule}} - d_{\text{liquide}})] / (9 \cdot \eta)$$

Avec r : rayon de la particule

d: densité

η : viscosité du liquide

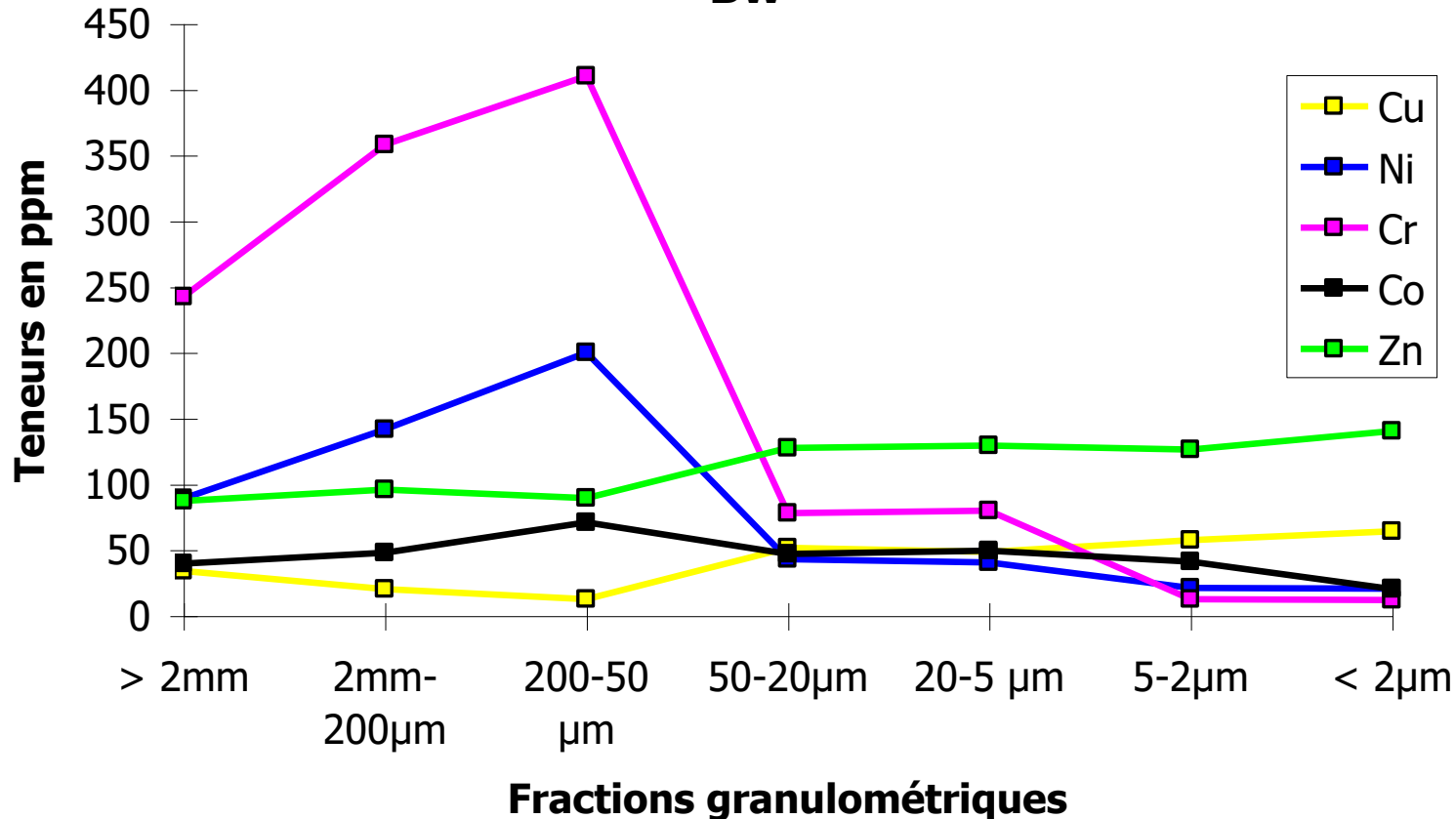




# Répartition dans les fractions granulométriques du sol

**Répartition des éléments traces Cu, Ni, Cr, Co et Zn suivant les fractions granulométriques de l'horizon Bw**

**Bw**



# Fractionnement densimétrique

Roche : densité = 2,5 t/m<sup>3</sup>

Matière organique : densité = > 1 t/m<sup>3</sup>

Principe : Jouer sur la densité du liquide dans lequel les particules sont mises en suspension

les fractions organiques sont les plus réactives

Attention à utiliser des solutions qui ne désorbent pas les métaux

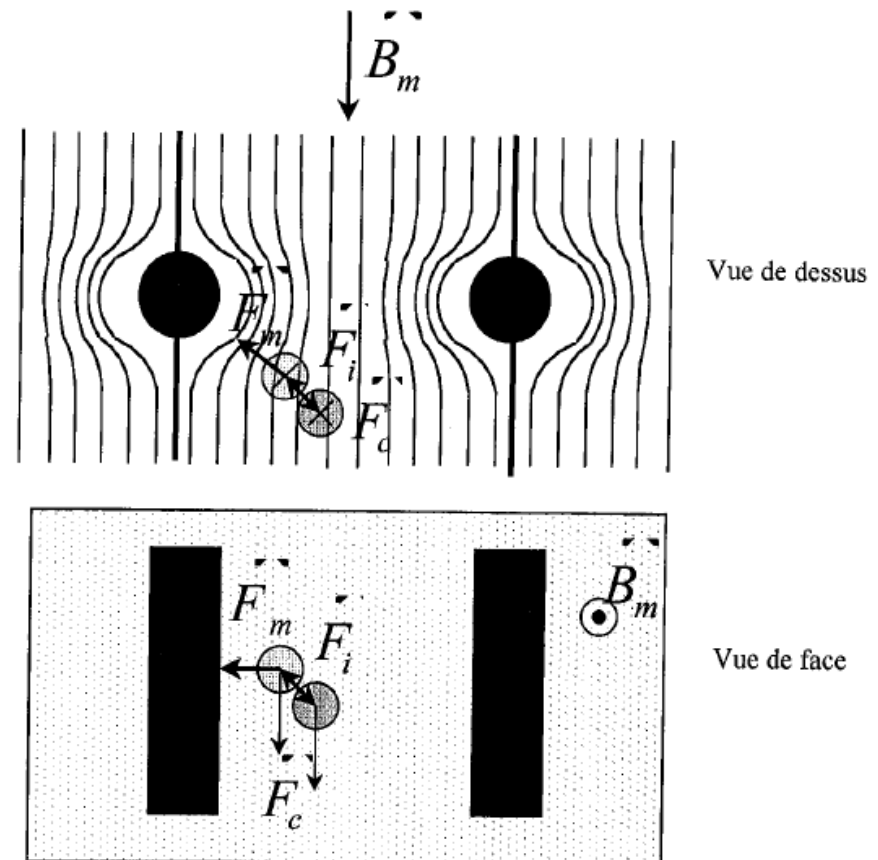
- Fractionnement à l'eau (NF X31-516 Septembre 2007 Qualité du sol - Fractionnement granulo-densimétrique des matières organiques particulaires du sol dans l'eau)
- Fractionnement dans des solutions de densités variables

# Fractionnement magnétique

Principe : les oxydes et hydroxydes de fer ont une forte affinité vis-à-vis des métaux

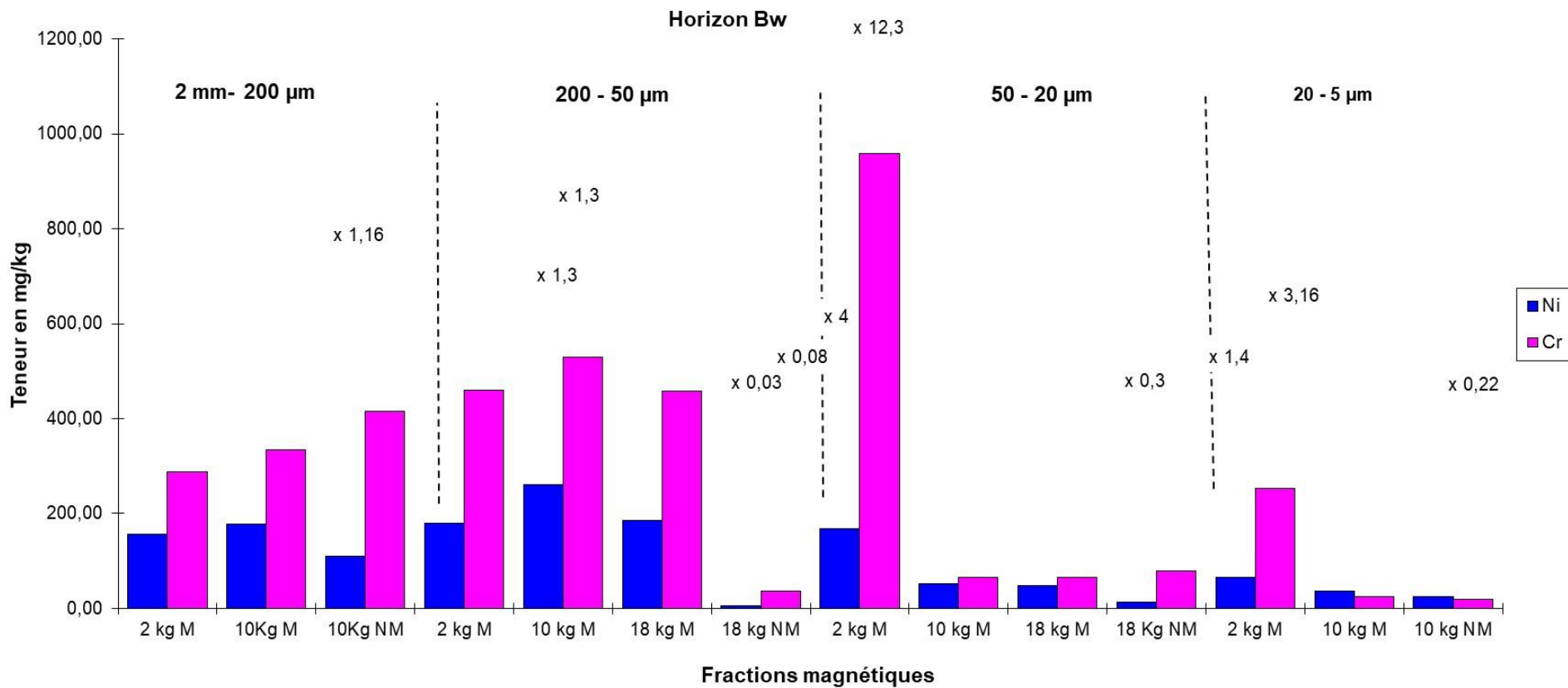
Fractionnement en solution

Fig. I-4 : Forces appliquées à des particules placées dans un gradient de champ magnétique



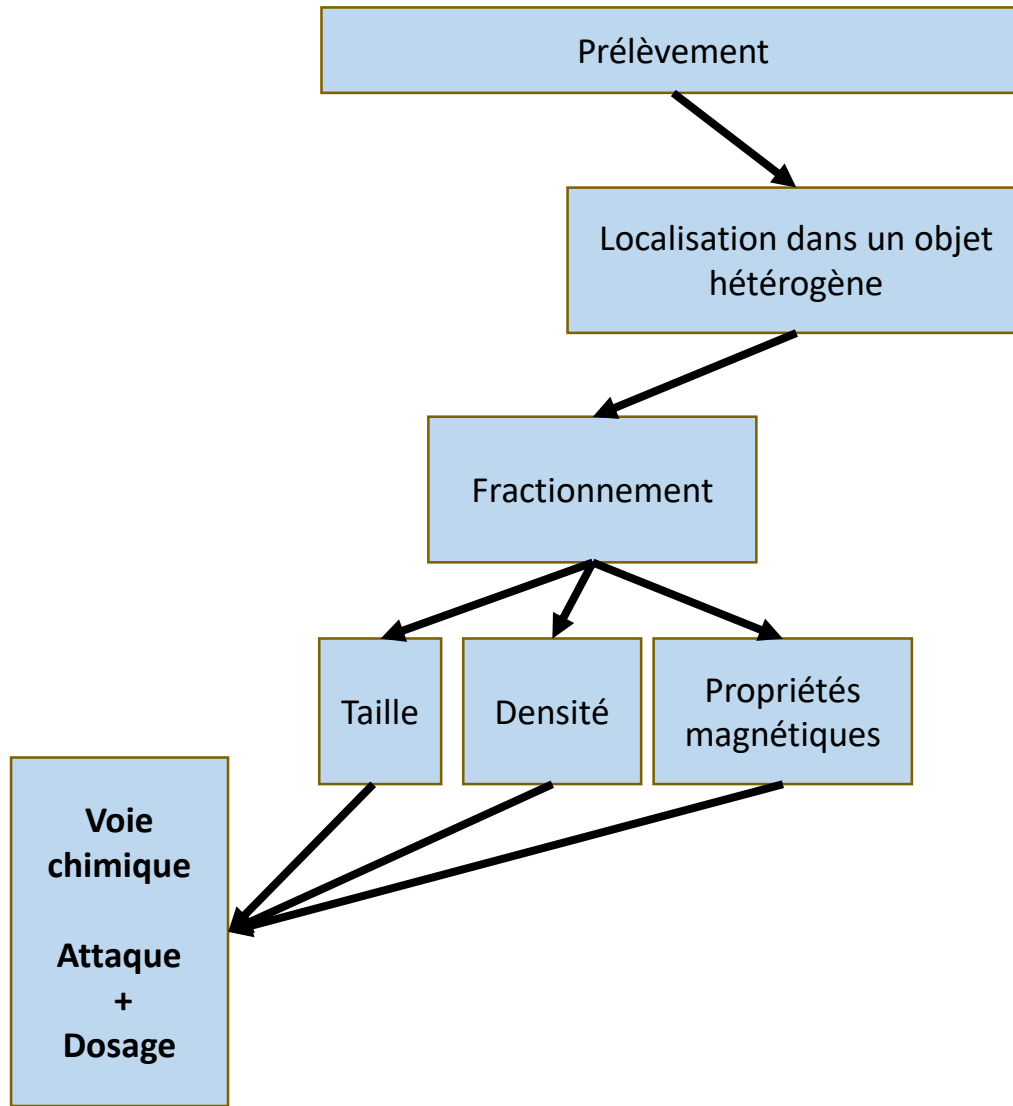
# Résultat d'un fractionnement granulomagnétique

Répartition du Ni et du Cr dans différentes fractions magnétiques après fractionnement granulométrique

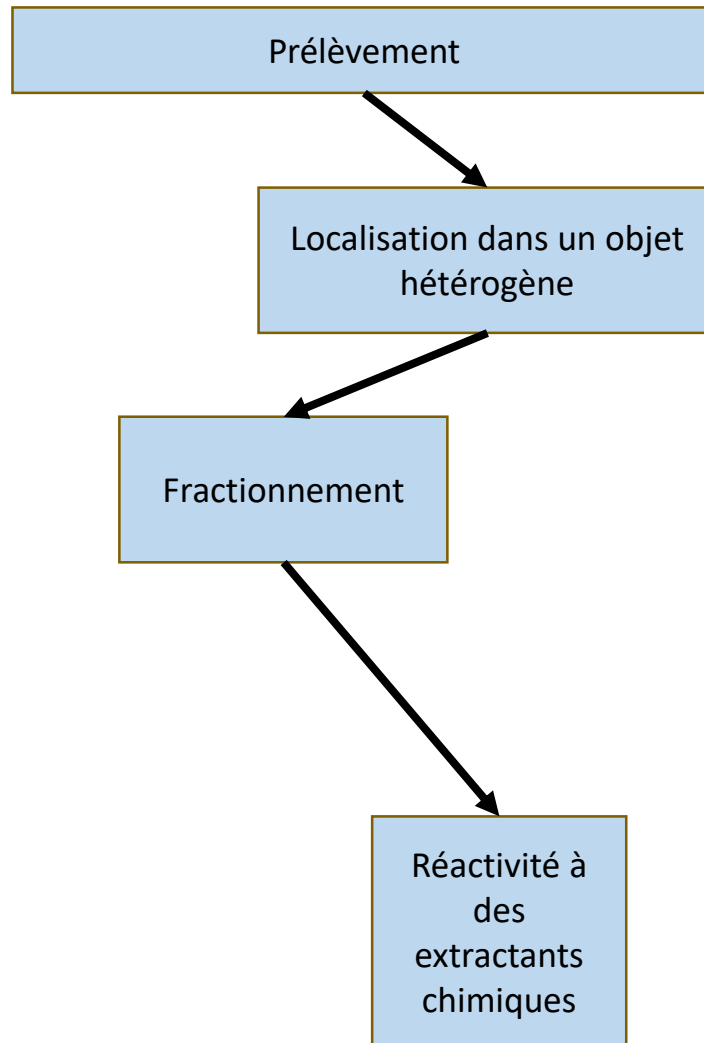


Le Cr est concentré dans les fractions grossières et les fractions magnétiques fines

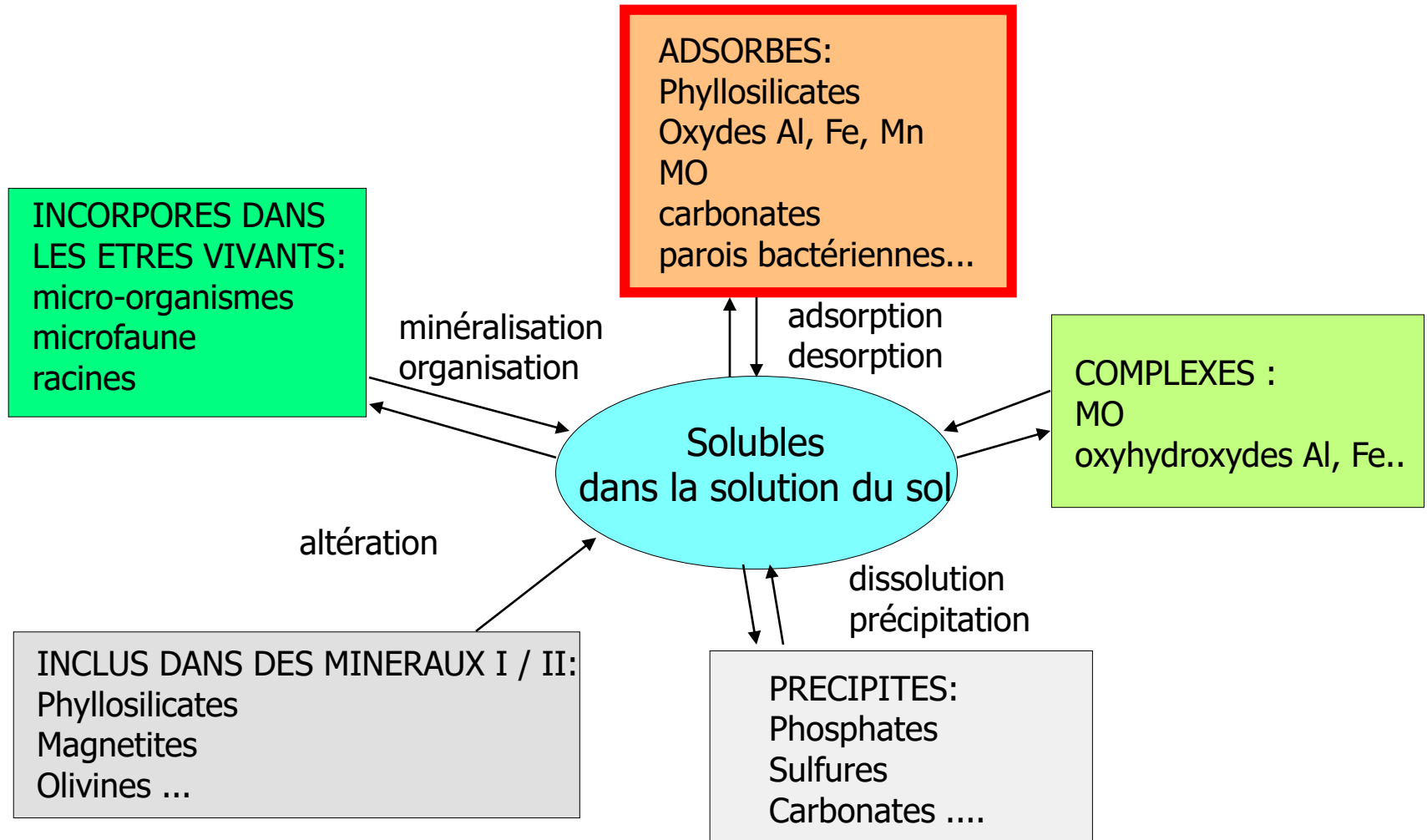
# Démarche générale



# Démarche générale

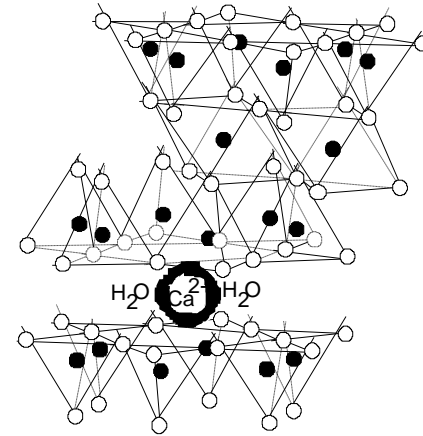


# Localisation des ETM dans un sol

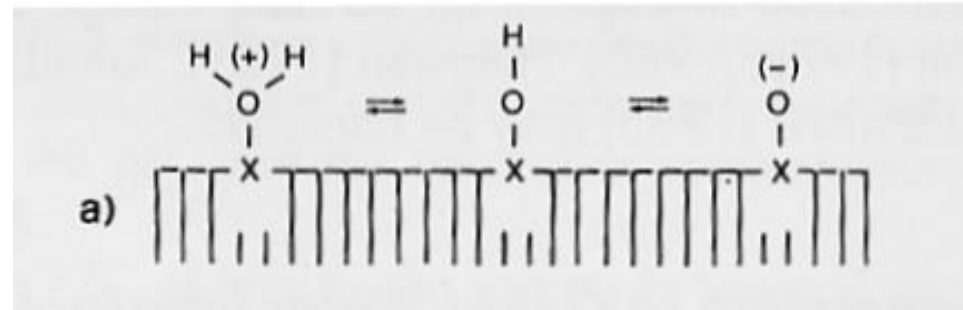


# Les constituants des sols possèdent des charges négatives compensées par des cations

Des charges permanentes sur les phyllosilicates résultant de la substitution de certains atomes (ex : Si (4 charges+) par Al(3 charges+))

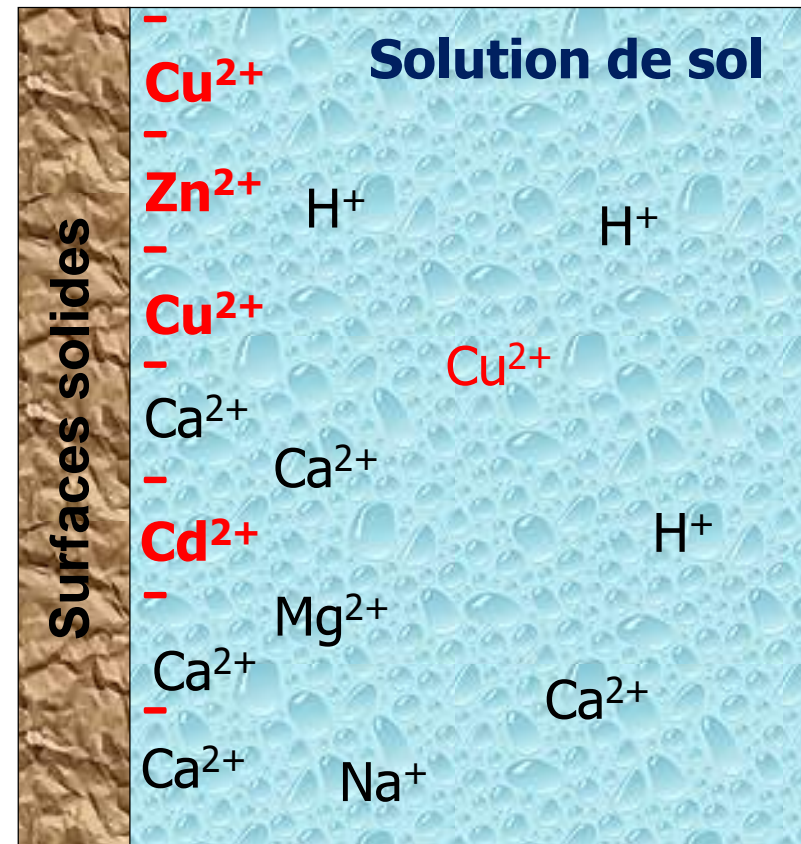
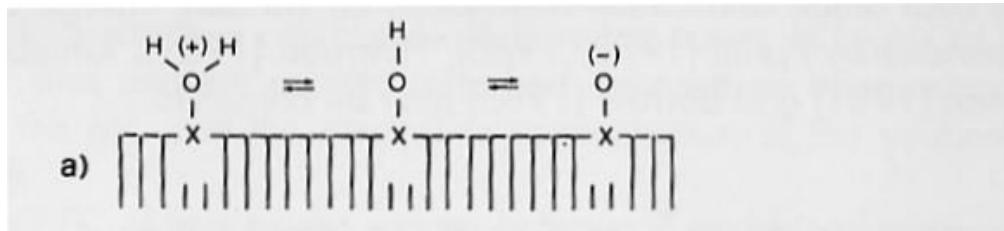


Des charges variables sur tous les OH de bordure (MO, phyllosilicates, oxydes...)



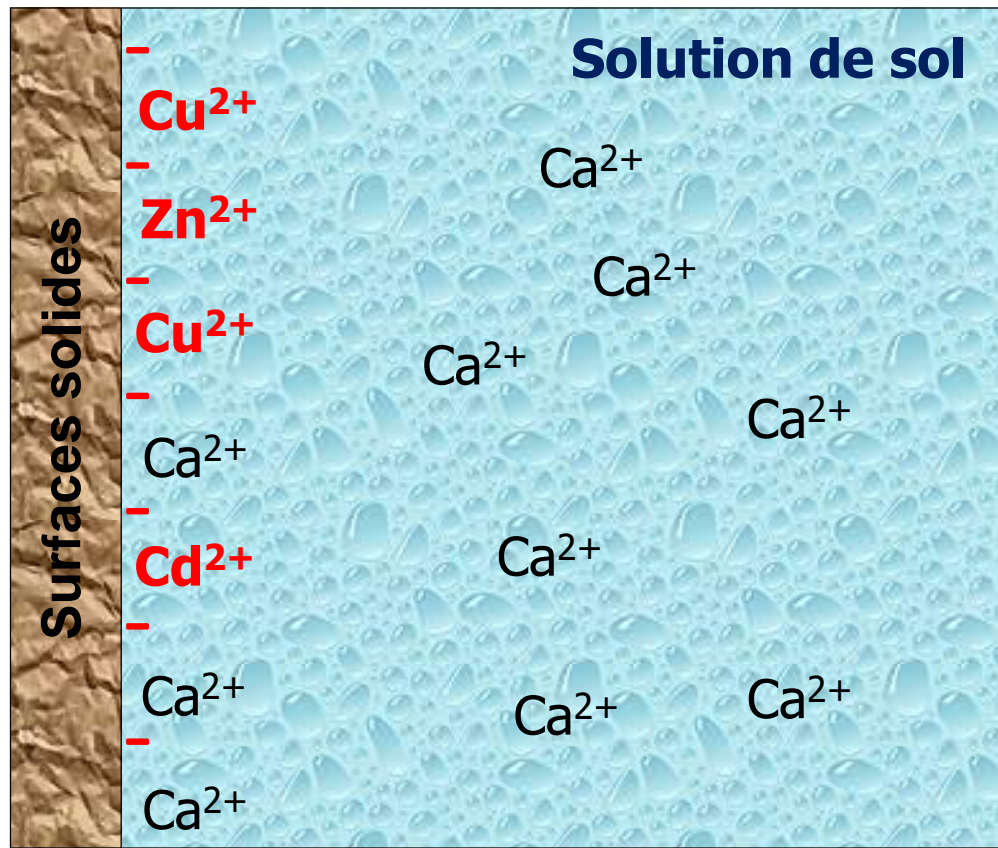


# Cas de la liaison ionique

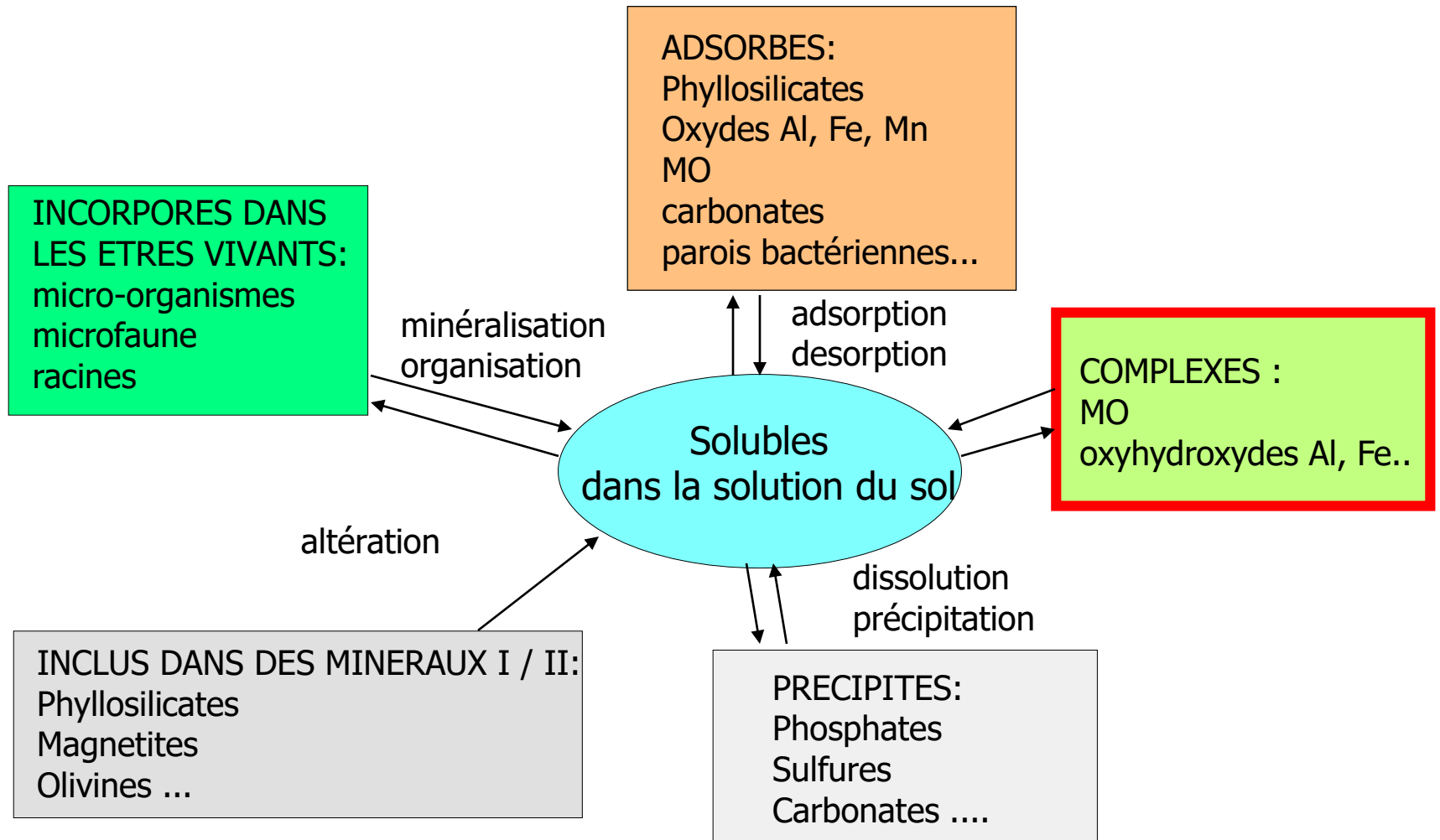


# Comment quantifier les cations sorbés par échange ionique ?

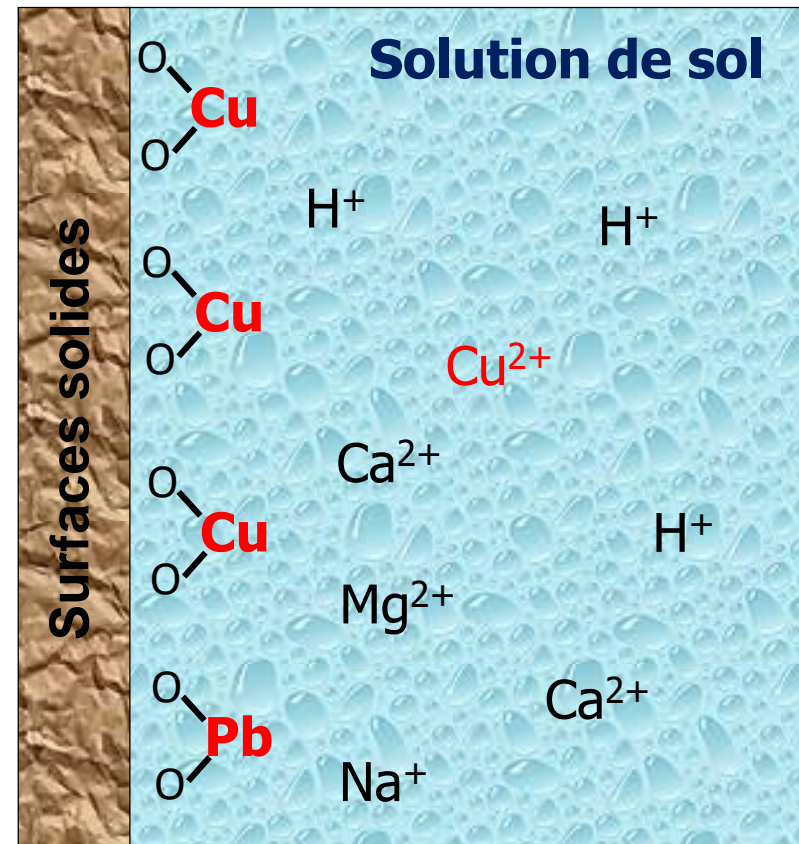
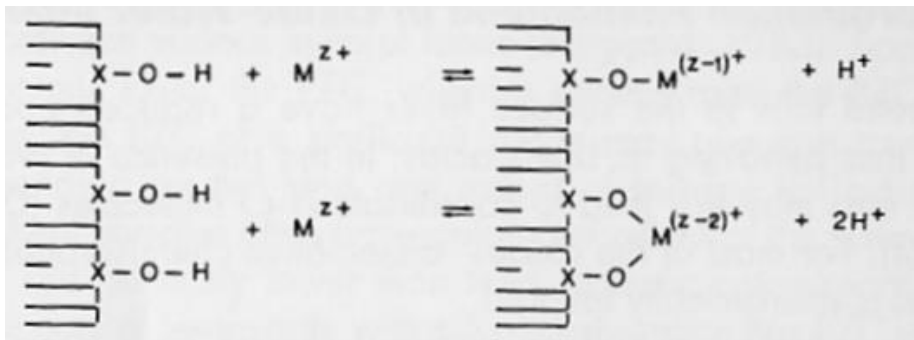
Saturation avec un autre cation : échange avec une solution saline neutre :  
ex :  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$



# Localisation des ETM dans un sol

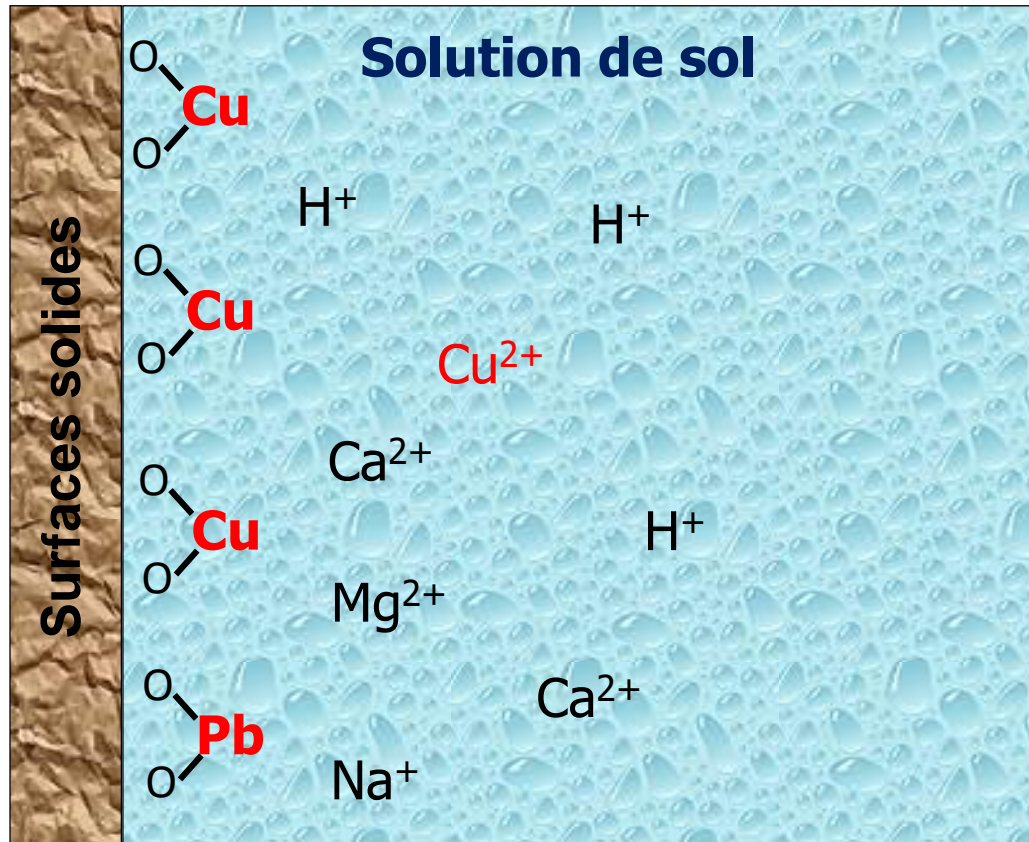


# Cas de la complexation

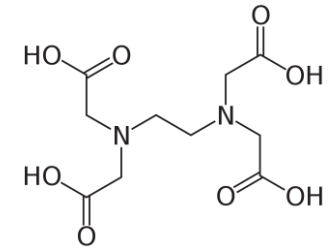


# Comment quantifier les cations sorbés par échange ionique ?

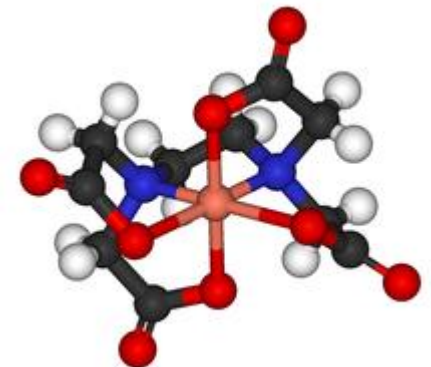
Echange avec des complexants de plus forte affinité :  
Ex complexants organiques (EDTA, DTPA)



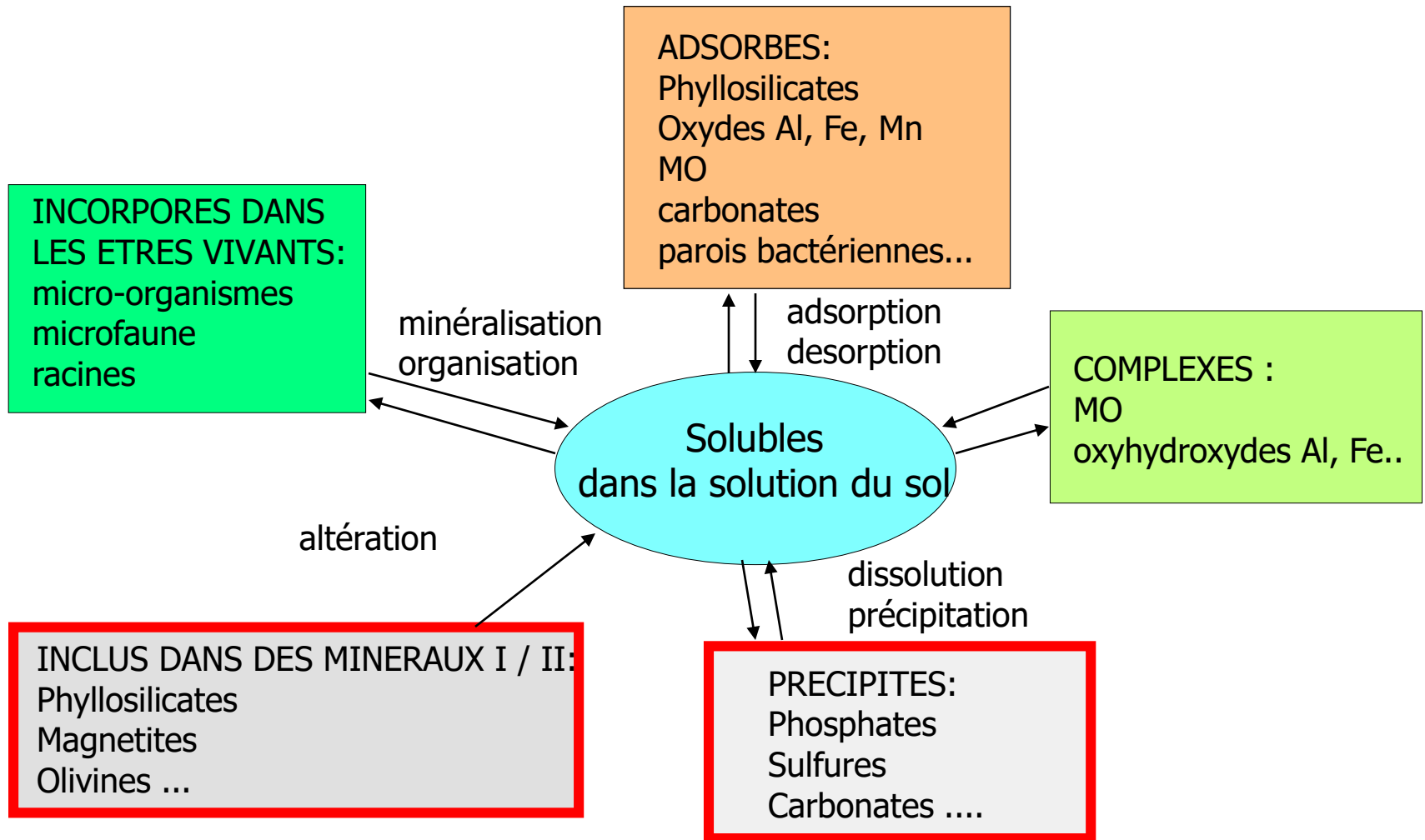
acide éthylènediaminetétraacétique



Complexe EDTA-Cu



# Localisation des ETM dans un sol



# Extractions chimiques sélectives

Extraire les métaux par :

## 1) échange ou complexation

- Échange à l'eau
- Echange avec des solutions salines non tamponnées ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )
- Acides dilués
- Complexants organiques (EDTA, DTPA)

## 2) dissolution des phases porteuses

- Oxydation de la MO ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )
- Dissolution des oxydes de fer
- Dissolution des phases carbonatées (acides)

# Extractions chimiques séquentielles

Même principe mais en reprenant les résidus pour faire une cascade d'extractions

1<sup>ère</sup> méthode issue des travaux sur les sédiments

Table 3  
Summary of the Tessier et al. (1979) sequential extraction procedure

Step	Operational definition	Chemical reagents and conditions
1	Exchangeable	1 g is extracted at room temp. for 1 h with 8 ml of 1 M MgCl <sub>2</sub> (pH 7) with continuous agitation <sup>a</sup>
2	Carbonate	To Step 1 residue add 8 ml of 1 M NaOAc adjusted to pH 5 with HOAc, shake for 5 h at room temperature
3	Reducible	To Step 2 residue add 20 ml of 0.04 M NH <sub>2</sub> OH·HCl in 25% HOAc at 96 °C for 6 h
4	Oxidizable	To Step 3 residue add 3 ml of 0.02 M HNO <sub>3</sub> and 5 ml of 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (pH 2) and heat to 85 °C for 2 h; add 3 ml of acidified H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , heat to 85 °C for 3 h; finish with 5 ml of 3.2 M NH <sub>4</sub> OAc in 20% HNO <sub>3</sub> and agitate for 0.5 h
5	Residual	To Step 4 residue add 2 ml of conc. HClO <sub>4</sub> and 10 ml of HF, heat to dryness; add 1 ml of HClO <sub>4</sub> and 10 ml of HF, heat to near dryness; finish with 1 ml of HClO <sub>4</sub> , with the residue dissolved in 12 M HCl <sup>b</sup>



# Extractions chimiques séquentielles

## Procédure BCR Quevauvillier et al., 1993

Table 1  
Chemical reagents and analytical conditions for the original BCR sequential extraction procedure

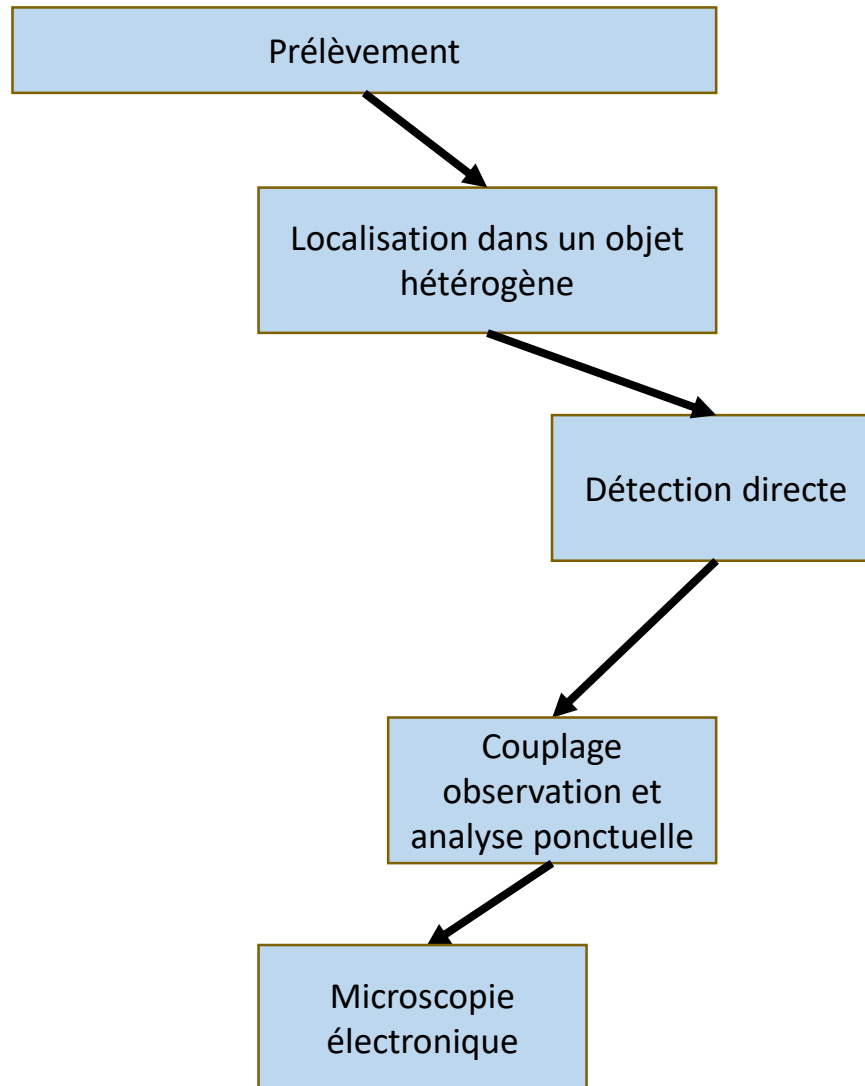
Step <sup>a</sup>	Operational definition	Chemical reagents and conditions
1	Acid-extractable	1-g aliquot, 40 ml of 0.11 M HOAc, shake for 16 h at ambient temperature; separate extract from the solid residue by centrifugation at 1500×g for 20 min
2	Reducible	To Step 1 residue add 40 ml of 0.1 M NH <sub>2</sub> OH·HCl (acidify to pH 2 with HNO <sub>3</sub> ), shake for 16 h at ambient temp.; centrifuge at 1500×g for 20 min
3	Oxidizable	To Step 2 residue add 10 ml of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (pH 2–3), 1 h at room temp., heat to 85 °C for 1 h; add a further 10 ml of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> and heat to 85 °C for 1 h; add 50 ml of 1 M NH <sub>4</sub> OAc (pH 2) and shake for 16 h at ambient temp.; centrifuge at 1500×g for 20 min
4	Residual	Digest Step 3 residue on a hotplate using HF/HNO <sub>3</sub> /HClO <sub>4</sub> mixture in a Teflon dish

# Extractions chimiques séquentielles

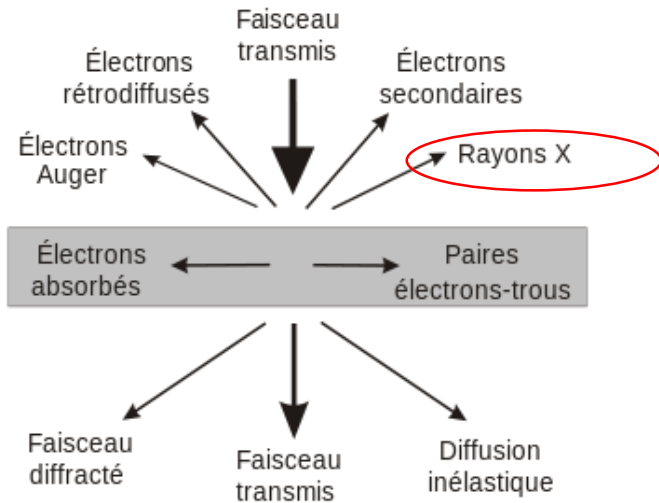
Inconvénients :

- Problème de la ré-adsorption des métaux mis en solution sur des phases encore présentes dans le résidu
- Suivant les sols, quelle succession d'étape choisir ?
- De nombreuses méthodes proposées dans la littérature

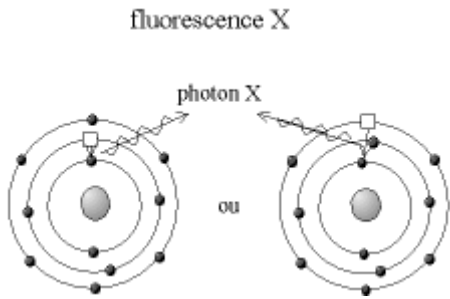
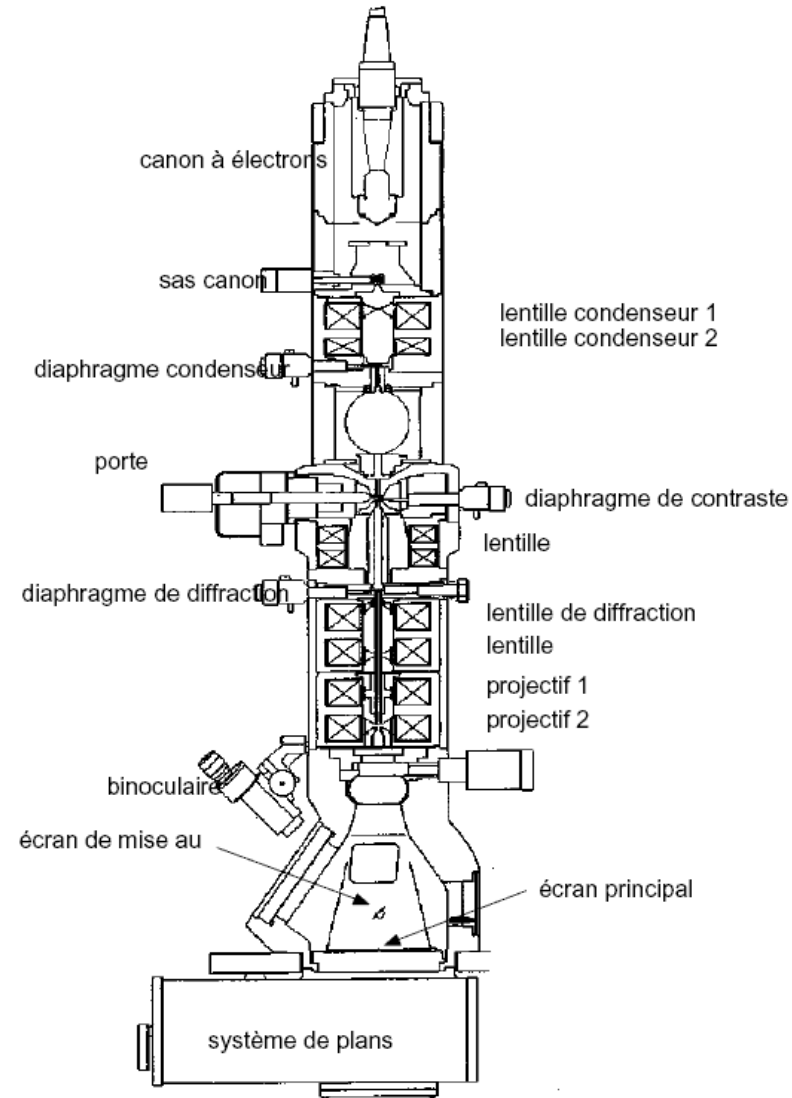
# Démarche générale



# Microscopie électronique analytique



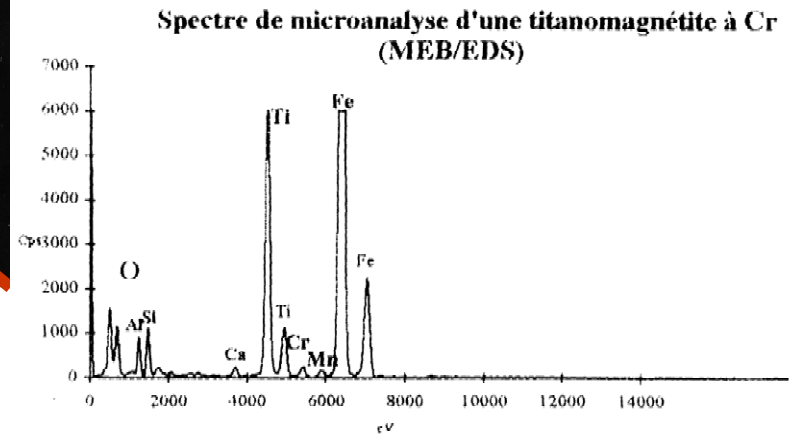
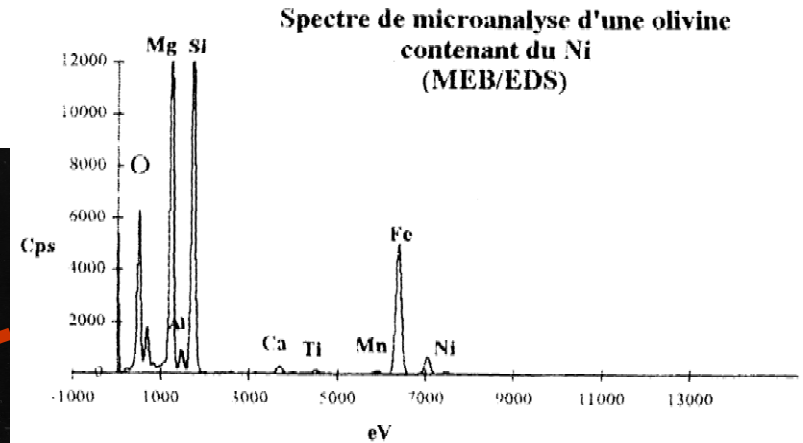
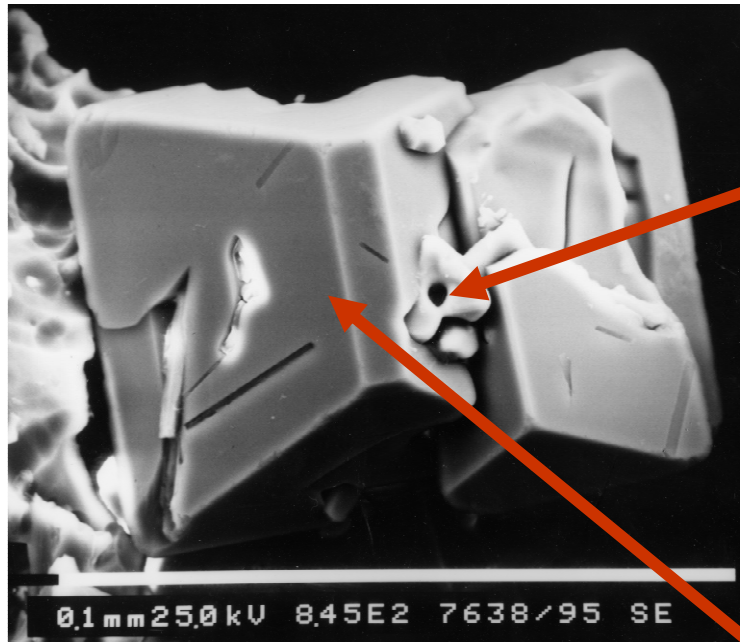
Détecteur EDX



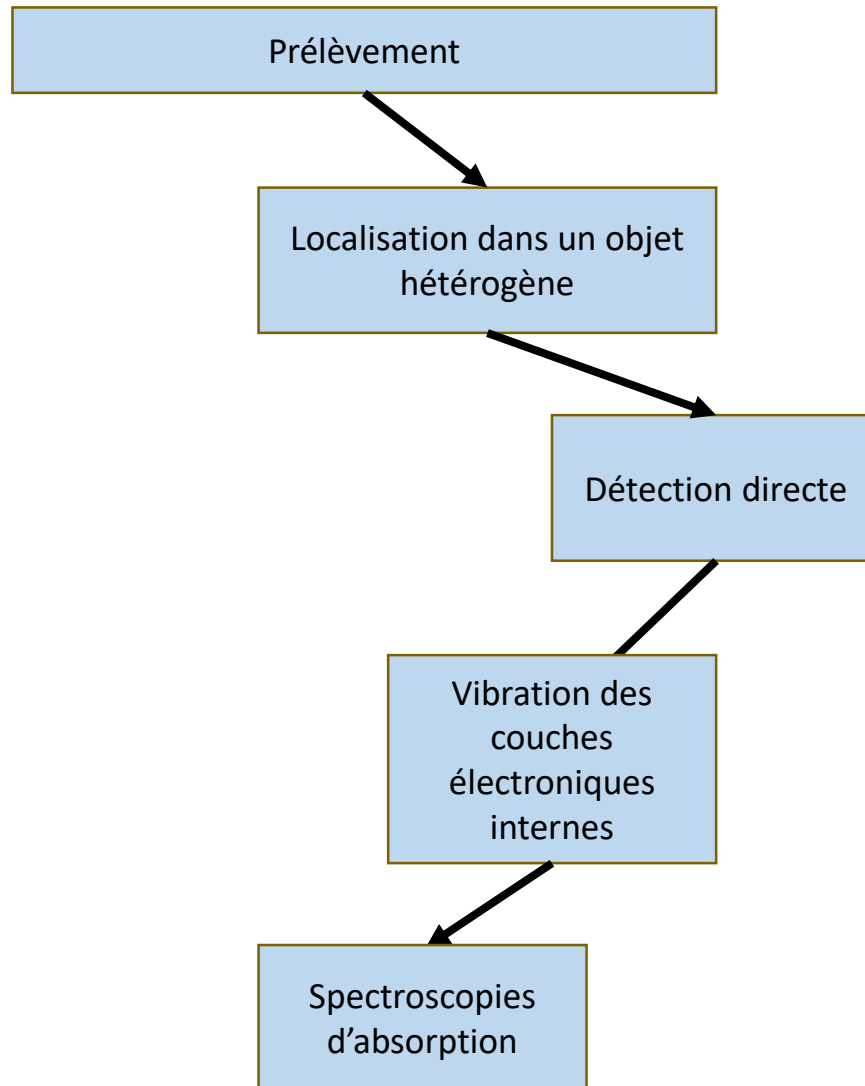
$$E = h.c / \lambda$$

Energie des photons caractéristiques des éléments

# Localisation des métaux dans les minéraux



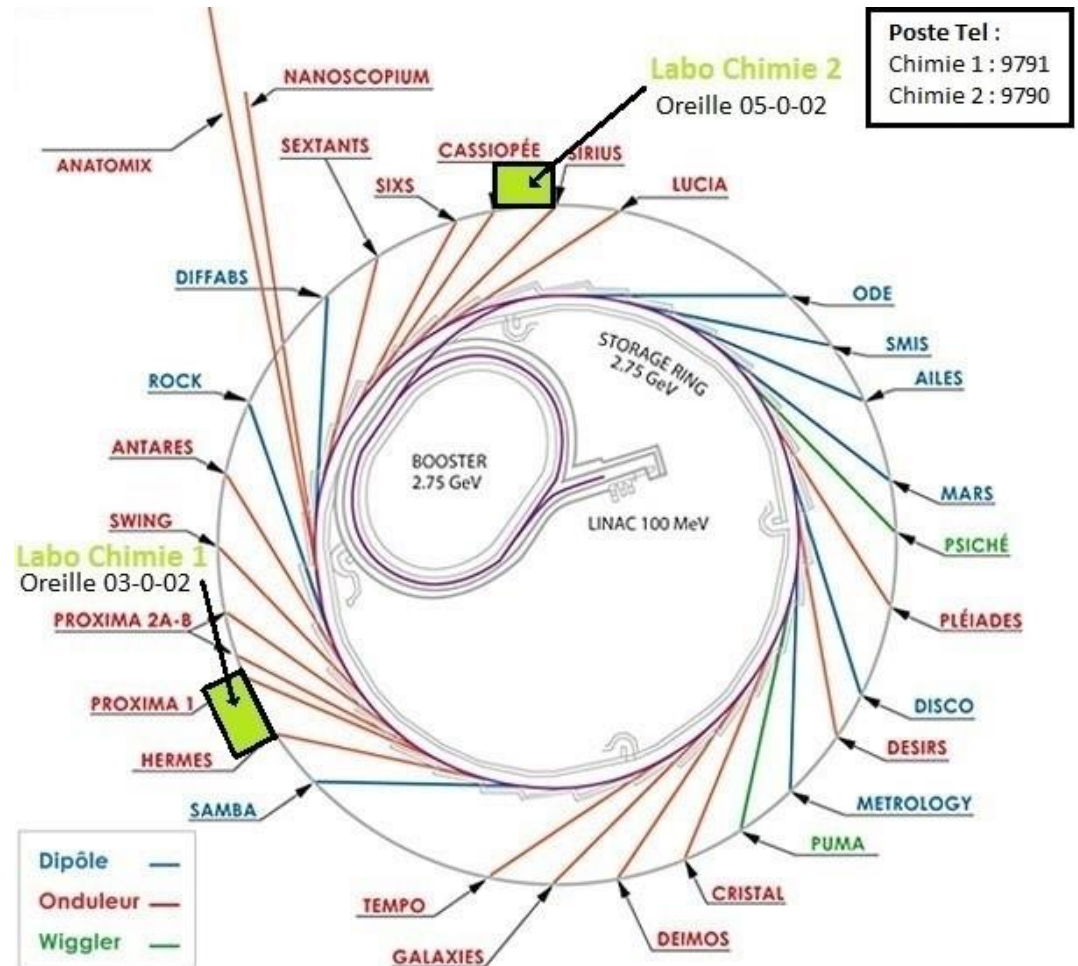
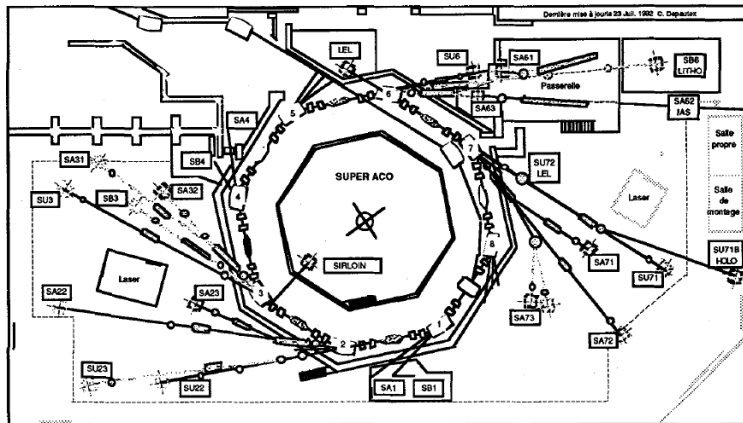
# Démarche générale



# Le rayonnement synchrotron

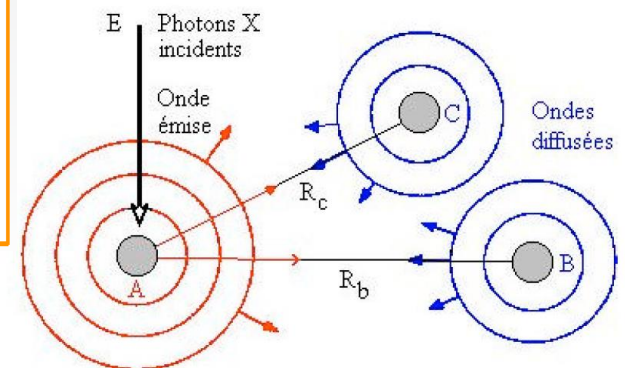
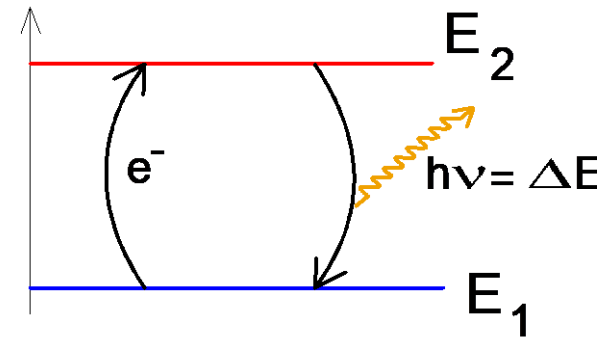
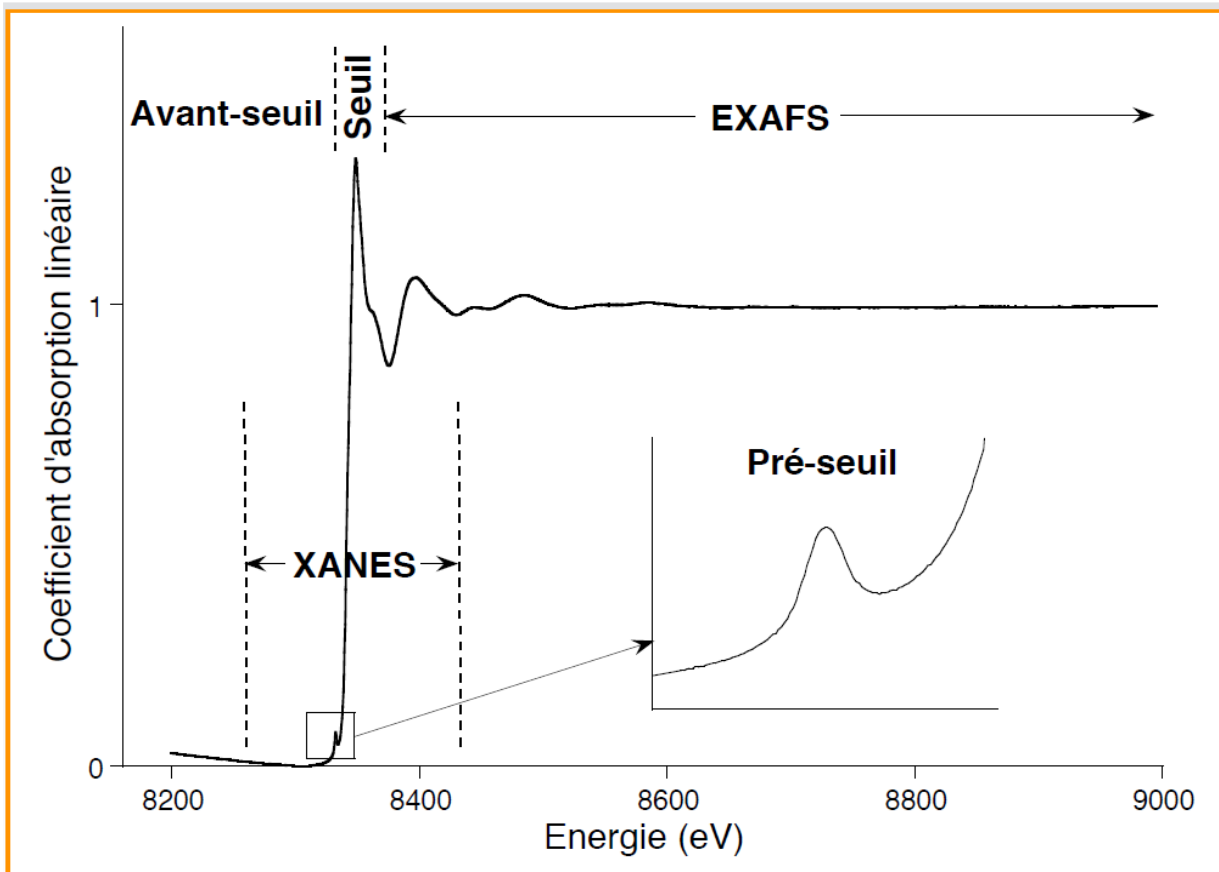
Une source intense d'énergie = Un accélérateur de particules puis un anneau de stockage

## Le synchrotron SOLEIL



Poste Tel :  
Chimie 1 : 9791  
Chimie 2 : 9790

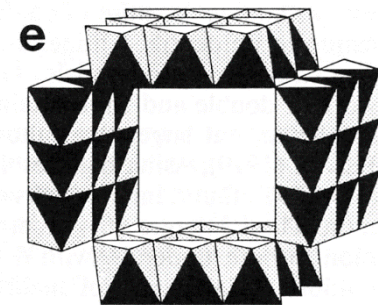
# XANES (X ray Absorption Near Edge Structure) et EXAFS (Extended X ray Absorption Fine Structure)



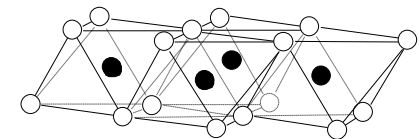


# Spéciation du Mn dans la boue

Todorokite



Birnessite



d'après Hargé (1997)

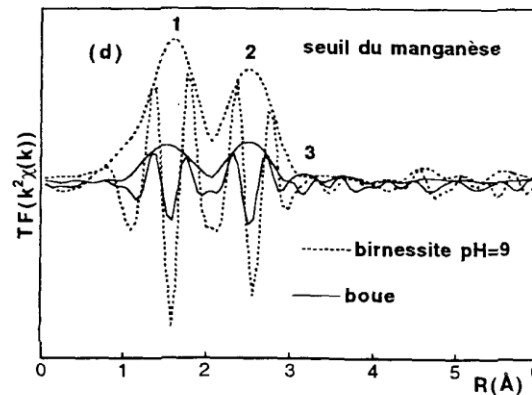
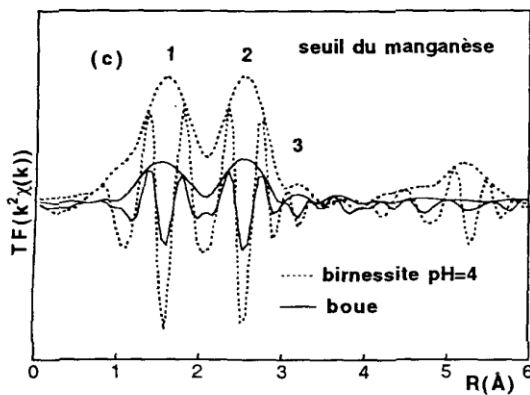
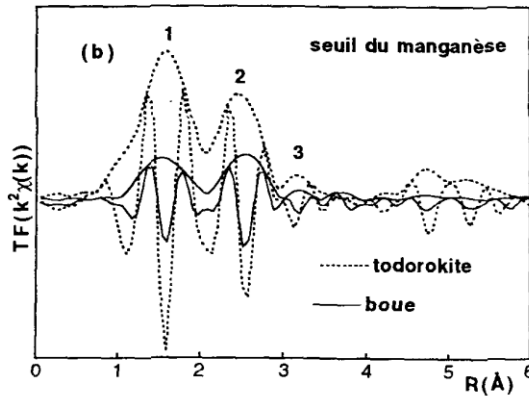
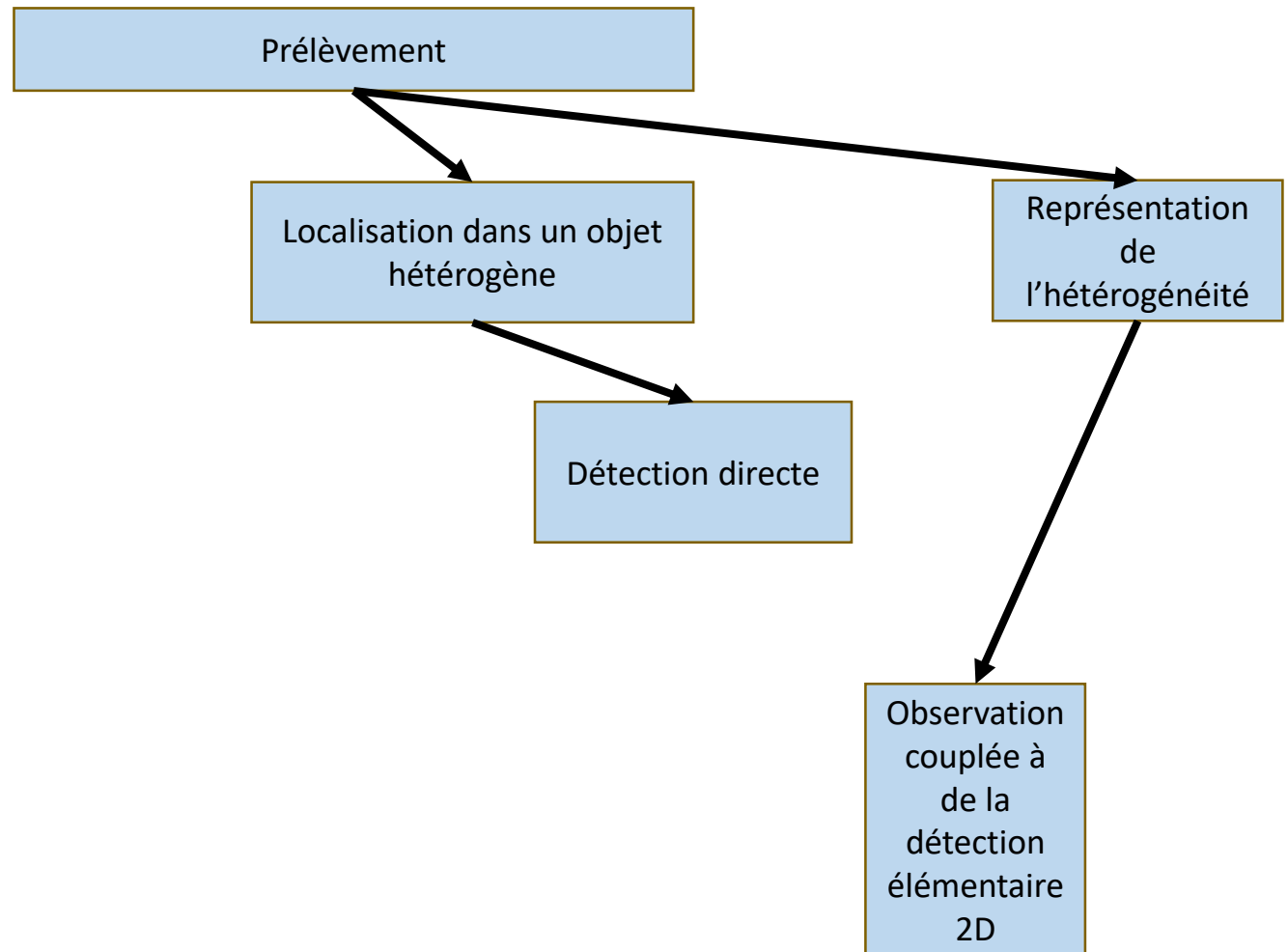


Figure 3-11 : Comparaison des FDR au seuil du manganèse de la boue d'Ambarès, de la chalcophanite<sup>(a)</sup>, de la todorokite<sup>(b)</sup>, de la birnessite hexagonale<sup>(c)</sup> et monoclinique<sup>(d)</sup>.

# Démarche générale



# Techniques d'imagerie

Techniques d'imagerie des éléments chimiques	Limite de détection	Résolution spatiale	Sélectivité	Quantification	Profondeur d'analyse
Microsonde électronique EDS (X-ray Energy Dispersive Spectrometry)	100 à 1000 µg/g	0,5 µm	Multiélémentaire ( $Z \geq 6$ )	Semi-quantitative	0,1 à 1 µm
EELS (Electron Energy Loss Spectroscopy)	1000 µg/g	1 nm	Multiélémentaire ( $Z \geq 6$ ) Formes chimiques	Semi-quantitative	< 50 nm
Microsonde faisceau d'ions	1 à 10 µg/g	0,2 - 2 µm	Multiélémentaire (tous Z)	Quantitative	10 à 100 µm
Microsonde rayonnement synchrotron XRF	< 0,1 µg/g	0,1 - 2 µm	Multiélémentaire ( $Z \geq 6$ )	Semi-quantitative	> 100 µm
XAS (X-ray Absorption Spectroscopy)	100 µg/g	1 µm	Formes chimiques		> 100 µm
Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LA-ICP-MS)	0,001 µg/g	5 - 15 µm	Multiélémentaire Isotopes	Semi-quantitative	200 µm
Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS)	0,001 µg/g	0,05 µm	Multiélémentaire Isotopes	Semi-quantitative	0,1 µm
Micro Spectrofluorométrie	0,01 µg/g	1 µm	Fluorophores (Na, Mg, K, Ca ...)	Quantitative	Cellule

# Trichomes de *A. halleri* (hyperaccumulatrice) $\mu$ Fluorescence X

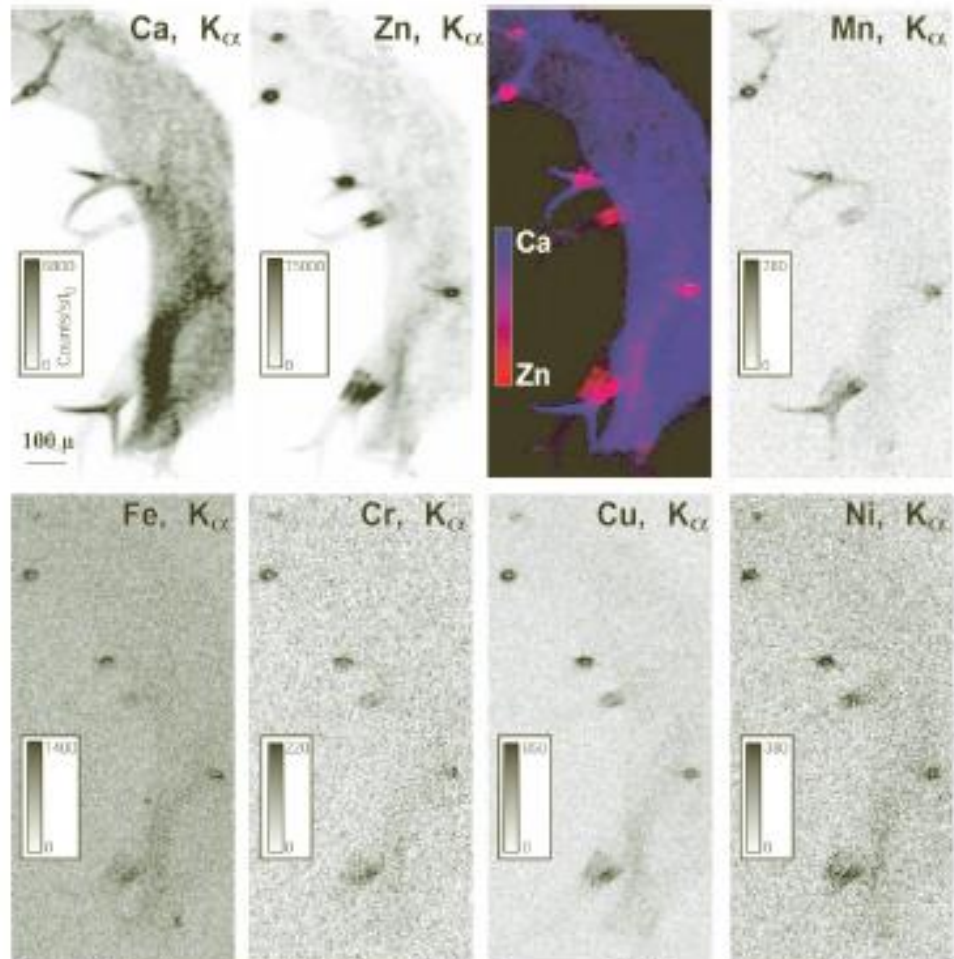
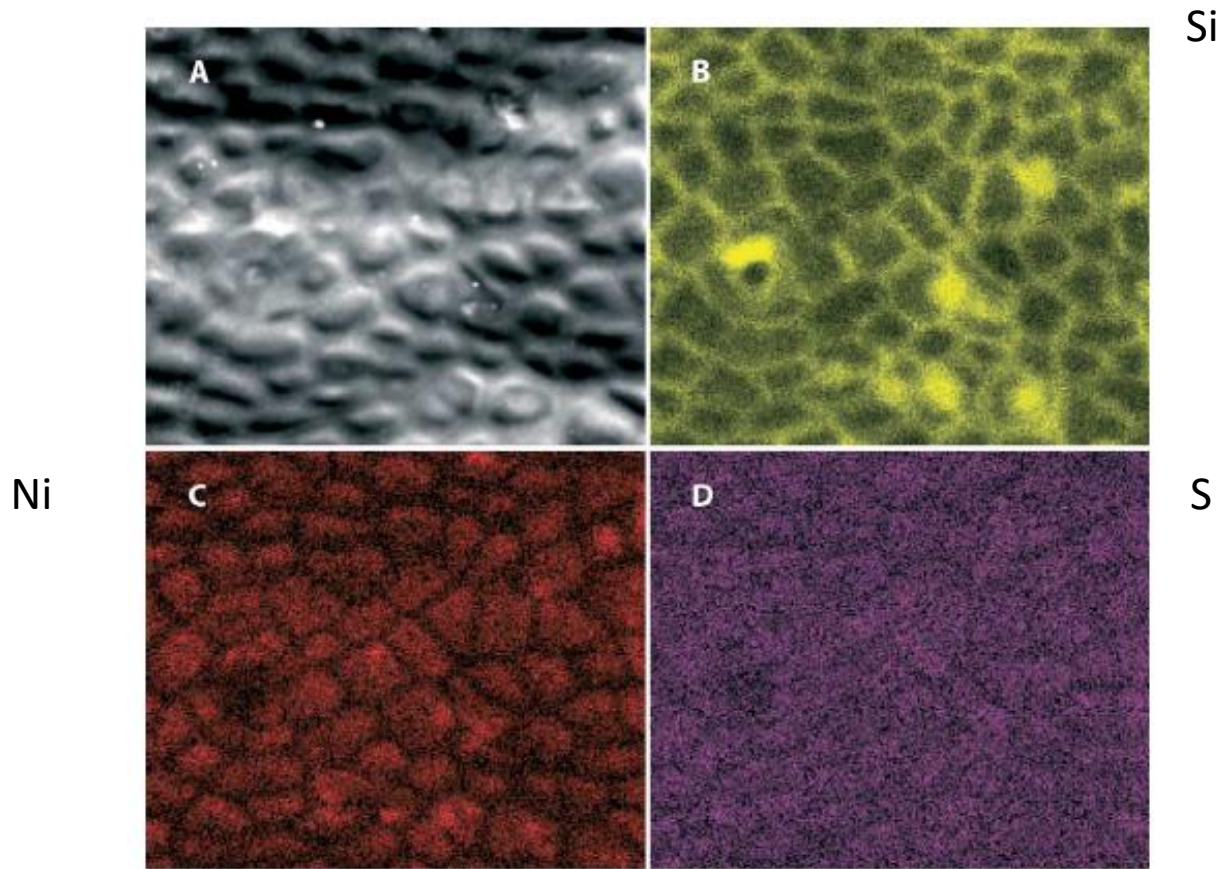
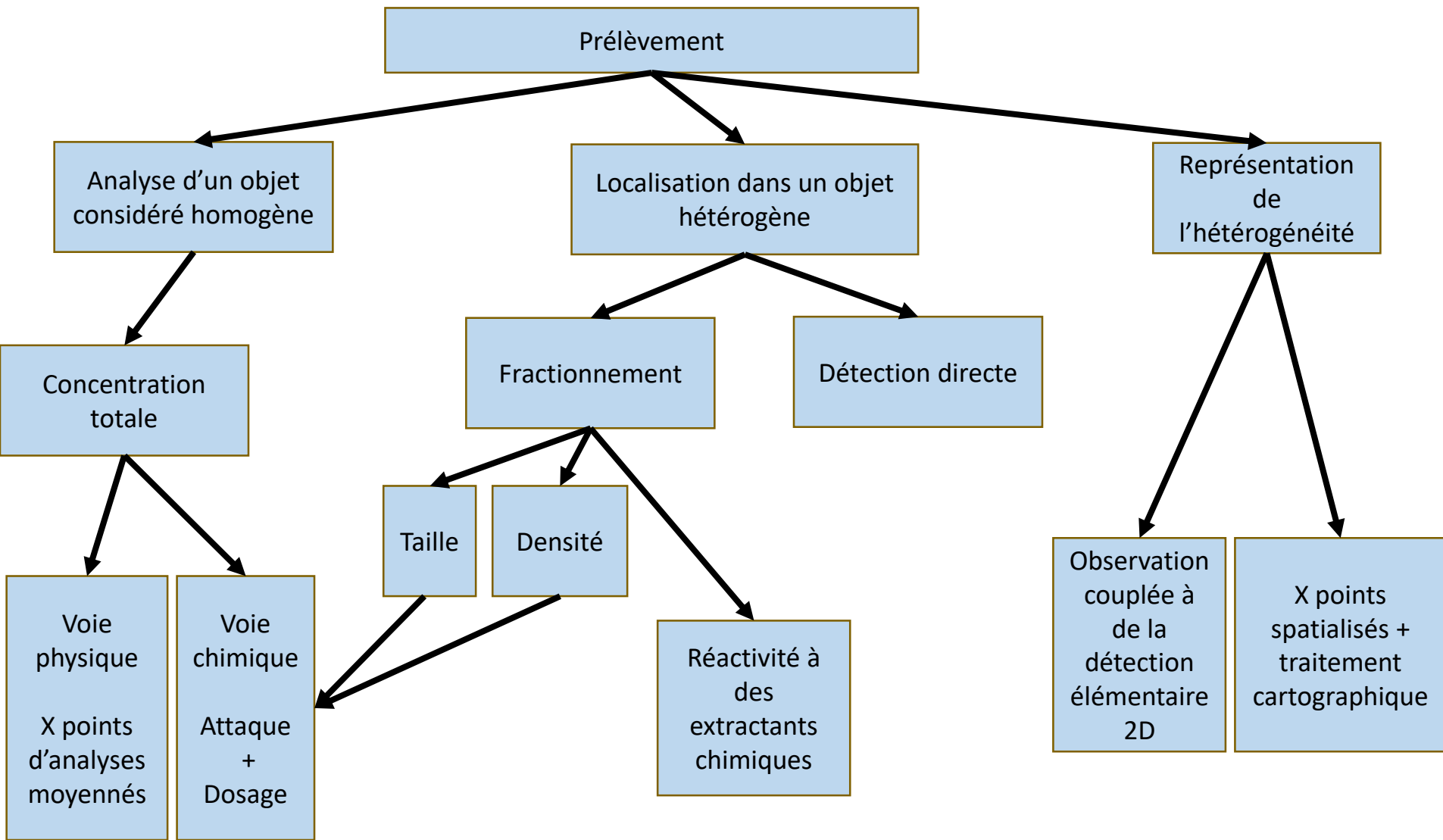


Figure 6.  $\mu$ SXRF elemental maps of a leaf fragment (incident beam energy, 9.7 KeV; beam size and pixel size,  $5 \times 5 \mu\text{m}$ ; dwell time, 150 ms pixel $^{-1}$ ). The number of fluorescence yield counts were normalized by  $I_0$  and the dwell time. Metals are concentrated in the bases of the trichomes.

# Localisation cellulaire du nickel (EDS)

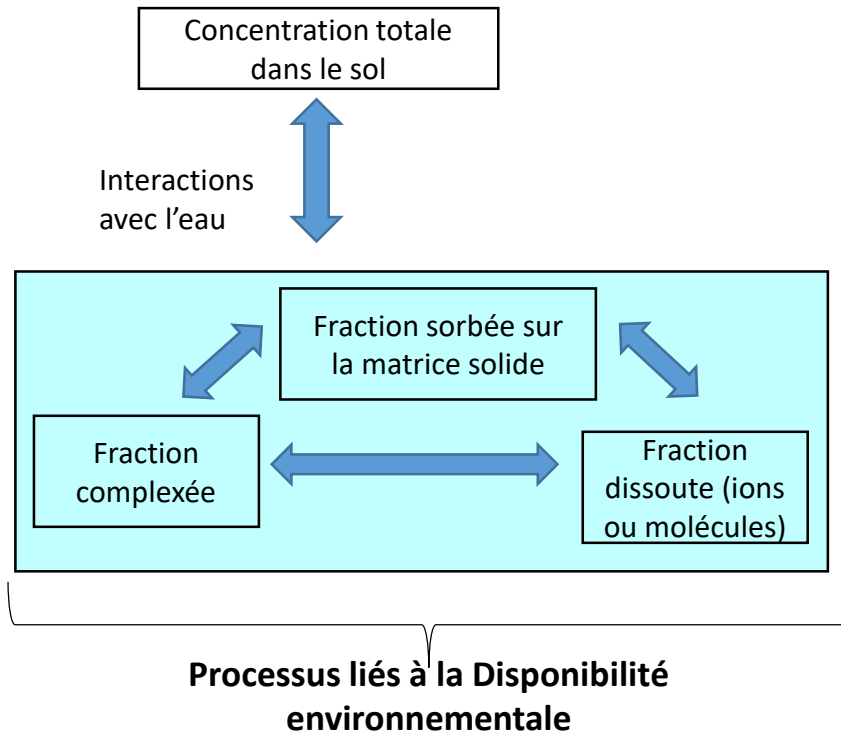


# Démarche générale



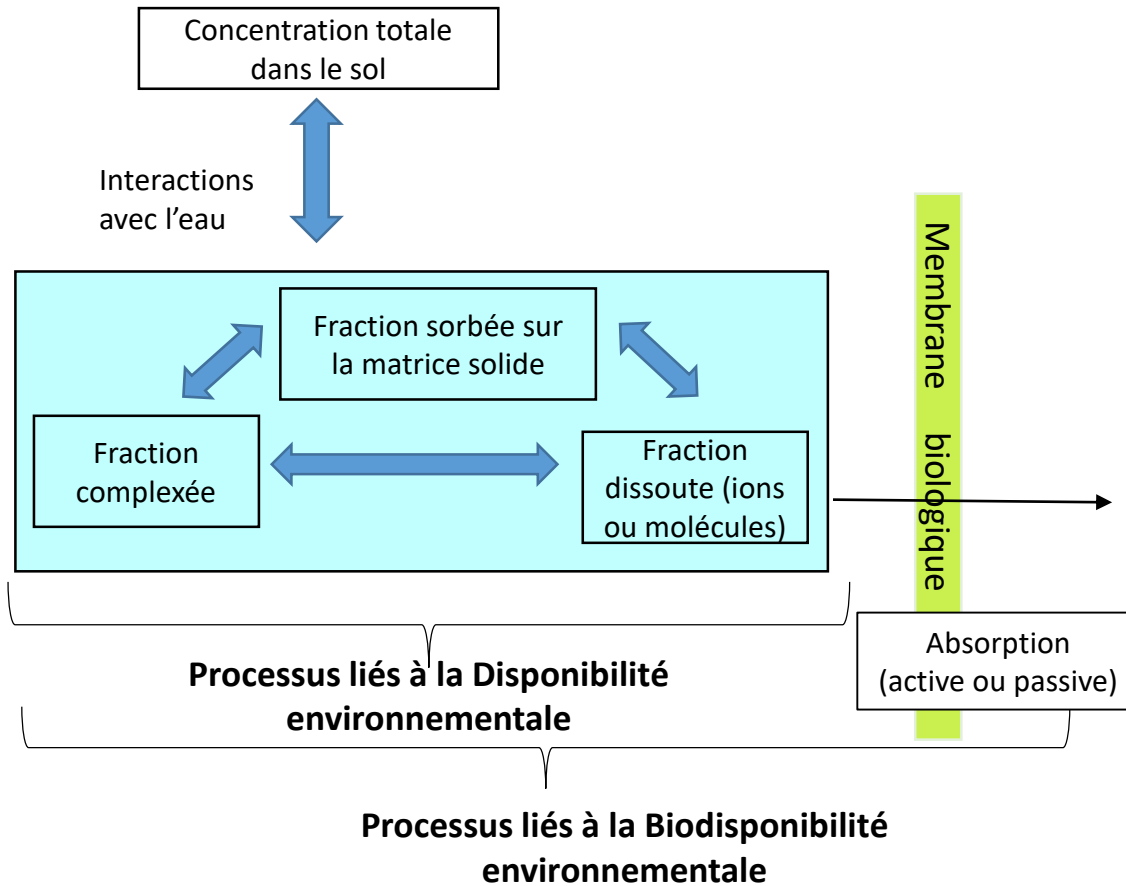
Biodisponibilité

# Le concept de biodisponibilité

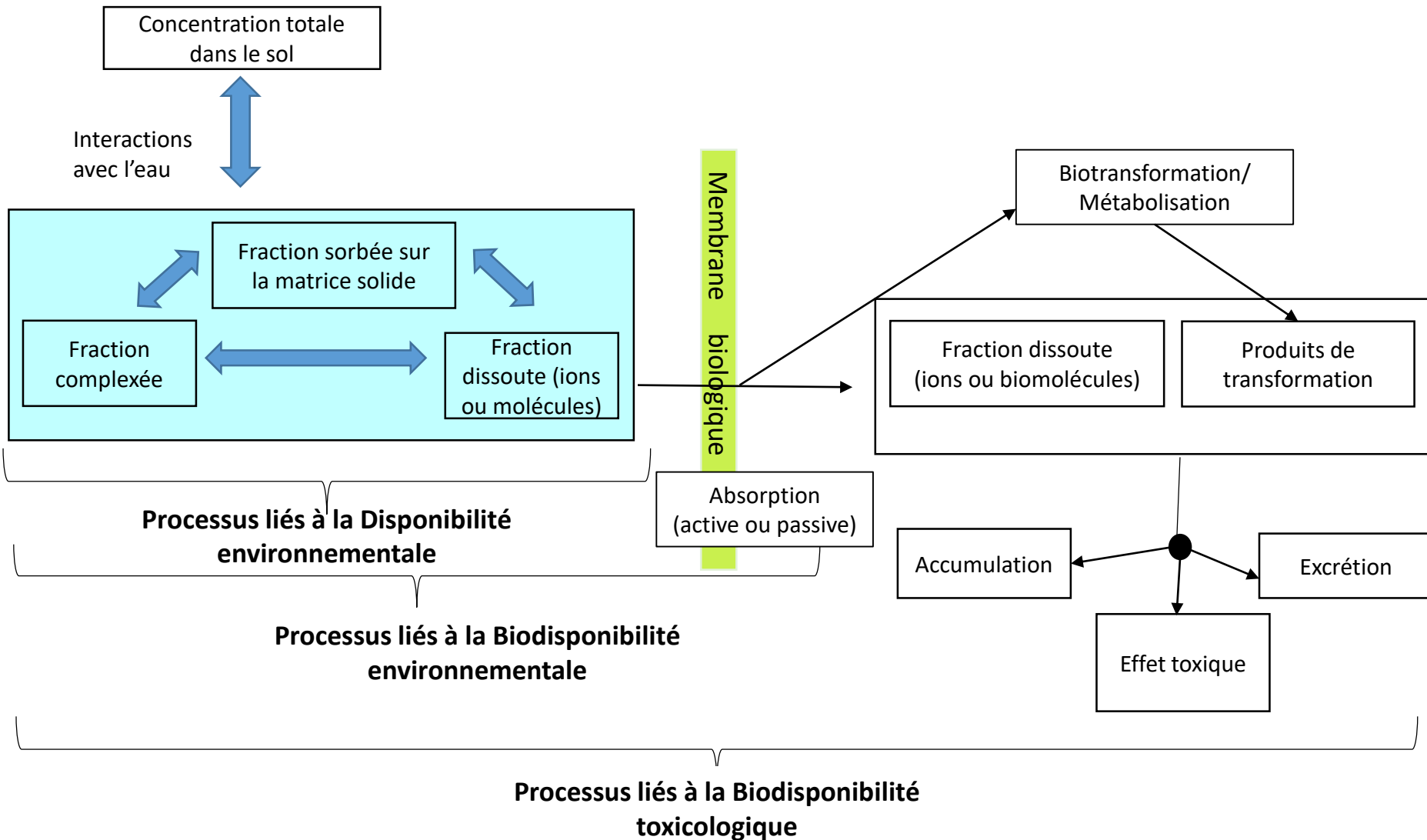




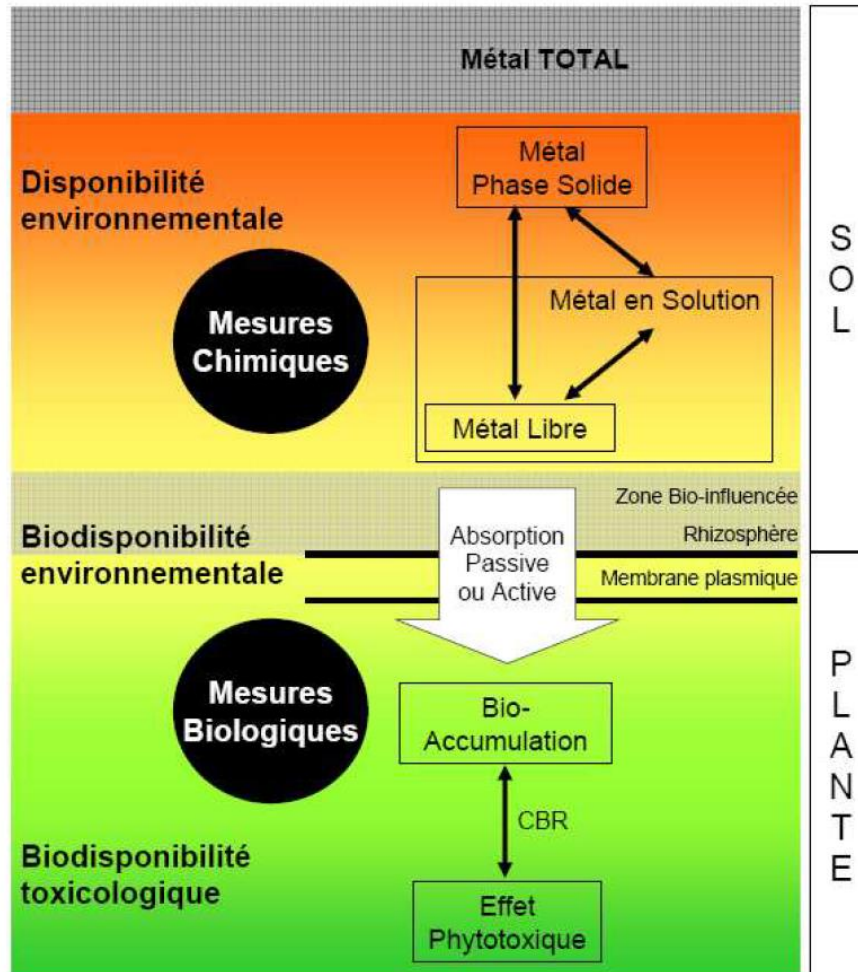
# Le concept de biodisponibilité



# Le concept de biodisponibilité



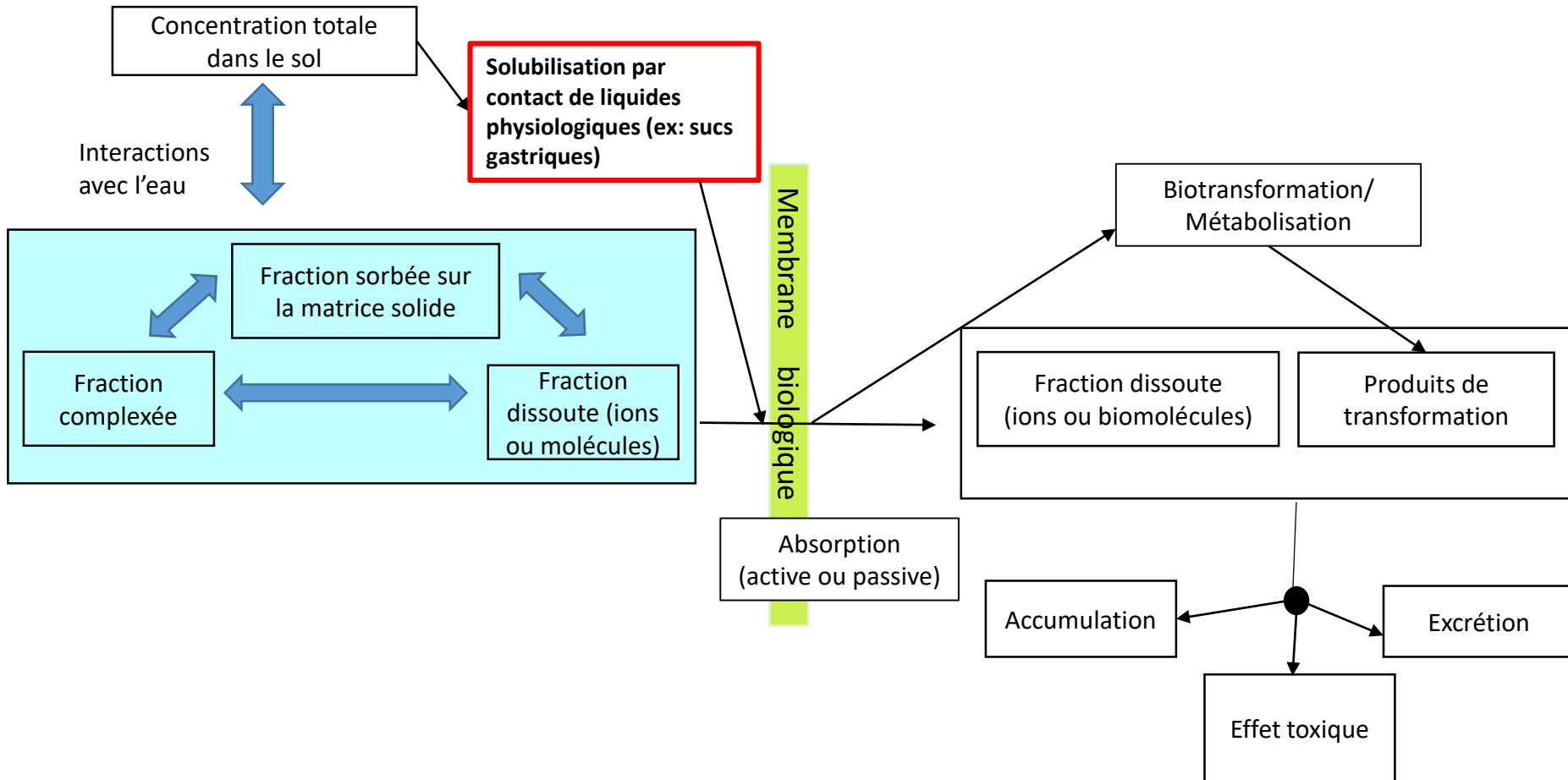
# Le concept de biodisponibilité



- ❖ La biodisponibilité représente la quantité susceptible d'être absorbé par un organisme vivant.
- ❖ Cette quantité dépend de la capacité d'absorption de l'organisme mais aussi de la disponibilité.

**Figure 1.** Biodisponibilité des métaux pour les plantes à trois composantes: disponibilité environnementale, biodisponibilité environnementale et biodisponibilité toxicologique (CBR = Critical Body Residue). Mesures « chimiques » et « biologiques » permettant d'évaluer la biodisponibilité (D'après Lanno et al. 2004; ISO 2006).

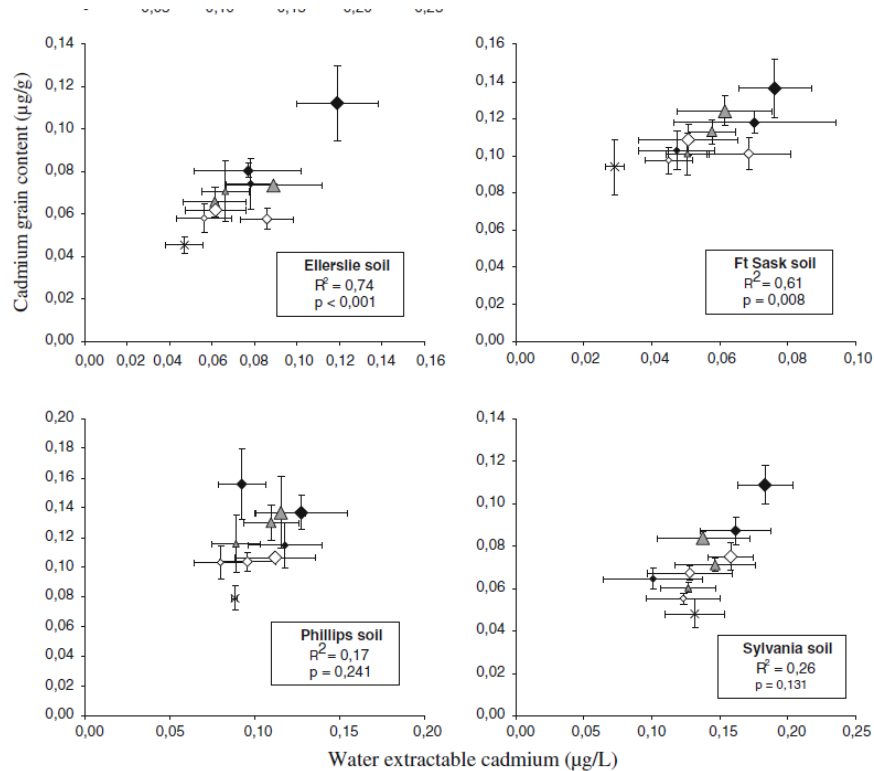
# Le concept de bioaccessibilité



# Tentatives pour relier les extractions chimiques et la biodisponibilité

Cas du cadmium dans les grains de blé

Extraction à l'eau



François et al., 2009

Extraction à l'EDTA

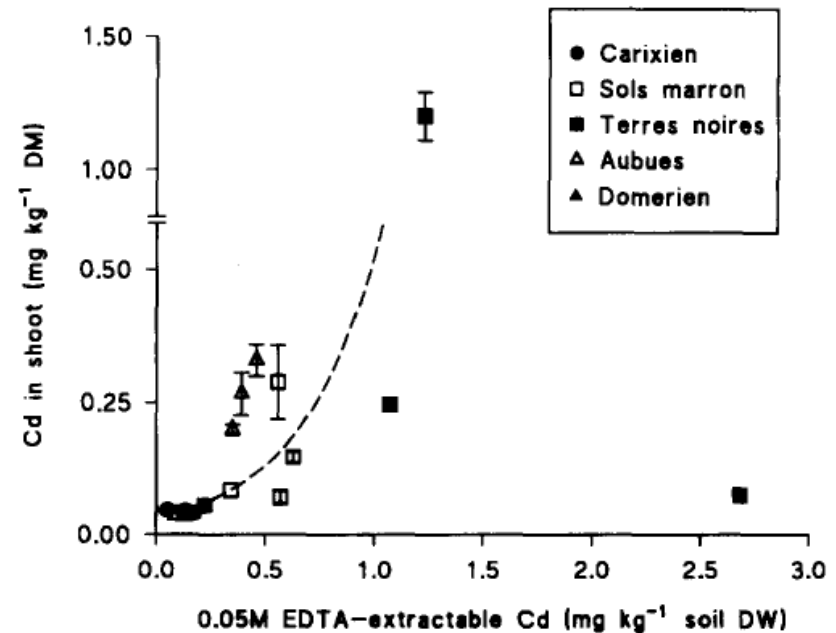


Fig. 8. Variation in mean wheat shoot Cd concentration with 0.05 M EDTA-extractable Cd in soil.

Mench et al., 1997

# Prélèvement de la solution de sol

Nécessité de prélever un liquide représentatif du liquide à l'équilibre avec les phases solides et gazeuses du sol

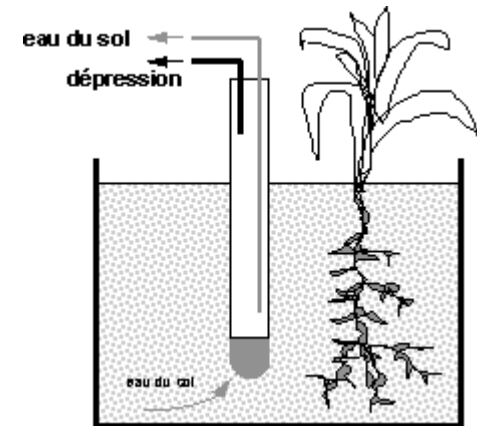
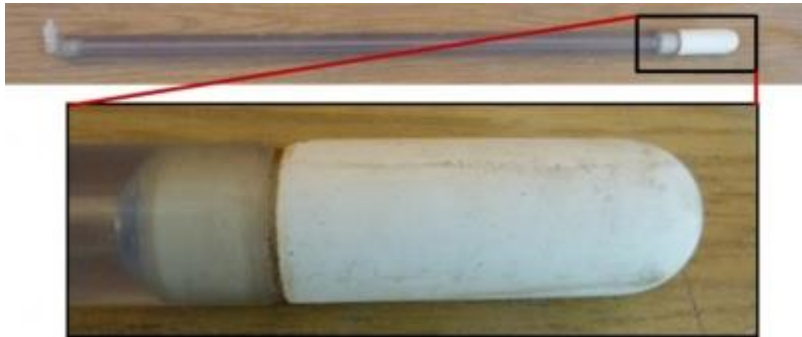
⇒ Problème : le fait de prélever rompt l'équilibre !

⇒ Attention à la conservation de l'échantillon (ex : échanges avec l'air ambiant)

# Prélèvement de la solution

Deux méthodes principales :

- Bougies microporeuses



- Centrifugation

# Sol => Solution

- Nécessité de développer une approche qui prend en compte à la fois la concentration dans la solution du sol et la réalimentation par la phase solide, via différents phénomènes sans en privilégier un seul.

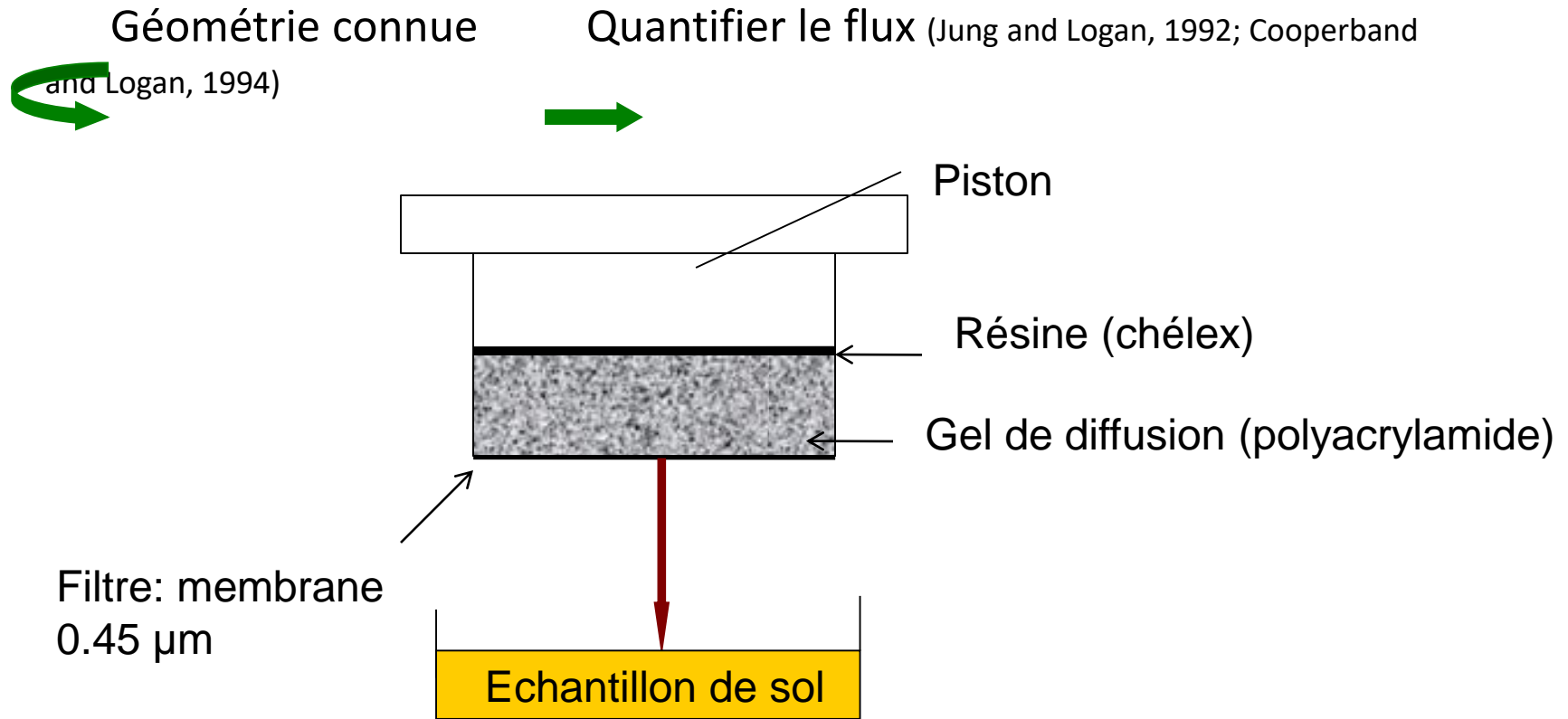


- Développement des capteurs passifs, le gradient diffusif en couches minces (**DGT**) a été mis en place par Davison et Zhang en 1994 dans les milieux aqueux.
- Cette technique a été appliquée par la suite dans les **sols** : mesure quantitative des espèces métalliques labiles (*Hooda et al. 1999; Zhang et al. 2001; Nolan et al. 2003*).



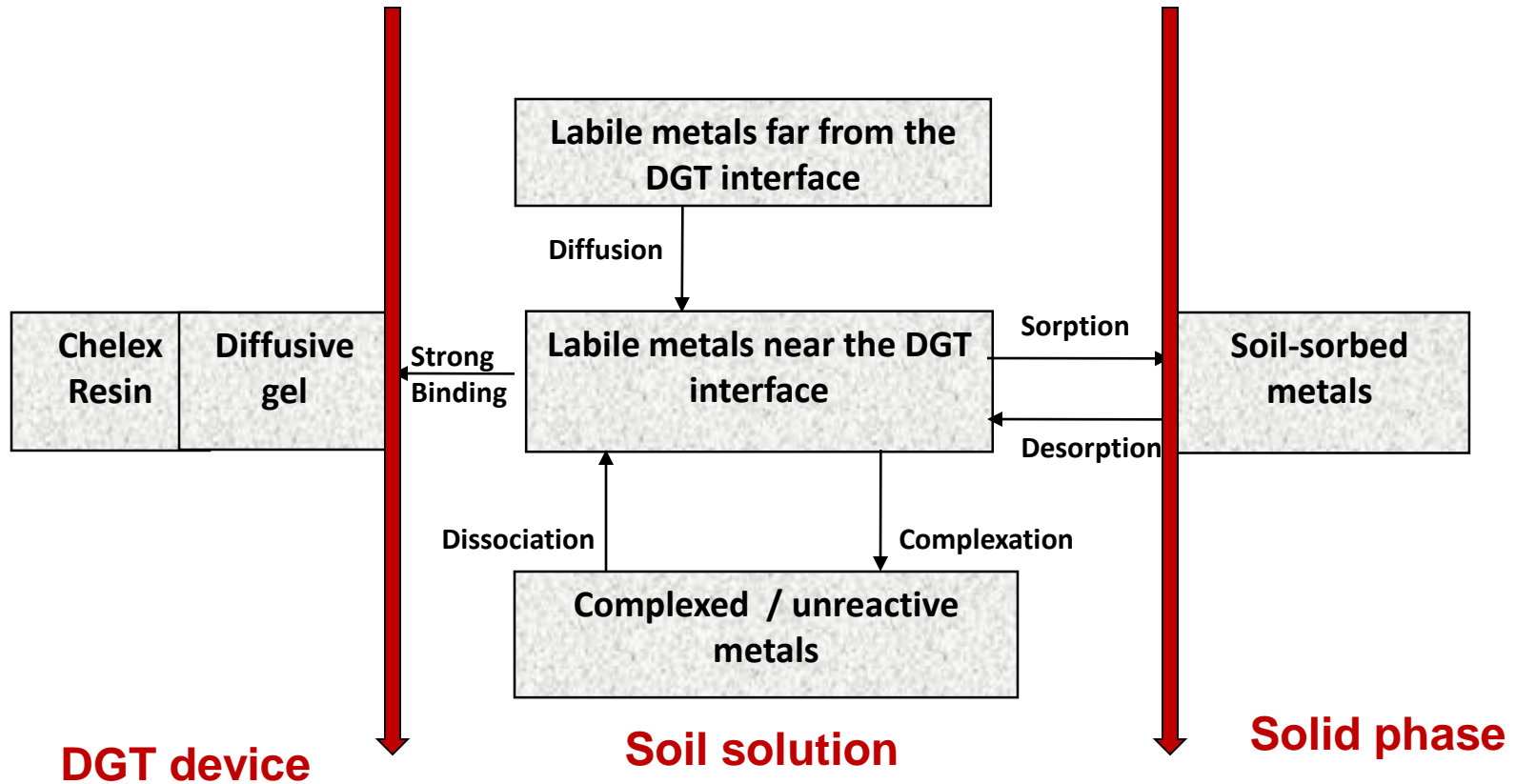
# Dispositif DGT

- La technique DGT se base sur un dispositif associant des résines chélatantes incluses dans un gel de polyacrylamide et un gel de diffusion de porosité connue.



**Représentation schématique du dispositif DGT**

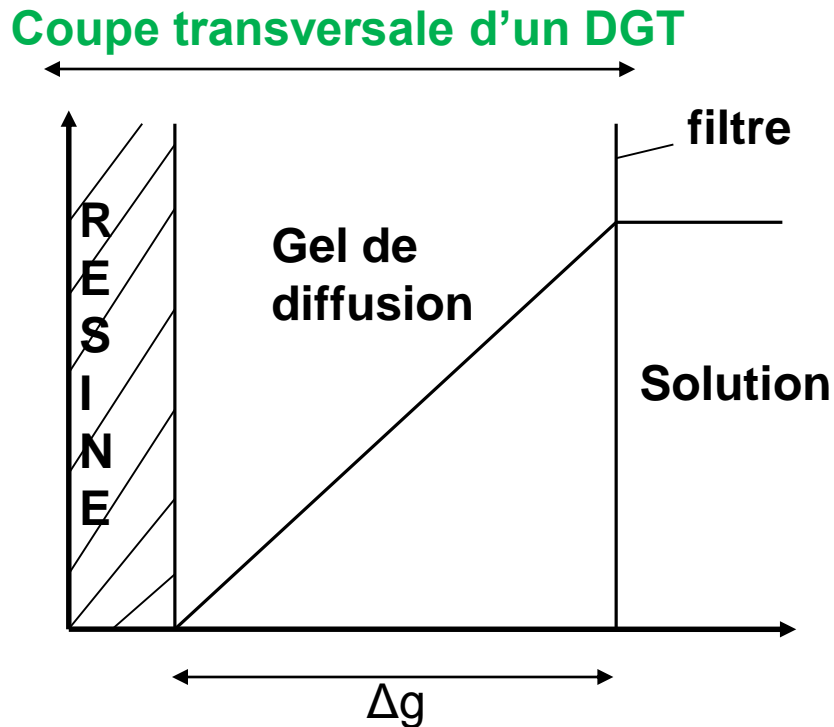
# Principe de la DGT



**DGT** (*Rachou et al., 2003; Sauvé, 2003*)

# Principe de la DGT

□ L'accumulation continue des ions métalliques est proportionnelle à leur concentration dans la solution du sol où on déploie un dispositif DGT.



□ Un dispositif DGT est caractérisé par:

- $\Delta g$  : épaisseur de la couche de diffusion
- Capacité de la résine
- gel de diffusion

=> La dimension de la DGT peut être différente selon le modèle.

**Profil de concentration de métaux labiles dans un DGT en contact avec la solution (Boeriu et al., 2003)**

# Principe de la DGT

---

- La mesure de la masse accumulée, permet à l'aide de la loi de Fick le calcul du flux de métaux à travers la surface du gel.
- Ce flux est fonction de la concentration de métal labile dans la solution.

$$F = \frac{D \cdot C_{DGT}}{\Delta g} = \frac{M}{A \cdot t}$$

*F* = flux de formes labiles des métaux

*M* = masse des ions métalliques accumulée sur la résine

*A* = l'aire de la surface de gel exposée à la solution du sol

*t* = temps du déploiement du DGT

*C<sub>DGT</sub>* = concentration de métal labile dans la solution

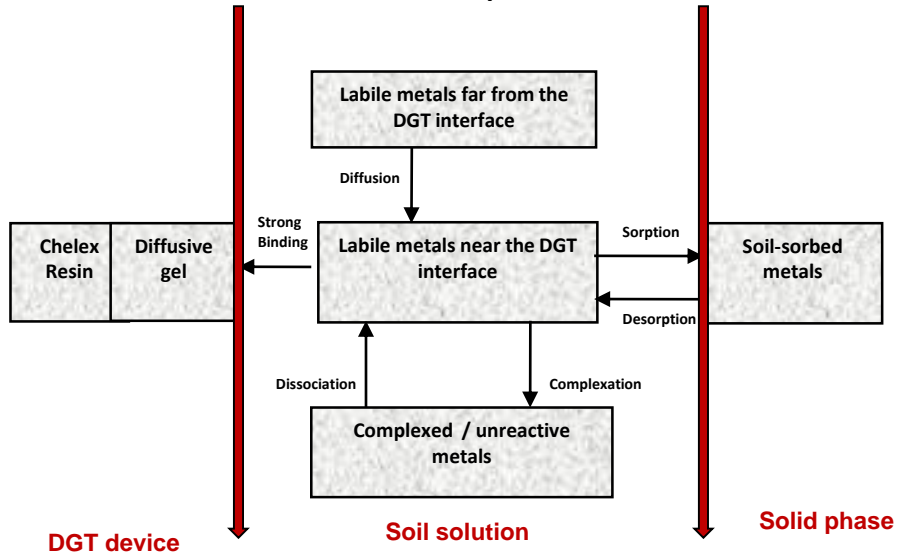
*Δg* = épaisseur de la couche de gel de diffusion

*D* = coefficient de diffusion de l'analyte

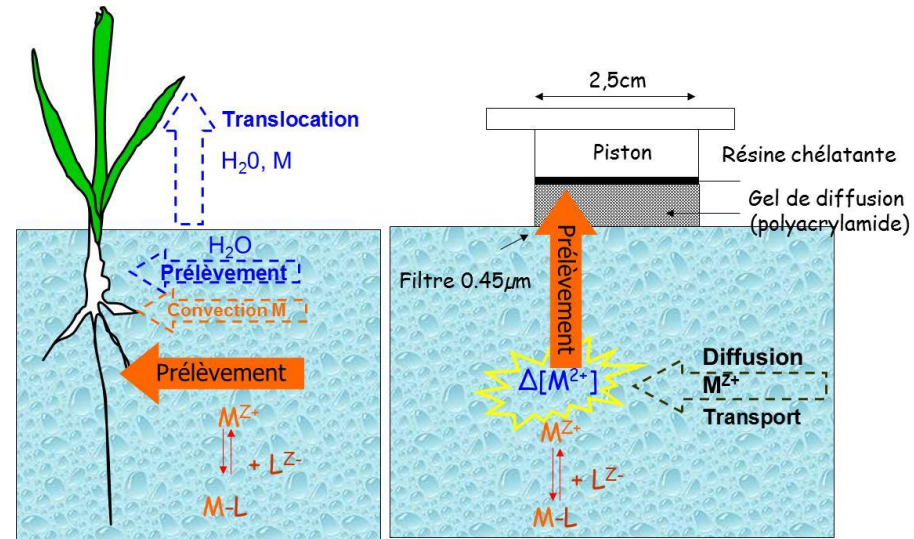
# Passive samplers for monitoring of metal bioavailability

## Diffuse Gels in Thin Films (DGT)

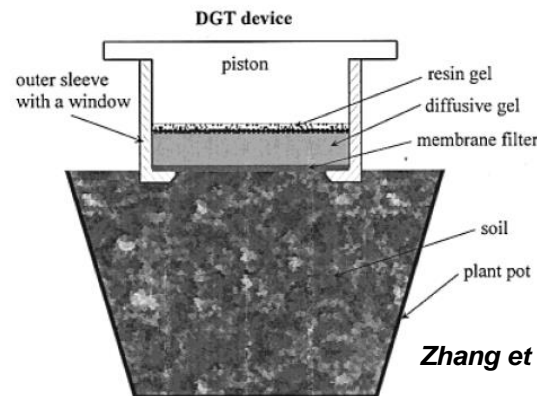
### Principle



### Mimicking the plant uptake



Rachou et al., 2003



Zhang et al. 2001

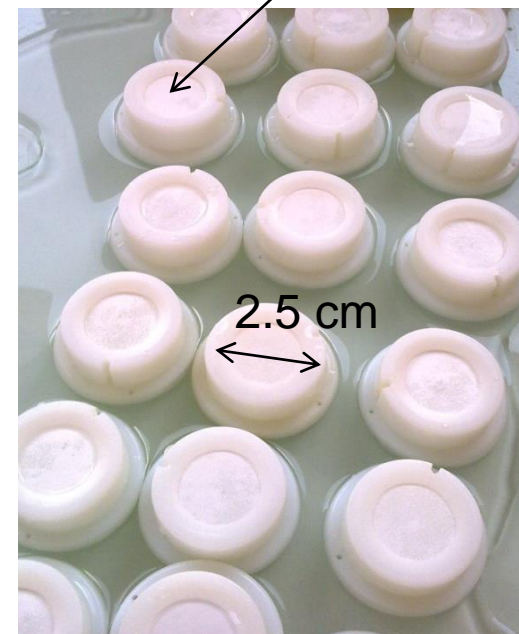
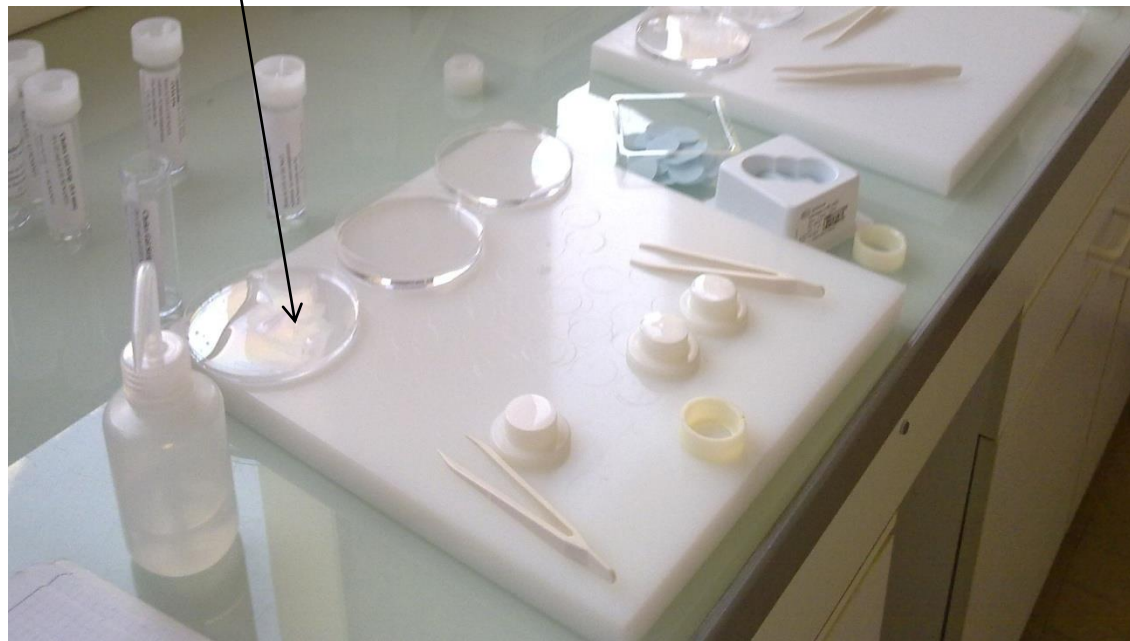
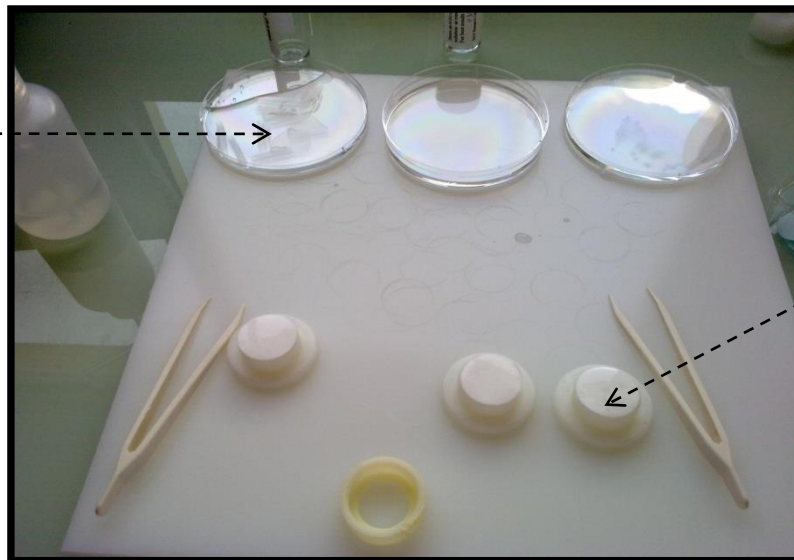
# Préparation de la DGT

Résine Chelex  
(0.4 mm)

Gel de diffusion  
(0.8 mm)

Filtre  
(0.13 mm)

Surface de contact  
(3.14 cm<sup>2</sup>)



# Le Rhizotest

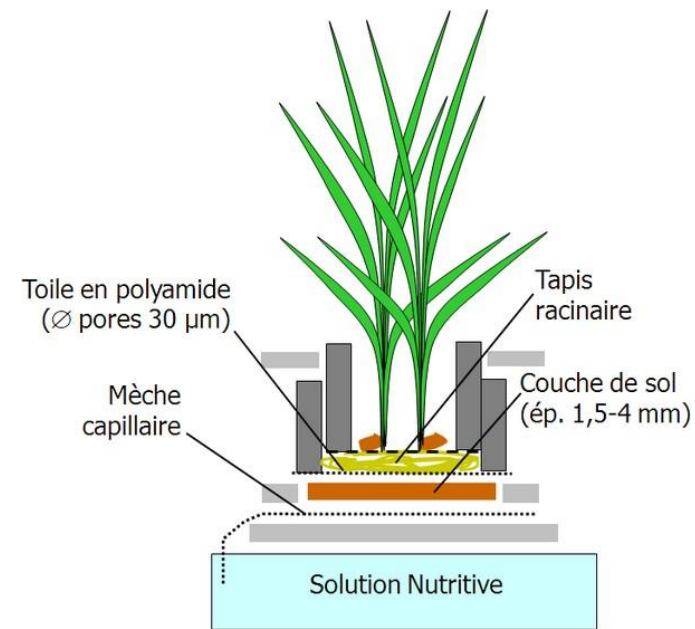
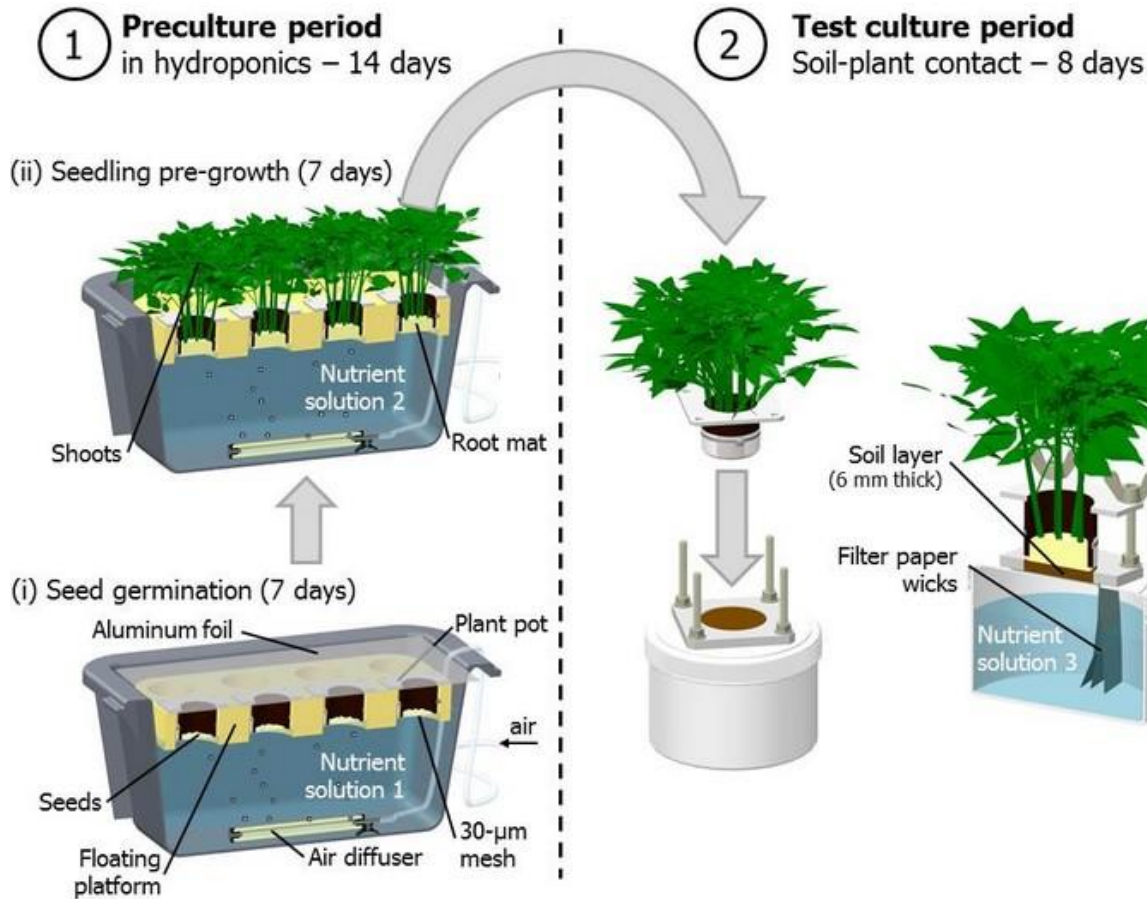
ISO 16198:2015 : « test végétal pour l'évaluation de la phytodisponibilité environnementale des éléments traces pour les plantes », dite « Rhizotest »

Principe : prélèvement par un tapis racinaire

<https://rhizotest.cirad.fr/>

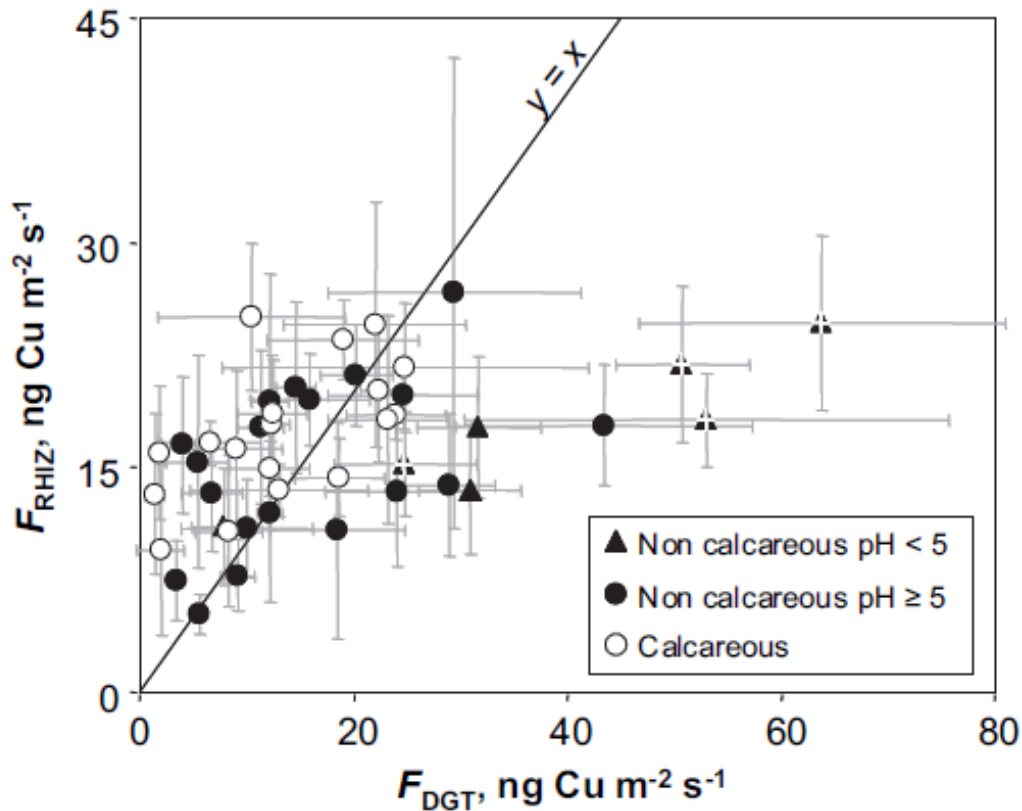
*Bravin et al., 2010, RHIZOtest: A plant-based biotest to account for rhizosphere processes when assessing copper bioavailability, Environmental Pollution*

# Le Rhizotest





# Comparison DGT-Rhizotest



DGT = Capteur Passif  
Rhizotest = Capteur Actif

Fig. 5. Comparison of RHIZOtest ( $F_{RHIZ}$ ) and DGT ( $F_{DGT}$ ) Cu fluxes ( $n = 44$ ). Symbols with a white cross stand for the four additional, strongly acidic soil samples.

# Bioaccessibilité

Capacité d'un élément ou d'une molécule à être solubilisé par des liquides physiologiques pour être absorbé par la voie digestive. Pour les humains, le terme de bioaccessibilité orale, souvent utilisé, précise la voie d'exposition.

La méthode UBM ou BARGE (Unified Barge Method - BioAccessibility Research Group in Europe) simule la digestion dans l'estomac et l'intestin (phase gastrique ou gastro-intestinale)

=> Utilisation d'une solution gastrique ajoutée à une suspension de sol, dont le pH est ajusté à 1,2 par ajout d'HCl.

*Norme ISO 17924*

# Les organismes eux-mêmes

- Accumulation dans des végétaux
- Accumulation dans les escargots
  - Voie cutanée (contact sol)
  - Voie trophique



Si la contamination est trop élevée, des effets négatifs sur la biomasse peuvent intervenir et fausser les résultats

# Conclusion

- Quels sont les contaminants ?
- Quels sont les niveaux de contamination ?  
(quantification)
- Où sont localisés les métaux (localisation)?
- Quelles sont leurs formes chimiques (spéciation) ?
- Sont-ils disponibles pour les organismes vivants ?  
(biodisponibilité)