

## **Impact environnemental des corps gras et de leurs dérivés formulés ou non : biodégradabilité et écotoxicité**

Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Volume 10, Numéro 5-6, 348-53, Double 5-6, SEPTEMBRE-OCTOBRE-NOVEMBRE-DÉCEMBRE 2003, INNOVATION, RÉGLEMENTATION, ÉCOCOMPATIBILITÉ

**Auteur(s)** : Vincent BOUILLON , BfB Oil Research S.A. Parc scientifique CREALYS, Rue Phocas Lejeune, n° 10, B-5032 Gembloux, Belgique Tél. : + 32 81 58 53 00 - Fax. : + 32 81 58 53 08 <bfbskynet.be> .

**Author(s)** : Vincent BOUILLON

**Résumé** : Les risques encourus par l'environnement à cause de la libération d'un produit chimique particulier dépendent essentiellement du potentiel et de la durée d'exposition de ce produit à l'environnement et de sa toxicité. Les corps gras et leurs dérivés sont utilisés dans des domaines très variés tels que les lubrifiants, les solvants, les agents de surface, les détergents... L'impact environnemental de ces composés peut être mis en évidence par des essais normalisés de biodégradabilité et de toxicité. La biodégradabilité est évaluée par diverses mesures : disparition de la substance, évolution de la demande biochimique en oxygène (DBO), consommation d'oxygène, production de dioxyde de carbone et évolution de la composition gazeuse autour du phénomène de biodégradation. La toxicité est évaluée sur divers organismes tels que les bactéries, les algues, les crustacés, les poissons, les mammifères... L'ensemble de ces mesures, expliquées dans cet article, est d'autant plus important qu'il intervient dans les classifications, les réglementations et les ecolabels.

**Summary** : The risks caused by a chemical product spilled in the environment depend on the potential and duration of exposure of this product to the environment and its toxicity. The fats and their derivatives are used in fields like lubricants, solvents, surfactants, detergents... The environmental impact of these components can be underlined by biodegradability and toxicity normalised tests. The biodegradability evaluation is determined by different ways : substance disappearance, biochemical oxygen demand evolution (BOD), oxygen consumption, carbon dioxide release and gaseous composition evolution around the biodegradation process. Toxicity tests are performed on various organisms such as bacteria, algae, crustacean, fish, mammals... All those tests, reviewed in this article, are concerned by classifications, regulations and ecolabels.

**Mots-clés** : biodégradabilité, toxicité, essais normalisés, classifications, ecolabels.

**Keywords** : biodegradability, toxicity, normalised tests, regulation, ecolabel.

ARTICLE

**Auteur(s) :** Vincent BOUILLON

*BfB Oil Research S.A.*

*Parc scientifique CREALYS, Rue Phocas Lejeune, n° 10, B-5032 Gembloux, Belgique*

*Tél. : + 32 81 58 53 00 -*

*Fax. : + 32 81 58 53 08*

*bfb@skynet.be*

### **Tests de biodégradabilité et d'écotoxicité normalisés en vigueur**

Les dérivés oléochimiques des corps gras tels que les acides gras, les alcool gras, les esters d'acides gras et la glycérine sont utilisés dans des domaines industriels très variés tels que la pharmacie, la cosmétique, le textile, les détergents, les agents de surface, les solvants, les carburants, les lubrifiants... Leur impact sur l'environnement peut être mis en évidence par des essais normalisés de biodégradabilité et de toxicité.

### **Biodégradabilité**

La biodégradabilité est l'aptitude d'une matière organique à subir la biodégradation, c'est-à-dire la dégradation moléculaire en milieu généralement aqueux résultant des actions complexes de micro-organismes. Sous l'activité enzymatique de ces micro-organismes, une substance pourra subir la biodégradation en se transformant en métabolites et, *in fine*, en dioxyde de carbone et en eau. La biodégradabilité primaire est l'évaluation de la disparition de la substance en milieu généralement aqueux, dans des conditions définies par mesure de la quantité résiduelle ou perte des propriétés. La biodégradabilité totale ou ultime exprime le stade auquel la ou les molécule(s) sont totalement transformées soit en CO<sub>2</sub> (condition aérobie) ou en CH<sub>4</sub> (condition anaérobie), soit en constituant de la biomasse, soit en éléments minéraux (ex : minéralisation de l'azote organique en nitrate, ammonium...).

### **Mécanisme de la biodégradation aérobie**

La biodégradation aérobie des hydrocarbures est schématisée par le *tableau 1* Elle est initiée par la méthyloxydation de la longue chaîne hydrocarbonée. Elle subit ensuite la  $\beta$ -oxydation, voie métabolique classique de dégradation des acides gras en acide acétique (Ac. G pairs) ou propionique et acétique (Ac. G impairs). L'acide acétique est dégradé en CO<sub>2</sub> et en eau par le cycle de dégradation de l'acide citrique [1].

Plusieurs facteurs influencent la biodégradabilité (tableau 2) :

**Tableau 2.** Facteurs influençant la biodégradabilité

Effets positifs	Effets négatifs
Hydrocarbures à chaîne droite.	Hydrocarbures à chaîne ramifiée.
Hydrocarbures aliphatiques à chaîne courte (mais > à 6 ou 7 atomes de C).	Hydrocarbures aliphatiques à chaîne longue  (ou < à 6 ou 7 atomes de C).
Hydrocarbures saturés.	Hydrocarbures insaturés.
Hydrocarbures à bas poids moléculaire.	Hydrocarbures à haut poids moléculaire.
Absence de toxicité vis-à-vis des micro-organismes.	Toxicité vis-à-vis des micro-organismes.
Composés oxygénés.	Composés non oxygénés.
Mauvaise stabilité à l'hydrolyse.	Conditions ambiantes défavorables :
Conditions ambiantes favorables :	– température faible ;
– température élevée,	– pression élevée (profondeur) ;
– pression faible,	– milieu aqueux défavorable.
– milieu aqueux favorable.	
Faible tension interfaciale avec l'eau.	Forte tension interfaciale avec l'eau.
Efficacité des micro-organismes  (capacité enzymatique pour la substance à dégrader, adaptation des micro-organismes).	Faible capacité enzymatique des micro-organismes.

## ***Évaluation de la biodégradabilité [2]***

La biodégradabilité de substances dans l'eau ne dépend pas uniquement des structures moléculaires du matériau soumis à l'essai mais également de facteurs supplémentaires importants tels que :

- le milieu d'essai, aquatique ou terrestre,
- les conditions d'essai, aérobies ou anaérobies,
- l'origine et la concentration des micro-organismes de l'inoculum,
- l'acclimatation et l'adaptation de l'inoculum,
- la concentration du matériau d'essai,
- la disponibilité de substances nutritives inorganiques et d'autres matières organiques dans des processus métaboliques associés,
- l'existence possible d'effets toxiques du matériau d'essai dans les conditions d'essai,
- les propriétés physiques et chimiques et la biodisponibilité du matériau d'essai (par exemple, volatilité, solubilité dans l'eau, adsorption),
- les conditions et caractéristiques physiques et chimiques du système d'essai (volume des récipients d'essai, mode statique ou dynamique, fermeture des récipients, élimination du CO<sub>2</sub>, température, mélange, agitation, alimentation en oxygène),
- durée de l'essai,

Paramètres d'analyse utilisés (*tableau 3*) : sur ces principes, une multitude de méthodes existe tant au niveau national (AFNOR, ASTM) qu'international (CEC, EN, ISO, OCDE).

L'OCDE présente trois niveaux d'essais [3] :

- *la biodégradabilité immédiate (OECD 301)* : essais rigoureux dans lesquels la possibilité de biodégradation et d'acclimatation est limitée dans le temps. On peut affirmer qu'un produit chimique qui donne un résultat positif au cours d'un essai de ce type se biodégradera rapidement dans l'environnement et peut donc être classé comme « aisément biodégradable ». Un résultat doit être considéré comme positif si le « niveau seuil » de biodégradation atteint 60 % (DBO, CO<sub>2</sub>) ou 70 % (COD) et que celui-ci est atteint dans un intervalle de dix jours à partir du début de la biodégradation (quand elle dépasse un taux de 10 %). Un résultat négatif ne signifie pas nécessairement que le produit chimique ne sera pas biodégradé dans des conditions correspondant à celles de l'environnement, mais qu'il sera nécessaire de passer aux autres niveaux d'essais.
- *la biodégradabilité intrinsèque (OECD 302)* : essais qui permettent une exposition prolongée du composé étudié aux micro-organismes, une proportion plus favorable produit chimique/biomasse ou d'autres conditions favorisant la biodégradation. Un composé donnant un résultat positif dans un essai de ce type peut être classé comme « intrinsèquement biodégradable », mais, à cause des conditions favorables employées, on ne peut être sûr que sa biodégradation soit rapide et sûre dans l'environnement.

– les essais de simulation (OECD 303) : essais qui fournissent une idée du taux de biodégradation dans des conditions d'environnement bien déterminées. Les essais de ce genre peuvent être subdivisés selon le type d'environnement qu'ils sont destinés à simuler : a) traitement biologique (aérobie) ; b) traitement biologique (anaérobie) ; c) rivière ; d) lac ; e) estuaire ; f) mer ; et g) sol.

#### **Diverses méthodes de biodégradabilité [4]**

Les tableaux 4, 5 et 6 reprennent les références normatives, les domaines d'application, les méthodes analytiques et les principes pour les différents essais.

**Tableau 4.** Références normatives, domaines d'applications et principes des méthodes d'analyse de la biodégradabilité

Références normatives	Méthode analytique	Application (1)	Principe de la méthode
OECD 301 A NF T 90-312 ISO 7827	Diminution COD	Produits solubles, non volatils, et non absorbables significativement	Suivi du COD après 3, 7, 14 et 28 jours. Biodégradabilité = % perte de COD. Mesure du COD : analyseur de carbone
OECD 301 B NF T 90-306 ISO 9439 EN 29439 ASTM D 5864	Production de CO2 Essai Sturm modifié	Produits solubles, insolubles et non volatils	Suivi du CO2 produit par la biodégradation. Piégeage du CO2 dans une solution de Ba(OH) <sub>2</sub> $Ba(OH)_2_{excès} + CO_2 \rightarrow BaCO_3 + H_2O + Ba(OH)_2$ $Ba(OH)_2 + 2HCl \rightarrow BaCl_2 + 2H_2O$ à Dosage par titration acide-base colorimétrique avec phénolphthaléine comme indicateur. Titration tous les 2-3 jours. Résultat : % par rapport au CO2 théorique. Calculé sur base du COT de l'échantillon et de la masse introduite pour l'essai.

(1) Les substances ne doivent pas avoir d'effet inhibiteur à la concentration d'essai vis-à-vis des bactéries.

**Tableau 5. Références normatives, domaines d'applications et principes des méthodes d'analyse de la biodégradabilité**

Références normatives	Méthode analytique	Application (1)	Principe de la méthode
OECD 301 C	Consommation d'O <sub>2</sub> Essai MITI	Produits solubles, insolubles et volatils (C eau/C air ≥ 1)	<p>Mesure du rapport de la demande biologique en O<sub>2</sub> (DBO) et de la demande chimique en O<sub>2</sub> (DCO ou DThO).</p> <p><b>DBO</b> : quantité d'O<sub>2</sub> consommée lors de l'oxydation biochimique des matières organiques présentes dans l'eau dans des conditions bien déterminées (mg O<sub>2</sub>/l). Elle se mesure :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- par différence de pression à volume constant ;</li> <li>- par différence de volume à pression constante ;</li> <li>- par coulométrie.</li> </ul> <p><b>DCO</b> : quantité d'O<sub>2</sub> consommée par oxydation des matières organiques sous l'action d'un oxydant énergétique (K<sub>2</sub>CrO<sub>7</sub> en solution à 80 % dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en présence de Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) comme catalyseur.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Respiromètre en circuit fermé.</li> <li>- L'absorption d'O<sub>2</sub> est enregistrée en continu.</li> <li>- Résultat : % de la DBO par rapport à la DCO ou la DTh O (demande théorique en oxygène).</li> </ul>

(1) Les substances ne doivent pas avoir d'effet inhibiteur à la concentration d'essai vis-à-vis des bactéries.

**Tableau 6.** Références normatives, domaines d'applications et principes des méthodes d'analyse de la biodégradabilité.

Références normatives	Méthode analytique	Application (1)	Principe de la méthode
OECD 301 D ISO 10707	Oxygène dissous  Essai en fiole fermée	Composés solubles, insolubles et volatils	Essai en fiole fermée complètement remplie. <ul style="list-style-type: none"> <li>Mesure de la DCO ou calcul de la DThO.</li> <li>Mesure de la DBO : <ul style="list-style-type: none"> <li>– dosage de l'O<sub>2</sub> dissous par méthode iodométrique ;</li> <li>– dosage de l'O<sub>2</sub> dissous par méthode à l'électrode.</li> </ul> </li> </ul> Résultat : % de la DBO par rapport à la DThO ou DCO
OECD 301 E	Diminution COD	Produits solubles, non volatils et non absorbables significativement	Similaire à la méthode OECD 301 A. Essai effectué sur des concentrations plus faibles en micro organismes (0,5 ml d'inoculum par litre). $\text{Biodégradabilité} = \frac{\text{COD}_{j0} - \text{COD}_{j28}}{\text{COD}_{j0}}$
OECD 301 F NF T 90-309 ISO 9408 EN 29408	Consommation O <sub>2</sub>	Produits solubles, insolubles, volatils si respiromètre approprié et ne réagissant pas avec le réactif absorbant le CO <sub>2</sub> .	Mesure de la demande en oxygène dans un respiromètre fermé. <ul style="list-style-type: none"> <li>Régénération de l'O<sub>2</sub> par électrolyse pour maintenir un volume gazeux constant.</li> <li>Suivi des variations du volume.</li> <li>Suivi des variations de pression.</li> </ul> Résultat : rapport de la quantité d'oxygène consommé sur la DThO ou de la DCO.

(1) Les substances ne doivent pas avoir d'effet inhibiteur à la concentration d'essai vis-à-vis des bactéries..

La courbe de dégradation présente dans certains cas une période d'adaptation pendant laquelle la substance ne se dégrade que faiblement. Ensuite vient une période de croissance exponentielle pour atteindre un plateau correspondant au taux de dégradation maximal. Le graphique permet également la visualisation de la fenêtre de temps (10 jours) (figure 2).

## Toxicité

Afin d'évaluer correctement les dangers d'un produit chimique particulier pour l'environnement, il est nécessaire de disposer d'informations concernant son exposition et son temps d'exposition (biodégradabilité), de son potentiel de bioaccumulation, mais également de sa toxicité et de celle des sous-produits de sa dégradation. Parmi l'éventail des essais de toxicité, les principaux qui tentent de prévoir qu'une substance est écocompatibles sont ceux effectués sur les bactéries, les algues, les daphnies, les poissons et les rats, et dont les références normatives sont mentionnées dans les tableaux 7 et 8.

**Tableau 7.** Références normatives des essais de mesures de l'écotoxicité

Toxicité aquatique (aiguë)	OECD	ISO	EN	NF
Algues ( <i>Selenastrum capricornutum</i> )	201	8692	28692	T90-304
Daphnies ( <i>Daphnia magna</i> ou <i>pulex</i> )	202	6341	ISO 6341	T-90-301
Poissons ( <i>Brachydanio rerio</i> )	203	7346-1	ISO 7346-1	T 90-303-1
Toxicité dans le sol				
Vers de terre ( <i>Esenia fetida</i> )	207	11268-1		X31-251
Plantes terrestres (inhibition de croissance)	208	11269-2		X 31-201
Toxicité sur bactéries				
<i>Pseudomonas putida</i> (inhibition de la croissance)		10712		T 90-342
Toxicité				
Rats	401			
Irritation de la peau	404			
Irritation des yeux	405			
Sensibilité de la peau	406			

Divers modes de préparation peuvent être mis en application selon que le produit chimique particulier est soluble dans l'eau ou non. Dans le premier cas, une solution mère est préparée avec la substance à étudier dans le milieu d'essai, et des dilutions successives sont effectuées de manière à obtenir une



série géométrique de données permettant d'évaluer la concentration qui tue (poissons), immobilise (daphnies) ou inhibe la croissance (algues) de 50 % des organismes mis en expérimentation. L'évaluation des risques écotoxicologiques des substances faiblement solubles dans l'eau est nettement plus délicate et dépend surtout du mode de préparation. L'extraction selon la méthode ASTM D 6081 (*figure 3*) consiste en une agitation magnétique modérée provoquant un vortex sur 10-35 % de la hauteur totale du liquide, suivi d'une phase d'équilibre et d'un prélèvement de la phase aqueuse correspondant à la partie extractible de la substance (*Water accomodated fraction*). Dans le cas de la détermination de l'inhibition de croissance des algues par mesure indirecte telle que la variation de la densité optique, il est nécessaire d'effectuer une étape supplémentaire de centrifugation ou de filtration pour obtenir la fraction soluble dans l'eau (*Water soluble fraction*) (*figure 3*).

Les résultats des essais obtenus par la méthode de préparation décrite ci-dessus doivent être exprimés précédés de WAF ou WSF. Ce mode de préparation est admis pour la détermination de la classification allemande des substances dangereuses pour l'eau (WGK) ainsi que pour les écolabels tels que le cygne blanc, l'ange bleu... Il est toutefois important de stipuler que les essais qui doivent être effectués pour répondre à une directive européenne [5] ne peuvent avoir recours à ce mode de préparation. En effet, en exprimant les résultats d'essais selon WAF ou WSF, nous ne connaissons pas la concentration réelle du ou des soluté(s) dans la phase aqueuse. Les solutions mères de substance à faible hydrosolubilité peuvent être préparées par dispersion ultrasonique ou, si nécessaire, en recourant à des solvants organiques, des émulsifiants ou des dispersants. Lorsqu'on utilise ce type de produit auxiliaire, les organismes témoins doivent être exposés à la même concentration en produit auxiliaire qu'à celle présente dans la concentration maximale de la substance d'essai. La concentration de ces produits auxiliaires ne devrait pas dépasser 0,1 g/L. En outre, il est important de vérifier la stabilité des solutions ainsi que les critères de validité des essais avec ces produits auxiliaires (*tableaux 7 et 8*).

**Tableau 8.** *Références normatives des essais de toxicité*

Norme	Organisme	Principe de l'essai	Conditions d'essai	Validité	Résultat
ISO 8692 OECD 201	Algues – Selenastrum capricornutum – Scedesmus subspicatus	Détermination de la concentration qui provoque une diminution de 50 % du taux de croissance par rapport aux cultures témoins réalisées dans des conditions identiques. Mesure de la concentration cellulaire (compte-particule ou microscope à chambre de comptage, spectromètre, turbidimètre, ...)	72 h à 23 °C	– Concentration cellulaire × 16 en 72 h – Variation pH : max 1,5	CE <sub>50</sub> (0 à 72 h)
ISO 6341 OECD	Daphnies – Daphnia	Détermination de la concentration qui provoque en 24 heures et en 48 heures 50 %	48 h à 20 °C	– min. 2 mg O <sub>2</sub> /l – max. 10 % immobilisation du	CE <sub>50</sub> -48 h

202	magna	d'immobilisation des daphnies mises en expérimentation.		témoin – CE50i– 24 h du K2 Cr2 O7 compris entre 0,6 mg/l et 1,7 mg/l.	
ISO 7346-1 OECD 203	Poissons – Brachidanio rerio	Détermination des concentrations auxquelles une substance est létale pour 50 % d'une population d'essai de Brachidanio rerio après 24, 48, 72 et 96 heures.	96 h à 23 °C	– Concentration en O2 dissous doit être min égale à 60 % de la valeur de saturation dans l'air. – Max 10 % de mortalité et/ou comportement anormal du témoin	CL50-96 h
OECD 401	Rats	Administration par voie orale d'une ou de plusieurs doses d'une substance au cours d'une période de 24 heures. Observation des effets et détermination de la DL50.	14 jours à 22 °C		DL50

## Conclusion

L'éventail des essais de biodégradabilité et d'écotoxicité est une partie de l'évaluation du risque ; de nombreux autres paramètres doivent être pris en considération tels que l'exposition (quantité de produit, conditionnement, stockage, élimination...), les caractéristiques physico-chimiques, le potentiel de bio-accumulation... Les formulations futures des divers produits devront non seulement répondre à des caractéristiques de performances techniques parfois sévères mais également avoir un impact le plus faible possible sur l'environnement. Tous les efforts visant à l'élaboration de produits plus respectueux de l'environnement doivent être envisagés, et l'incorporation des corps gras et de leurs dérivés dans les formulations est à promouvoir.

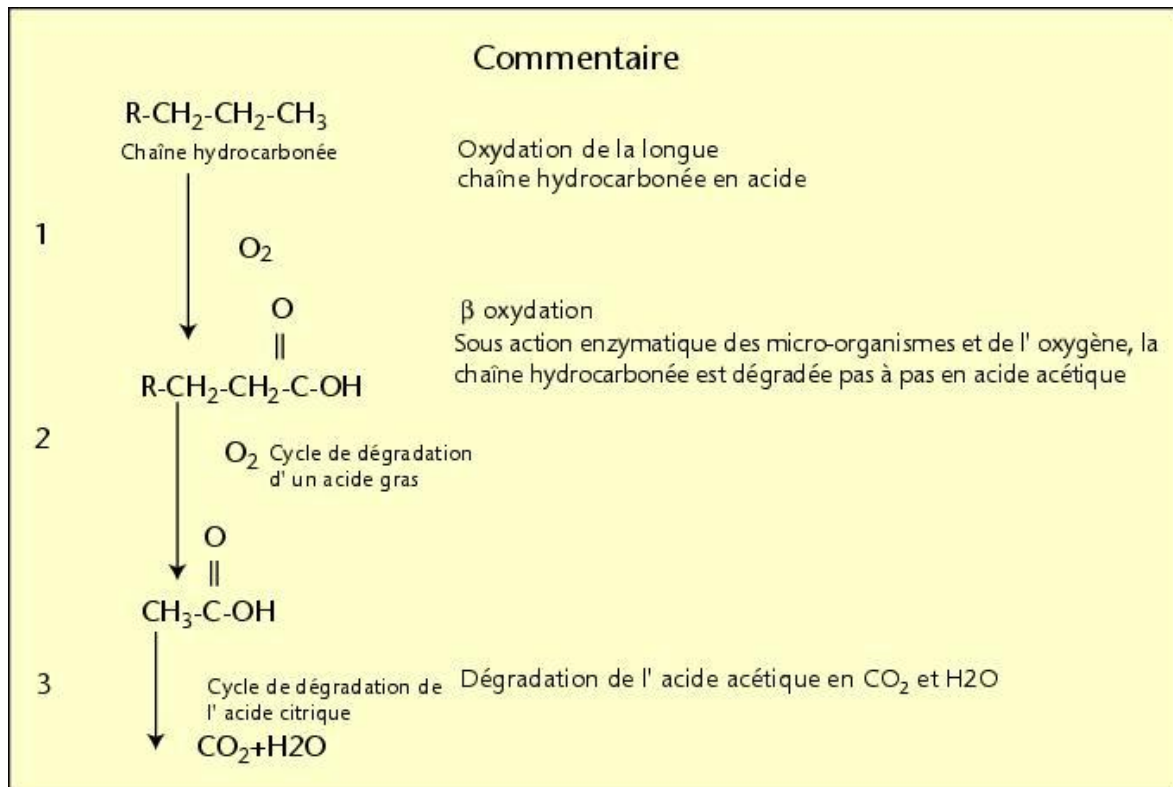
## RÉFÉRENCES

1. STRYER L. (1981). Citric acid cycle. *Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> ed., ch. 13, 283-302.
2. ISO/TC 147 (1997). Qualité de l'eau – Sélection d'essais de biodégradabilité. ISO/TR 15462.
3. OCDE (2001). Les lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. ISBN 92-64-24018-7 Section 3 : Dégradation et accumulation.

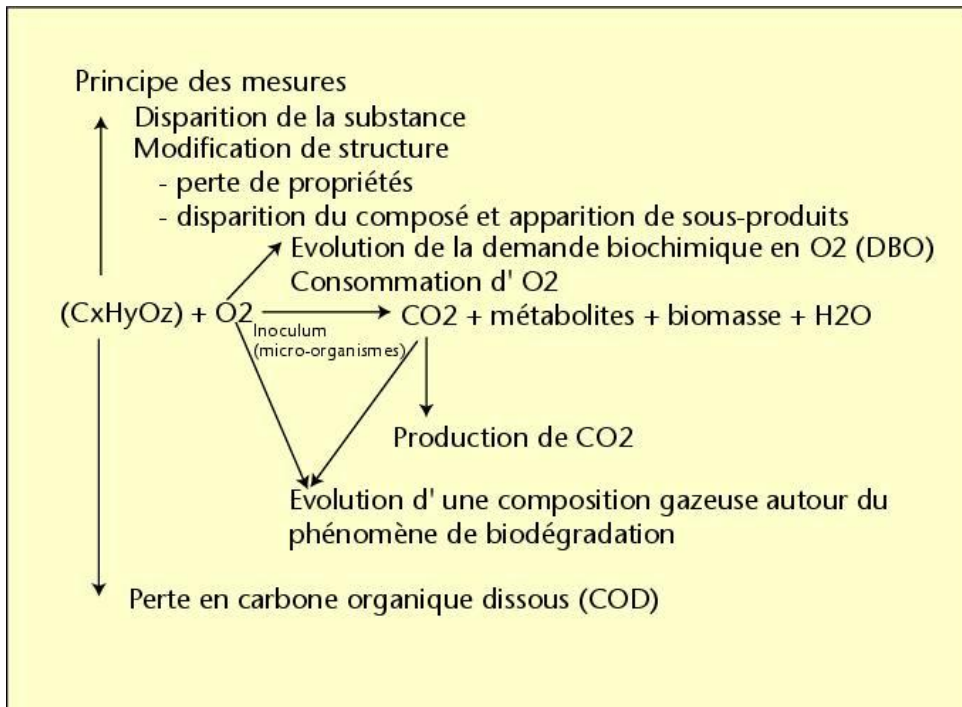
4. Van Dievoet F. (1991). Biodegradability : an overview of existing methods. Congrès international sur les lubrifiants de l'avenir et l'environnement, Bruxelles, 295-319.

5. Commission européenne (1997). La classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses dans l'union européenne, Partie II – Méthodes d'essai. ISBN 92-828-0077-6. N

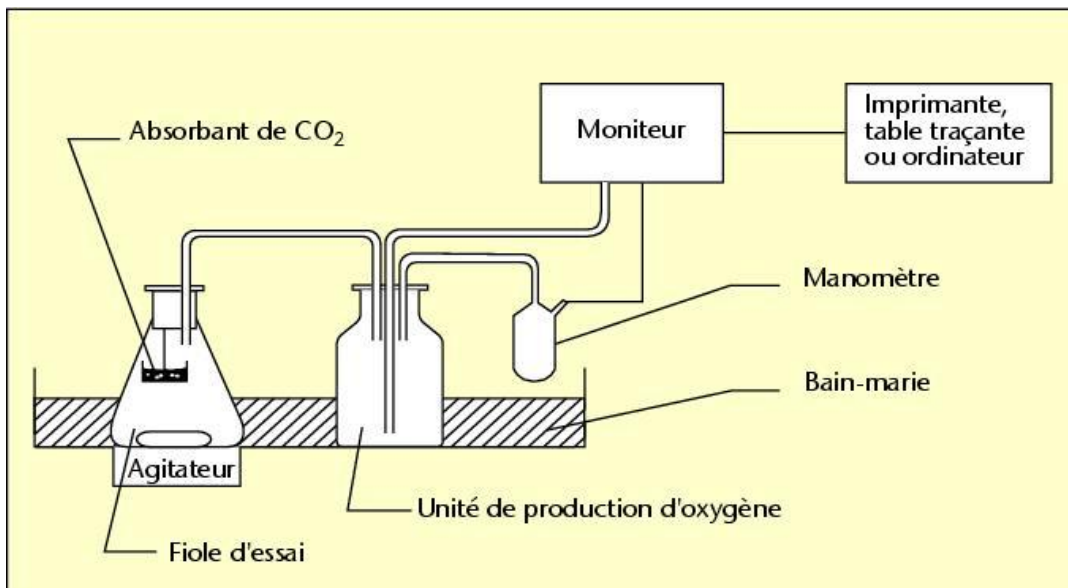
### Illustrations



**Tableau 1.** Biodégradation aérobie des hydrocarbures



**Tableau 3.** Paramètres utilisés pour l'évaluation de la biodégradabilité



**Figure 1.** Schéma de respiromètre fermé selon ISO 9408.

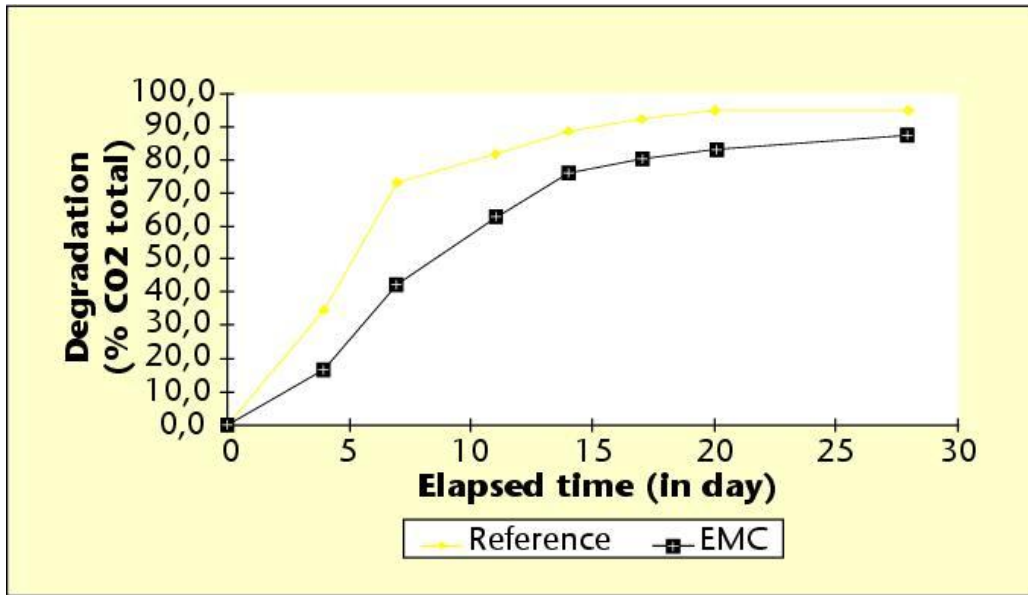


Figure 2. Mesure de la biodégradabilité de l'ester méthylique de colza selon la référence OECD 301B.

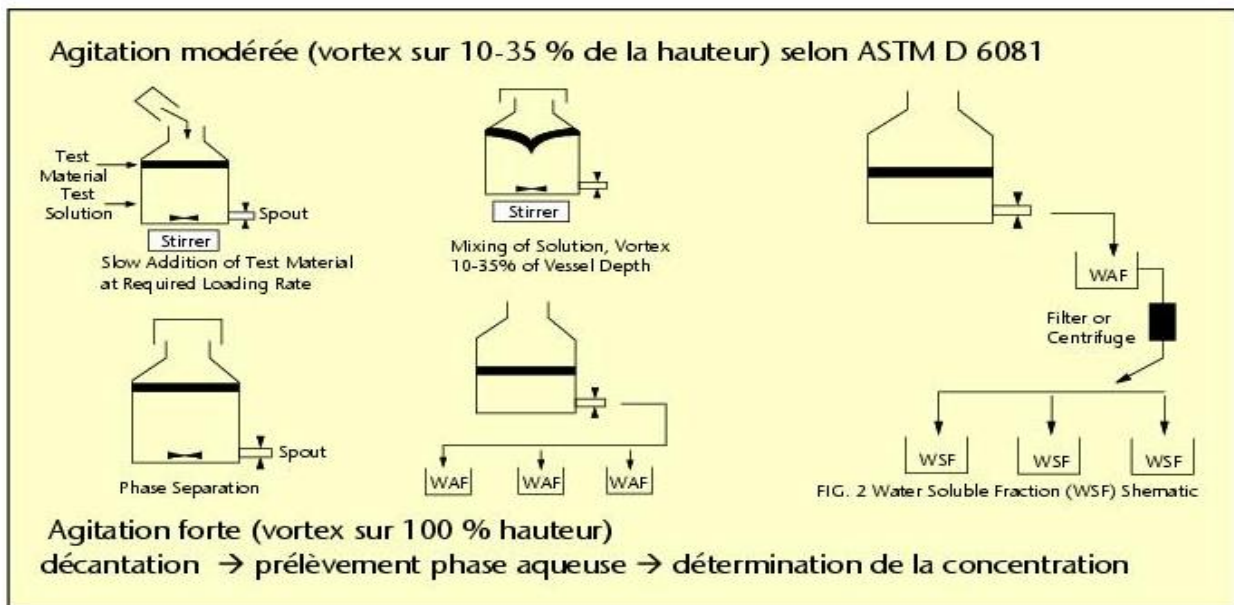


Figure 3. Extraction selon la méthode ASTM D 6081.