REMPLACEMENT 2015
Métropole

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR AGRICOLE
EPREUVE E7-1
ANALYSES ET CONTRÔLES

Option : ANABIOTEC

Durée : 3 heures

Matériel(s) et document(s) autorisé(s) : **Calculatrice**

Le sujet comporte 15 pages

PARTIE 1 : DEMANDE CHIMIQUE EN OXYGENE ..... **9,5 points**
PARTIE 2 : DOSAGE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCLIQUES (HAP) DANS LES BOUES ISSUES DE LA STATION ……..... **7,5 points**
PARTIE 3 : RECHERCHE DES SALMONELLA DANS LES BOUES DESTINEES A L'EPANDAGE …….. **3 points**

SUJET

Contrôle de l'efficacité d'une station d'épuration

Une communauté de communes a construit une nouvelle station d'épuration (STEP) pour faire face à l'augmentation de sa population et à celle de l'activité industrielle, notamment agroalimentaire. Cette STEP fonctionne suivant le principe des boues activées.

Afin de suivre l'efficacité du traitement réalisé, elle s'est dotée d'un laboratoire permettant de réaliser les analyses courantes en particulier la demande chimique en oxygène (DCO).

Cette STEP souhaiterait valoriser ses boues d'épuration pour l'épandage agricole. Afin de répondre aux exigences réglementaires concernant l'épandage des boues, elle vient d'acquérir un module HPLC afin d'identifier et de doser les hydrocarbures aromatiques (HAP) susceptibles d'être présents dans les boues, et réalise les analyses microbiologiques exigées.

PARTIE 1

Demande chimique en oxygène (DCO)

Le laboratoire de la STEP utilise la méthode de référence décrite par la norme NF T 90-101 de février 2001 pour mesurer la DCO en entrée et sortie de station d'épuration.
L'article 35 de l'arrêté du 26/03/2012 précise la valeur limite de la DCO autorisée dans les eaux de rejet soit 300 mg L^{-1}.

Le **document 1** présente un extrait de la norme NF T 90-101 concernant le dosage de la DCO.

1. A partir du **document 1**, identifier les dangers potentiels pour le manipulateur et l'environnement et proposer les démarches préventives à associer en face de chaque danger.

2. Cette station d'épuration de 35 000 équivalents habitant traite quotidiennement des eaux résiduaires dont la charge moyenne est comprise entre 1 500 et 2 000 mg L^{-1} de DCO.

Préciser et justifier la nature des traitements éventuels à réaliser sur les échantillons d'eau prélevés en entrée et en sortie de la station.

3. Afin de valider les conditions opératoires, il est nécessaire de réaliser le dosage sur un témoin de concentration connue et un essai à blanc. Justifier l'utilisation de ces contrôles.

4. Une solution témoin à 100 mg.L^{-1} a été analysée. Les résultats obtenus (**document 2**) permettent de valider l'analyse. Justifier.

5. Afin de tester la répétabilité et la justesse de la méthode d'analyse de la DCO au sein du laboratoire, un technicien réalise 10 répétitions de l'analyse de la solution témoin, à 100 mg.L^{-1}. Les résultats obtenus dans des conditions de répétabilité exprimés en mg.L^{-1} sont les suivants :

Mesure numéro :	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Valeurs en mg.L^{-1}	95	110	95	90	122	104	96	102	96	108

5.1. On suppose que la variable aléatoire qui, à chaque analyse associe la DCO en mg.L^{-1}, est distribuée suivant une loi normale. Classer les valeurs par ordre croissant. L'une des valeurs semble aberrante. On décide de tester si cette valeur peut être considérée comme telle. Le test retenu est un test de Dixon au seuil de risque α = 0,05.

On nomme x_i la valeur de rang i dans la série ordonnée.

Calculer $r_{obs} = \dfrac{x_n - x_{n-1}}{x_n - x_1}$

En utilisant le **document 3**, effectuer un test de Dixon et conclure.

5.2. Répétabilité de la méthode d'analyse de la DCO.

D'après la législation, la norme NF T 90-101 de février 2001 stipule que la variance des valeurs obtenues ne doit pas dépasser 81 mg².L^{-2}.

5.2.1. On admet que parmi les dix analyses, il n'y a pas de valeurs aberrantes. On conserve donc toutes les valeurs. Calculer la variance s² de la série statistique ci-dessus.

5.2.2. L'objectif est de déterminer si la législation est respectée, à l'aide d'un test statistique. On retient un seuil de risque α = 0,05.

5.2.2.1. Déterminer l'hypothèse H_0 et l'hypothèse alternative H_1.

5.2.2.2. On admet que la variable de décision $K=\dfrac{nS^2}{\sigma^2}$ est distribuée

selon la loi du khi2 à n-1 degrés de liberté (**Document 4**).

Mettre en œuvre le test en précisant la règle de décision, les calculs et l'interprétation.

PARTIE 2

Dosage des hydrocarbures aromatiques polycliques (HAP) dans les boues issues de la station

Le technicien de la STEP souhaite adapter la norme AFNOR XP X33-012 de mars 2000 aux contraintes du laboratoire. Les HAP sont des contaminants d'origine naturelle ou anthropique issus de combustions incomplètes. Ce sont des composés organiques apolaires.

Parmi les 16 HAP principaux (**document 5**), l'arrêté du 8 janvier 1998 sur l'épandage des boues de STEP fixe des valeurs maximum admissibles pour 3 d'entre eux : le fluoranthène, le benzo(b)fluoranthène et le benzo(a)pyrène :

Composés	Valeur limite (mg/kg MS) dans les boues
Fluoranthène	5
Benzo(b)fluoranthène	2,5
Benzo(a)pyrène	2

MS = matière sèche

6. Etude des conditions opératoires de la chromatographie.

La dernière étape de l'analyse est réalisée dans les conditions suivantes :

- Colonne apolaire de type C_{18} (Nucléosil C18 RP18).
- Composition de la phase mobile :
  - 0 à 5 min : 50 % d'eau et 50 % d'acétonitrile
  - 5 à 35 min : variation linéaire des % d'eau et d'acétonitrile pour atteindre 100 % d'acétonitrile à t = 35 min
  - 35 à 45 min : 100 % d'acétonitrile
- Détecteur de fluorescence.
- Volume injecté : 10 µL.

6.1. Une colonne Nucléosil C18 RP18 a été retenue. Expliquer en quoi le choix de cette colonne est judicieux (**document 6**)

6.2. D'après la structure chimique des HAP, justifier le choix d'un détecteur de fluorescence. Présenter un avantage de ce type de détecteur par rapport au spectrophotomètre UV/visible

6.3. Deux modes d'élution isocratiques à base d'acétonitrile (solvant apolaire) sont testés :

- 1er mode isocratique : de 0 à 45 min, 50 % d'eau et 50 % d'acétonitrile,
- 2ème mode isocratique : de 0 à 45 min, 100 % d'acétonitrile.

A partir des deux chromatogrammes obtenus (**document 7**), choisir le mode d'élution pour optimiser l'analyse en argumentant la réponse.

6.4. Présenter les différentes étapes à mettre en œuvre pour réaliser le dosage des 3 HAP par HPLC dans les boues depuis le prélèvement jusqu'à l'analyse des résultats.

6.5 Justifier l'utilisation d'un étalon interne dans le cadre de ce dosage.

PARTIE 3

Recherche des *Salmonella* dans les boues destinées à l'épandage

Pour pouvoir utiliser les boues produites pour l'épandage agricole, la STEP recherche la présence de germes pathogènes dont *Salmonella*. La prescription NFU 44-05 indique les valeurs limites suivantes :

	Toutes cultures sauf cultures maraîchères	**Cultures maraîchères**	**Méthodes d'analyse**
Salmonella	Absence dans 1 g	Absence dans 25 g	NF V 08-052 ; NF EN ISO 6579

La recherche de *Salmonella* se fait en suivant la méthode de référence (**document 8**), cependant le laboratoire désire mettre en place une méthode alternative (**document 9**).

7. D'après le tableau ci-dessus, préciser le type d'analyse à effectuer et son intérêt.

8. La méthode de référence implique différentes étapes. Justifier de la nécessité des deux étapes d'enrichissement.

9. A partir des **documents 8 et 9**, indiquer les avantages de cette méthode alternative par rapport à la méthode de référence.

DOCUMENT 1

Extrait de la norme NF T 90-101

1. Domaine d'application

Cette méthode est applicable à des eaux dont la DCO, après une dilution éventuelle, est comprise entre 30 et 700 mg.L-1

2. Réactifs

- acide sulfurique concentré (ρ = 1,83 g/mL) + sulfate d'argent (10 g/L) ;
- solution de sulfate de fer (II) et d'ammonium $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2,6H_2O$ à 0,12 mol/L ;
- solution étalon de dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) à 0,040 mol/L contenant le sulfate de mercure II

3. Mode opératoire

3.1. Prise d'essai

Homogénéiser l'échantillon et le diluer, si nécessaire, de manière à ramener la DCO à une valeur <700mg.L-1 .

Introduire 10,0 mL de l'échantillon (ou de sa dilution) dans un tube de minéralisation, préalablement rincé à l'eau déminéralisée. Si aucun pipetage n'est possible (trop de MES), procéder par pesée.

Ajouter 5,0 mL de la solution de dichromate de potassium à 0,040 mol/L et quelques billes de verre afin de réguler l'ébullition.

Ajouter avec précaution 15 mL d'acide sulfurique-sulfate d'argent en agitant soigneusement le tube d'un mouvement circulaire et en le refroidissant sous l'eau courante de façon à limiter toute perte de substances organiques volatiles.

Relier le tube au réfrigérant et porter à ébullition à reflux pendant 2 h. Le mélange réactionnel doit bouillir doucement. Une surchauffe locale de la solution peut conduire à des résultats erronés.

Laisser refroidir et laver la paroi interne du réfrigérant à l'eau déminéralisée en recueillant les eaux de lavage dans le tube (utiliser environ 15 mL d'eau).

Débrancher le tube du réfrigérant. Transvaser quantitativement son contenu dans une fiole conique de 250 mL (rincer le tube en 3 fois en utilisant au total environ 30 mL d'eau déminéralisée). Refroidir à température ambiante.

Ajouter 3 gouttes de ferroïne et un barreau aimanté et placer la fiole sur un agitateur magnétique.

Titrer l'excès de dichromate avec la solution de sulfate de fer (II) et d'ammonium. Le point de virage correspond au changement brusque de couleur du bleu-vert au brun-rouge, même si le bleu-vert réapparaît au bout de quelques minutes.

3.2. Essai à blanc

Effectuer un essai à blanc en suivant le même mode opératoire que pour l'essai, mais en remplaçant la prise d'essai par 10 mL d'eau déminéralisée. Une consommation de la solution de dichromate de potassium supérieure à 0,5 mL indique un problème (propreté de la verrerie, impuretés dans les réactifs…).

3.3. Essai témoin

La validité de la technique, de même que la pureté des réactifs et la propreté de la verrerie, doit être régulièrement vérifiée par analyse de 10,0 mL d'une solution étalon à 100 $mg.L^{-1}$, en suivant le même mode opératoire que pour la prise d'essai.
La qualité de l'analyse est considérée comme satisfaisante si on obtient une valeur de 100 $mg.L^{-1}$ ± 18 $mg.L^{-1}$.

4. Dosage de la solution de fer (II) et d'ammonium

Cette solution doit être étalonnée quotidiennement. Diluer 5,0 mL de la solution étalon de dichromate de potassium à environ 50 mL avec de l'acide sulfurique à 4 mol/L. Titrer avec la solution de sulfate de fer (II) et d'ammonium, en présence de 6 gouttes de ferroïne.

La concentration, c, exprimée en moles par litre de la solution de sulfate de fer (II) et d'ammonium est donnée par la formule :

c (en mol/L) = 1,2 / VFe^{2+} où VFe^{2+} est le volume, en mL, de solution de sulfate de fer (II) et d'ammonium consommé.

5. Détermination de la DCO

DCO (en $mg.L^{-1}$) = 8000 c ($V_1 – V_2$) / V_0

où :
c représente la concentration, en mol/L, de la solution de sulfate de fer (II) et d'ammonium ;
V_1 , le volume, en mL, de la solution de sulfate de fer (II) et d'ammonium utilisé pour l'essai à blanc ;
V_2, le volume, en mL, de la solution de sulfate de fer (II) et d'ammonium utilisé pour la détermination ;
V_0, le volume, en mL, de la prise d'essai avant dilution éventuelle.

Exprimer le résultat, sans chiffre après la virgule, avec 3 chiffres significatifs maximum.

6. Pictogrammes des solutions utilisées

Acide sulfurique

Sulfate de mercure

Sulfate d'argent

Sulfate de fer et d'ammonium

Dichromate de potassium

DOCUMENT 2

Résultats du dosage de la solution témoin à 100 mg L^{-1}

Etalonnage de la solution de sel de Mohr (sulfate de fer (II) et d'ammonium)

Volume de solution de $K_2Cr_2O_7$: 5,0 mL ; chute de burette : 10,55 mL

Essai à blanc

Volume d'eau déminéralisée : 10 mL ; chute de burette : 10,10 mL

Essai témoin

Volume de solution témoin : 10 mL ; chute de burette : 8,85 mL

DOCUMENT 3

Test de dixon

Table de la loi de Dixon. Valeurs de .

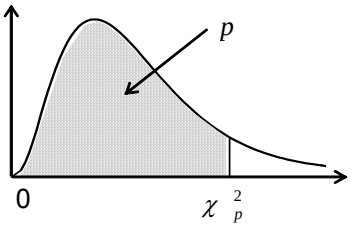
	0,01	**0,05**
3	0,988	0,941
4	0,889	0,765
5	0,780	0,642
6	0,698	0,560
7	0,637	0,507
8	0,590	0,468
9	0,555	0,437
10	0,527	0,412
11	0,745	0,637
12	0,704	0,600
13	0,670	0,570
14	0,641	0,546
15	0,616	0,525
16	0,595	0,507
17	0,577	0,490
18	0,561	0,475
19	0,547	0,462
20	0,535	0,450
21	0,524	0,440
22	0,514	0,430
23	0,505	0,421
24	0,497	0,413
25	0,489	0,406
26	0,486	0,399
27	0,475	0,393
28	0,469	0,387
29	0,463	0,381
30	0,457	0,376

DOCUMENT 4

Table du KHI2

Fonction de répartition d'une variable du Khi2 à k degrés de liberté

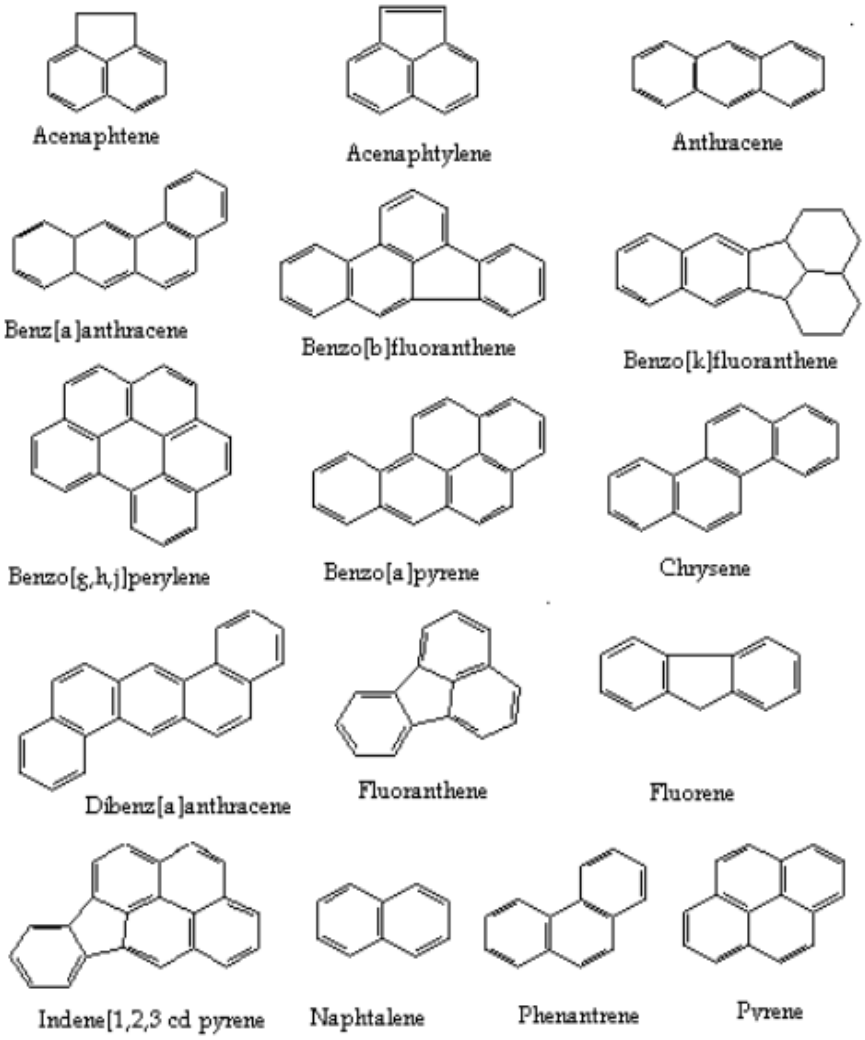
Valeurs χ^2_p telles que $\text{Prob}(\chi^2 \leq \chi^2_p) = p$



k \ p	0,005	0,010	0,025	0,050	0,100	0,900	0,950	0,975	0,990	0,995
1	0,000	0,000	0,001	0,004	0,02	2,71	3,84	5,02	6,63	7,88
2	0,01	0,02	0,05	0,10	0,21	4,61	5,99	7,38	9,21	10,60
3	0,07	0,11	0,22	0,35	0,58	6,25	7,81	9,35	11,34	12,84
4	0,21	0,30	0,48	0,71	1,06	7,78	9,49	11,14	13,28	14,86
5	0,41	0,55	0,83	1,15	1,61	9,24	11,07	12,83	15,09	16,75
6	0,68	0,87	1,24	1,64	2,20	10,64	12,59	14,45	16,81	18,55
7	0,99	1,24	1,69	2,17	2,83	12,02	14,07	16,01	18,48	20,28
8	1,34	1,65	2,18	2,73	3,49	13,36	15,51	17,53	20,09	21,95
9	1,73	2,09	2,70	3,33	4,17	14,68	16,92	19,02	21,67	23,59
10	2,16	2,56	3,25	3,94	4,87	15,99	18,31	20,48	23,21	25,19
11	2,60	3,05	3,82	4,57	5,58	17,28	19,68	21,92	24,73	26,76
12	3,07	3,57	4,40	5,23	6,30	18,55	21,03	23,34	26,22	28,30
13	3,57	4,11	5,01	5,89	7,04	19,81	22,36	24,74	27,69	29,82
14	4,07	4,66	5,63	6,57	7,79	21,06	23,68	26,12	29,14	31,32
15	4,60	5,23	6,26	7,26	8,55	22,31	25,00	27,49	30,58	32,80
16	5,14	5,81	6,91	7,96	9,31	23,54	26,30	28,85	32,00	34,27
17	5,70	6,41	7,56	8,67	10,09	24,77	27,59	30,19	33,41	35,72
18	6,26	7,01	8,23	9,39	10,86	25,99	28,87	31,53	34,81	37,16
19	6,84	7,63	8,91	10,12	11,65	27,20	30,14	32,85	36,19	38,58
20	7,43	8,26	9,59	10,85	12,44	28,41	31,41	34,17	37,57	40,00
21	8,03	8,90	10,28	11,59	13,24	29,62	32,67	35,48	38,93	41,40
22	8,64	9,54	10,98	12,34	14,04	30,81	33,92	36,78	40,29	42,80
23	9,26	10,20	11,69	13,09	14,85	32,01	35,17	38,08	41,64	44,18
24	9,89	10,86	12,40	13,85	15,66	33,20	36,42	39,36	42,98	45,56
25	10,52	11,52	13,12	14,61	16,47	34,38	37,65	40,65	44,31	46,93
26	11,16	12,20	13,84	15,38	17,29	35,56	38,89	41,92	45,64	48,29
27	11,81	12,88	14,57	16,15	18,11	36,74	40,11	43,19	46,96	49,65
28	12,46	13,56	15,31	16,93	18,94	37,92	41,34	44,46	48,28	50,99
29	13,12	14,26	16,05	17,71	19,77	39,09	42,56	45,72	49,59	52,34
30	13,79	14,95	16,79	18,49	20,60	40,26	43,77	46,98	50,89	53,67
35	17,19	18,51	20,57	22,47	24,80	46,06	49,80	53,20	57,34	60,27
40	20,71	22,16	24,43	26,51	29,05	51,81	55,76	59,34	63,69	66,77
45	24,31	25,90	28,37	30,61	33,35	57,51	61,66	65,41	69,96	73,17
50	27,99	29,71	32,36	34,76	37,69	63,17	67,50	71,42	76,15	79,49
60	35,53	37,48	40,48	43,19	46,46	74,40	79,08	83,30	88,38	91,95
70	43,28	45,44	48,76	51,74	55,33	85,53	90,53	95,02	100,43	104,21
80	51,17	53,54	57,15	60,39	64,28	96,58	101,88	106,63	112,33	116,32
90	59,20	61,75	65,65	69,13	73,29	107,57	113,15	118,14	124,12	128,30
100	67,33	70,06	74,22	77,93	82,36	118,50	124,34	129,56	135,81	140,17

DOCUMENT 5

Structure chimique des 16 principaux HAP



(extrait de www.intechopen.com/books/air-pollution/polycyclic-aromatic-hydrocarbons-in-the-urban-atmosphere-of-mexico-city)

DOCUMENT 6

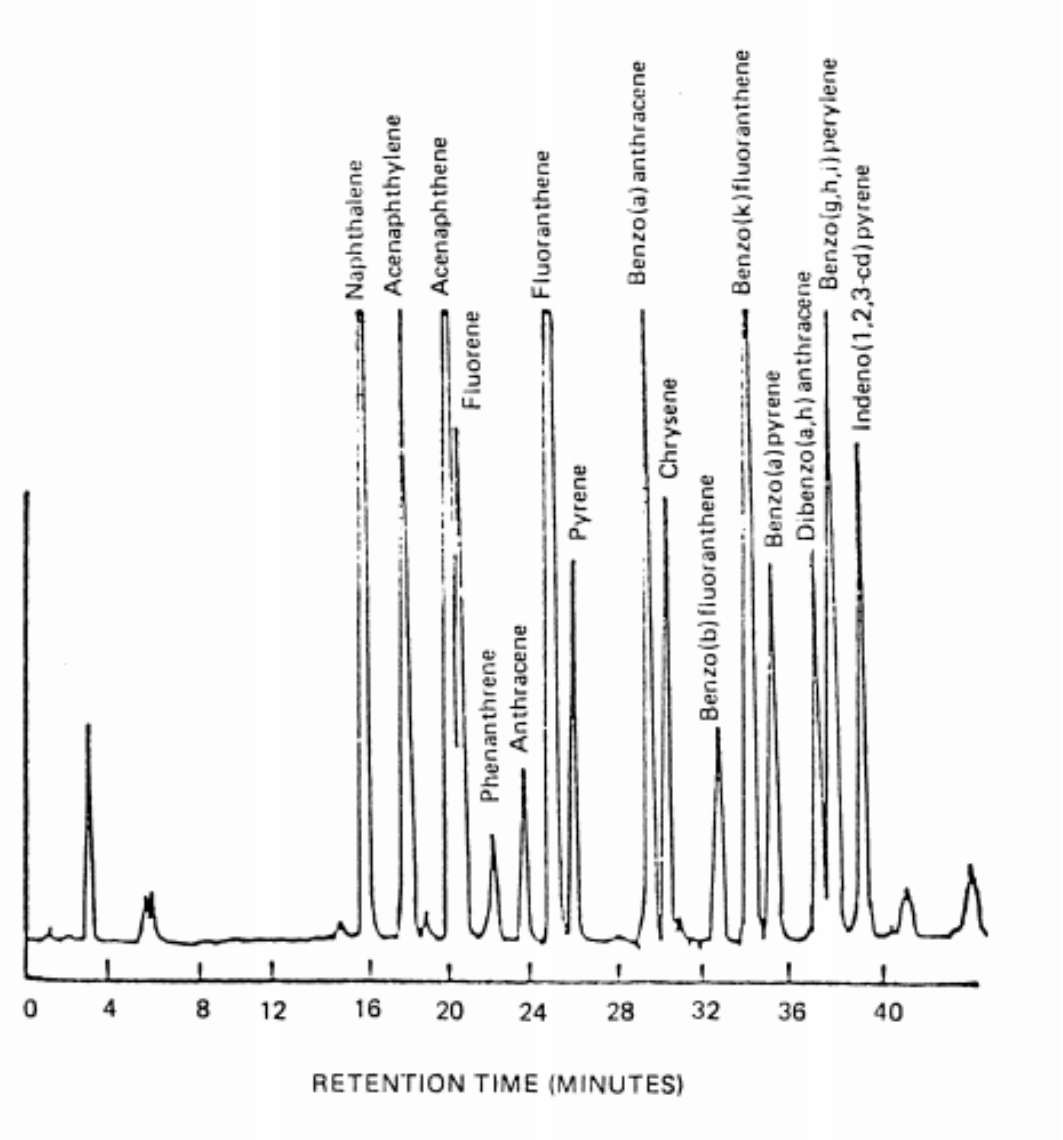
Caractéristiques et comparaison des colonnes C 18

Polarité \ Hydrophobicité	FAIBLE	MOYEN	FORT
FAIBLE	ACE CN, Hypersil CPS, Inertsil CN-3, Spherisorb CN, Zobax TMS, Zorbax SB CN, Kromasil CN	ACE Phenyl, Hypersil MOS, Inertsil Ph-3, Kromasil Phenyl, Spherisorb C8, Zobax C8, Zorbax SB Phenyl	Exsil ODS et ODS 1, Lichrospher RP18, Nucléosil C18, Sphérisorb ODS1 et 2, Zorbax ODS
MOYEN	Inertsil C4, Zorbax SB C3, Vydac 300P	Lichrospher RPSelect B YMC basic Zorbax Rx C8 Zorbax SB C8	Hypersil BDS C18 Inertsil ODS Inertsil ODS 2 Nucleosil C18 AB Zorbax Rx C18 Zorbax SB C18
FORT	ACE C4, Kromasil C1, Kromasil C4,, Vydac 300M, YMC ProC4	ACE C8, Kromasil C8, YMC ProC8 Zorbax XDB C8	ACE C18 Develosil ODS-UG Hypurity C18 Kromasil C18 YMC ProC18 Zorbax XDB C18

D'après le site : www.aitfrance.fr consulté le 2/10/2013

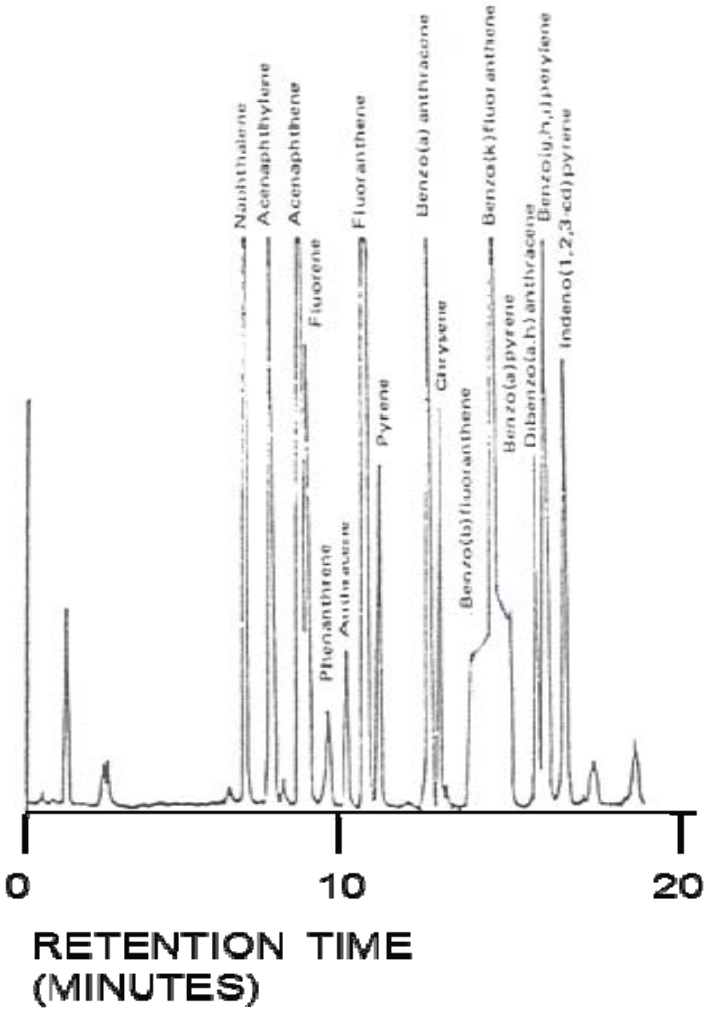
DOCUMENT 7

Chromatogrammes obtenus à partir des deux modes d'élution



1ème mode isocratique

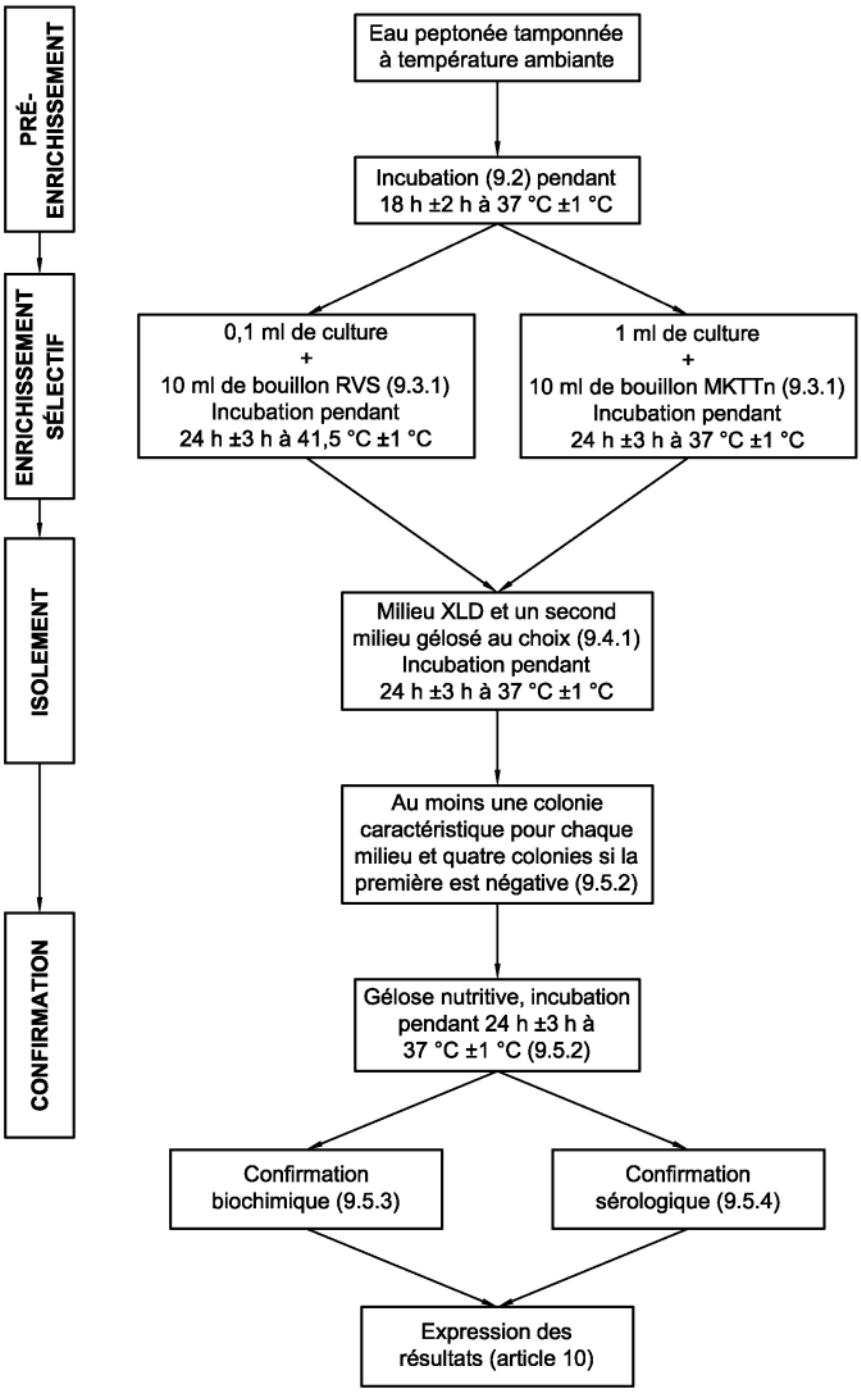
<u>DOCUMENT 7</u> (suite)

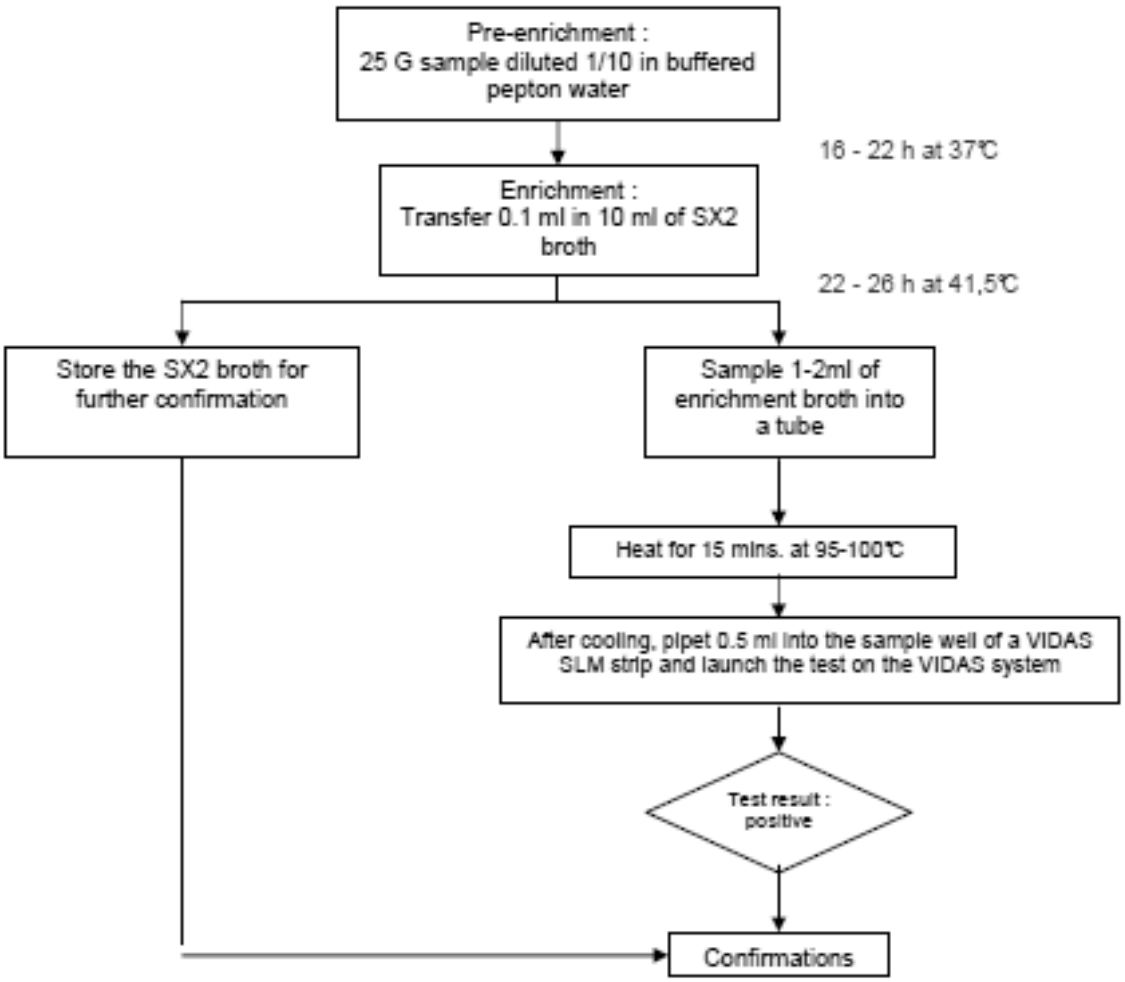


2ème mode isocratique

DOCUMENT 8

Schématisation de la recherche de *Salmonella*
(tirée de la norme NF EN ISO 6579)



DOCUMENT 9

Schématisation de la recherche de *Salmonella* par la méthode VIDAS Easy *Salmonella*
(extrait du rapport de Validation AFNOR de la méthode)