

# Les nitrates

Damien BANAS et Jean-Christophe LATA

Université Paris-Sud ; Laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution ; UMR 8079 - CNRS/ENGREF/Univ. Paris-Sud ; Bât 362 ; F-91405 Orsay Cedex France

## 1. Composition chimique

Le nitrate est un composé inorganique composé d'un atome d'azote (N) et de trois atomes d'oxygène (O). Sa formule chimique est  $\text{NO}_3^-$ . Sa masse moléculaire est de  $62 \text{ g.mol}^{-1}$ . L'azote constituant la molécule de nitrate est dénommé azote nitrique et est généralement noté  $\text{N-NO}_3^-$ . Ainsi un gramme d'ion  $\text{NO}_3^-$  correspond à 0,22 gramme d'azote nitrique.

Le nitrate est un élément minéral nutritif pour les végétaux et les microorganismes. Pour cette raison, les sels de nitrate comme par exemple le nitrate de potassium (encore appelé salpêtre, de formule  $\text{KNO}_3$ ), le nitrate de sodium ( $\text{NaNO}_3$ ), le nitrate de calcium ( $\text{Ca(NO}_3)_2$ ) ou le nitrate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), sont utilisés pour la fabrication de fertilisants azotés. Le nitrate est également utilisé pour la composition d'explosifs ou de ciments spéciaux, comme additif et colorant alimentaire, pour la coagulation de latex, dans l'industrie nucléaire et pour le contrôle des odeurs et de la corrosion dans les systèmes hydrauliques.

## 2. Sources de nitrate

### 2.a) Les eaux et les sols

Naturellement, les eaux superficielles et les sols renferment de l'azote. Celui-ci provient de la fixation de l'azote atmosphérique par certaines espèces végétales (par exemple les légumineuses), par des cyanobactéries et des bactéries. Une fois incorporé par les organismes, l'azote devient matière organique. Lors de la décomposition de cette matière organique azotée, les bactéries présentes dans les eaux et les sols peuvent la transformer en nitrates. Ceci s'effectue dans un premier temps selon le processus d'ammonification qui conduit à la production d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ). L'ammonium peut ensuite être transformé en nitrate suivant le processus de nitrification qui comporte deux étapes : la nitrosation ou nitritation (qui conduit à la formation de nitrites  $\text{NO}_2^-$  sous l'action de bactéries telle *Nitrosomonas*) et la nitratisation (oxydation de  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{NO}_3^-$  par des bactéries telle *Nitrobacter*). Alors, les nitrates peuvent suivre différentes voies. Ces nitrates peuvent alors être assimilés par d'autres organismes (plantes, microorganismes) qui les utilisent pour leurs développements. Les nitrates étant très solubles dans l'eau, une fraction est systématiquement exportée vers les écosystèmes aquatiques localisés en aval et vers les nappes en profondeur. Les concentrations en nitrates des eaux souterraines et superficielles sont généralement inférieures à  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  dans les systèmes exempts d'activité humaine et la concentration naturelle en  $\text{N-NO}_3^-$  des cours d'eau est inférieure à  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  (Meybeck, 1982 et 1989). Enfin, une large partie est perdue par les eaux et les sols et transformée par certaines bactéries en suivant le processus de dénitrification : l'azote retourne alors à l'atmosphère en empruntant différentes formes principalement gazeuses, dont le protoxyde d'azote  $\text{N}_2\text{O}$ , gaz à effet de serre.

La principale source de contamination des sols et des eaux par les nitrates est l'apport d'engrais azotés sur les cultures. Ces apports peuvent être effectués en utilisant divers types d'engrais azotés qui peuvent fournir de l'azote soit sous forme de nitrates (assimilable par la plante mais également beaucoup plus lessivable), soit sous formes d'urée, d'ammonium ou de lisier, qui seront progressivement transformées en nitrates. Les systèmes de traitements des eaux usées déficients, tout comme la décomposition de matières organiques animales ou végétales issues produites par l'activité humaine, peuvent être une source de contamination par les nitrates (Levallois et Phaneuf, 1994).

L'urine des animaux (et donc de l'homme) contient de l'ammoniac et de l'urée, qui peuvent rapidement être oxydés en nitrates. Ces rejets d'azote peuvent alors être assimilés à une pollution diffuse dans le cas d'élevages, ou à une pollution ponctuelle dans le cas d'élevages intensifs ou de rejets d'excréments humains provenant d'habitations. La production endogène de nitrates chez les mammifères sera brièvement abordée plus loin dans ce chapitre.

### *2.b) L'atmosphère*

Les nitrates aérosols sont des particules secondaires formées dans l'atmosphère par des transformations chimiques au cours desquelles les oxydes d'azote ( $\text{NO}_x$ ) réagissent avec des substances déjà présentes dans l'air, comme l'ammoniac. Le processus naturel de dénitrification conduit à charger l'atmosphère en oxydes d'azote. Le dioxyde d'azote alors formé est rapidement transformé en acide nitrique, lui-même converti en nitrate d'ammonium et nitrate de calcium. Des nitrates sont formés à partir du  $\text{N}_2$  atmosphérique lors d'orages. Les éclairs provoquent une formation d'oxydes d'azote et sont à l'origine d'une nitrification abiotique. L'acide nitrique formé se combine ultérieurement à l'ammoniac présent dans l'atmosphère et donne des microcristaux de nitrate d'ammonium qui sont ramenés à la surface du sol par les précipitations sous formes de pluies ou de neiges (Ramade, 1998). Les divers processus de combustion liés à l'activité anthropique (en particulier l'utilisation de véhicules à moteur), conduisent à enrichir l'atmosphère en oxydes d'azote. Comme c'est le cas pour les oxydes d'azotes issus de sources naturelles, ceux-ci sont transformés en nitrate d'ammonium et nitrate de calcium. Cette concentration atmosphérique en nitrates peut être particulièrement accrue au voisinage des grandes agglomérations où la circulation routière est importante (Ramade, 2005).

### *2.c) Biosynthèse endogène de nitrates*

Dès le début du XX<sup>ème</sup> siècle, Mitchell et al. (1916) observaient que les quantités de nitrates rejetées dans l'urine des mammifères pouvaient être supérieures aux quantités ingérées, ce qui permettait de suspecter une synthèse endogène des nitrates. La biosynthèse endogène de nitrates à partir de la L-Arginine a été mise en évidence plus récemment (Marletta, 1988 ; Leaf et al., 1989). L'importance de cette source de nitrate est décrite par Hill (1991) comme étant probablement pour l'individu, la principale source d'exposition aux nitrates lorsque le système immunitaire est stimulé de façon approprié. Un adulte sain excrète par les urines 62 mg de nitrate issus de sa production endogène chaque jour (Messinga et al., 2003).

## **3) Les nitrates dans l'habitat**

### *3.a) L'air*

Comme cela a précédemment été signalé, l'air peut être chargé en nitrates. Cette concentration dans l'air est accentuée à proximité des grandes cités par la production d'oxydes d'azotes imputable aux combustions liées à l'activité anthropique. Yocom (1982) a montré que les concentrations en nitrate dans l'habitat sont liées aux concentrations à l'extérieur. Cet auteur a ainsi trouvé des concentrations dans l'habitat variant de 1,1 à 5,6  $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ . Dans l'atmosphère extérieure, Janssen et al. (1989) mesuraient aux Pays Bas des concentrations comprises entre 1 et 14  $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ . Les concentrations extrêmes en nitrates atmosphériques relatées dans la littérature s'évaluent entre 0,1 et 40  $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$  (WHO, 2003). Cette voie d'exposition des nitrates par inhalation est négligeable par rapport aux apports alimentaires et hydriques (Santé Canada, 1992). Il a été estimé que pour des régions avec une forte concentration en composés azotés dans l'air, même si tous ces composés étaient inhalés par un adulte, la somme des apports de  $\text{N-NO}_3^-$  par cette voie ne serait que d'approximativement 0,1  $\text{mg}\cdot\text{jour}^{-1}$  (WHO, 1995).

### 3.b) L'eau d'alimentation

De par leur forte solubilité dans l'eau, les nitrates se retrouvent souvent dans l'eau du robinet à des concentrations proches des limites autorisées. En effet, l'utilisation d'engrais azotés qui s'est fortement développée depuis 1950 conduit à une augmentation des teneurs en  $\text{NO}_3^-$  dans les eaux de surfaces et souterraines. Par conséquent, les teneurs élevées en azote des nappes se répercutent sur les eaux brutes utilisées pour la production d'eau potable (Mason, 1996). Lespine et Périquet (2001) s'appuyant sur des études menées dans divers pays d'Europe, attribuent à l'eau de consommation 25 % des apports de nitrate à l'organisme. Etant donné la très grande gamme de teneurs en nitrates rencontrée dans l'eau de consommation selon les régions ou pays concernés (Hill, 1991), la proportion des apports de nitrates imputable à l'eau est très variable. L'organisation mondiale pour la santé (WHO, 1995) précise que dans les régions où les concentrations en nitrate dans l'eau sont inférieures à  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ , l'exposition par ingestion de légumes est plus élevée. Cependant, l'eau devient la principale source de nitrate lorsque les concentrations en nitrates dans l'eau dépassent la concentration maximale conseillée par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) dans les eaux de boisson et fixée à  $50 \text{ mg.L}^{-1}$ . Dans de nombreux pays, les teneurs en nitrates sont inférieures à  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  dans les eaux de consommation provenant d'eaux de surfaces (WHO, 2003). Cependant, pour 15 pays Européens étudiés en 1985, il a été estimé qu'entre 0,5 à 10 % de la population étaient exposés à des niveaux de nitrates supérieurs à  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  dans l'eau d'alimentation (WHO, 2003). Pour une consommation d'eau de 1,5 litres par jour, l'apport de nitrate imputable à l'eau d'alimentation peut être estimée à environ  $75 \text{ mg.j}^{-1}$  lorsque les concentrations dans l'eau sont proches de ce seuil.

### 3.c) Les aliments

Les aliments, en particulier les légumes, les fruits et les viandes salées (et dans une moindre mesure les poissons et les produits laitiers) peuvent contenir une dose élevée de nitrates.

La teneur en  $\text{NO}_3^-$  des végétaux est influencée par l'azote disponible dans le sol ou apporté par fertilisation, la variété cultivée et les conditions de croissance incluant la saison (les nitrates étant métabolisés en présence de lumière, les cultures sous serres ou d'hiver sont généralement plus chargées en nitrates).

Dans les fromages et les charcuteries, les nitrates sont issus des additifs utilisés comme agents de conservation comme par exemple le nitrate de sodium (E251) ou le nitrate de potassium (E252). Les nitrates de sodium ou de potassium sont également utilisés pour le traitement des viandes car ils stabilisent la couleur des viandes rouges, inhibent certaines détériorations et le développement de microorganismes anaérobiques toxiques, ralentissent l'oxydation de la viande et contribuent à exhausser la saveur. Ces deux additifs alimentaires sont interdits d'utilisation en boucherie (morceaux de viandes débitées et viandes hachées) et ne sont pas autorisés dans le corned-beef. L'ajout de nitrates dans les aliments pour bébés est strictement interdit.

Il a été estimé que les teneurs en nitrates sont en générale comprises entre 2,7 et  $945 \text{ mg.kg}^{-1}$  pour les viandes et moins de 3 et  $27 \text{ mg.kg}^{-1}$  pour les produits laitiers (WHO, 2003). Certains végétaux et fruits peuvent couramment en contenir entre 200 et  $2500 \text{ mg.kg}^{-1}$  (Duijvenbooden et Matthijsen, 1989). En fonction de leur teneur en nitrates, les légumes sont fréquemment classés en 5 groupes. Groupe 1 : ceux en contenant souvent moins de  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$  (asperge, champignon, pomme de terre blanche, tomate). Groupe 2 : souvent  $< 500 \text{ mg.kg}^{-1}$  (brocoli, chou-fleur, concombre, oignon, navet). Groupe 3 : souvent  $< 1000 \text{ mg.kg}^{-1}$  (haricot vert, chou, carotte). Groupe 4 :  $< 2500 \text{ mg.kg}^{-1}$  (endive, rhubarbe, persil, poireau). Groupe 5 :  $> 2500 \text{ mg.kg}^{-1}$  (betterave, céleri, laitue, épinard, radis). Les légumes cultivés sous serre ou en hiver contiennent généralement plus de nitrates (Peterson et Stoltze, 1999). Il a été estimé au Danemark que les fruits et les légumes étaient à la source de  $\frac{3}{4}$  des apports individuels de

$\text{NO}_3^-$  (WHO, 1995). Il est cependant important de rappeler que la consommation de légumes verts, parce qu'ils contiennent des fibres et d'autres composés antioxydants, sont conseillés pour prévenir la formation de cancers.

Les apports alimentaires journaliers moyens en nitrates sont estimés entre 50 et 150  $\text{mg}\cdot\text{j}^{-1}$  pour un Européen et entre 40 et 100  $\text{mg}\cdot\text{j}^{-1}$  pour un Américain (Messinga et al., 2003). Dans le cas de régimes végétariens, l'ingestion de  $\text{NO}_3^-$  semble plus importante et peut dépasser 300  $\text{mg}\cdot\text{j}^{-1}$  (Walker, 1990). Cet apport alimentaire (eau d'alimentation exclue) est estimé à 25  $\text{mg}\cdot\text{j}^{-1}$  pour un enfant âgé de deux mois (WHO, 1995).

### *3.d) Les rejets de nitrates*

Les rejets d'effluents domestiques chargés de matières organiques fermentescibles par des habitations isolées et les agglomérations urbaines sont à l'origine d'une partie de la pollution des eaux par les nitrates. Les concentrations moyennes en nitrates dans les urines rejetées ont rarement été étudiées en Europe. Des études menées entre 1985 et 1989 relataient une excrétion de nitrate comprise entre 32 et 96  $\text{mg}\cdot\text{j}^{-1}$  (WHO, 1995). La plus grande partie des nitrates ingérés sont excrétés dans les urines sous formes de nitrates, ammonium ou urée (WHO, 2003). Wagner et al. (1983) ont évalué que 60 % des nitrates ingérés étaient excrétés dans l'urine. En Europe, il est estimé qu'un individu rejette en moyenne 15 g d'azote sous forme organique et ammoniacal par jour. Cette estimation est à l'origine de la notion d'Equivalent Habitant azote (EqH). Cette donnée est utilisée afin de dimensionner les stations d'épuration destinées à traiter les eaux usées des agglomérations urbaines. L'azote organique et ammoniacal rejeté est susceptible d'être oxydé en  $\text{NO}_3^-$ .

## **4) Effets connus sur l'environnement**

L'effet principal des nitrates sur l'environnement consiste à favoriser la croissance végétale. Cet impact, qui peut apparaître bénéfique dans un premier temps, s'avère désastreux pour les écosystèmes aquatiques lorsque la prolifération végétale est poussée à l'excès. Le processus d'eutrophisation, qui correspond à un enrichissement naturel des milieux aquatiques en éléments nutritifs et à une augmentation de la productivité végétale, est alors considérablement accéléré. L'eutrophisation du milieu nécessite la présence d'éléments nutritifs (carbone, azote, phosphore) indispensables à la croissance des végétaux aquatiques. Le carbone est toujours présent à des concentrations suffisantes pour permettre le développement végétal. En milieux aquatiques, la croissance des végétaux est limitée par l'élément dont la concentration dans le milieu est la plus faible par rapport aux besoins des végétaux. Cet élément limitant est généralement le phosphore ou parfois l'azote. C'est donc en rejetant de l'azote et/ou du phosphore dans l'eau que l'activité anthropique va induire une accélération de l'eutrophisation. Lorsque les concentrations en azote et phosphore du milieu aquatique sont élevées, la production d'algues microscopiques (phytoplancton) et de végétaux fixés (macrophytes) est exacerbée. La quantité de matière organique présente dans le milieu aquatique s'accroît démesurément. A la mort de ces végétaux, la matière organique se décompose en consommant tout l'oxygène de la colonne d'eau, induisant ainsi l'anoxie du milieu aquatique. La plupart des animaux vivants dans ces milieux ne peuvent pas survivre dans une eau dépourvue d'oxygène. L'écosystème aquatique est ainsi conduit à disparaître. Si l'on utilise souvent le terme d'eutrophisation pour décrire cet état de dégradation des milieux aquatiques, le terme d'eutrophisation accélérée apparaît plus précis et le terme de dystrophie est parfois usité.

L'enrichissement des écosystèmes aquatiques en éléments azotés (mais également en phosphore) conduit à leurs disfonctionnement et à la perturbation des populations animales ou végétales qui y sont naturellement inféodés. Ainsi, diverses études ont mis en évidence des corrélations entre les teneurs en nitrates dans l'eau ou les quantités d'engrais azotés épandus

et le déclin des populations d'amphibiens (Oldham et al., 1997 ; Bishop et al., 1999 ; Rouse et al., 1999). Cette modification des populations peut également conduire au développement de microorganismes pathogènes ou sécrétant des toxines qui rendent impropre l'eau à divers usages (récréatifs, production d'eau potable) ou peuvent considérablement accroître les coûts des traitements des eaux. Un deuxième effet, moins aisément quantifiable pour l'instant, est la participation des nitrates, via leur dénitrification, à la formation de gaz à effet de serre. Son évaluation est en cours d'étude actuellement à travers différents programmes de recherches sur les changements globaux.

## **5) Effets connus sur la santé humaine**

Le principal risque pour la santé humaine associé à l'ingestion de nitrates est lié à la faculté de l'organisme humain de transformer les nitrates en nitrites. Cette réduction de  $\text{NO}_3^-$  en  $\text{NO}_2^-$  est le fait de bactéries ayant une activité nitrate réductase. Il ne semble pas exister d'études relatant un effet toxique chronique des nitrates qui ne soient pas lié aux effets des nitrites.

### *5.a) Risque de méthémoglobinémie*

Les nitrites formés par réduction des nitrates sont susceptibles de se fixer sur l'hémoglobine (Hill, 1991 ; L'hirondel et L'hirondel, 2002). Celle-ci est alors oxydée en méthémoglobine. Le transport de l'oxygène vers les tissus qui en ont besoin ne se fait plus. Cette maladie est dénommée méthémoglobinémie. Chez l'adulte, ce risque est très faible car une enzyme réduit la méthémoglobine en hémoglobine. En revanche, cette enzyme n'est pas activée chez le nourrisson et ne devient fonctionnelle que vers trois à quatre mois. De plus le pH dans l'estomac du nourrisson est plus élevé que celui d'un adulte car les sécrétions gastriques acides sont plus faibles durant les premiers mois de la vie. Ce pH élevé semble permettre un développement plus aisé des bactéries ayant une activité nitrate réductase. Par conséquent lorsqu'il y a ingestion d'une forte quantité de nitrate dans des conditions favorisant sa conversion en nitrites, la méthémoglobine s'accumule. L'enfant développe alors une coloration bleue de la peau qui débute par les lèvres, puis les bouts des doigts, et peut éventuellement s'étendre à l'ensemble du corps. Pour cette raison, cette pathologie qui est plus fréquente chez le nourrisson, est aussi appelée syndrome du bébé bleu ou maladie bleue du nourrisson. Certains auteurs affirment que la réduction des nitrates en nitrites n'est pas possible dans le tube digestif et que les risques imputés aux nitrates sont considérablement surestimés (L'hirondel et L'hirondel, 2002 ; Testud, 2004). Dès 1945, Comly (1945), mettait en relation des cyanoses chez des nourrissons ayant été alimentés avec de l'eau à fortes teneurs en nitrates (plus de  $350 \text{ mg.L}^{-1}$ ). En considérant que 80 % des nitrates sont réduits en nitrites chez les nourrissons, et une formation de 10 % de méthémoglobine, Corré et Breimer (1979) ont estimé la dose toxique pour l'enfant à 1,5-2,7 mg de nitrate par kg. Cependant, dans les cas de méthémoglobinémie rapportée, la somme des nitrates ingérés était plus élevée : entre 33 et  $150 \text{ mg.kg}^{-1}$  (Walker, 1990 ; WHO, 2003). Les femmes enceintes et les individus souffrant d'une déficience en glucose-6-phosphate déhydrogénase ou metHb réductase sont également particulièrement sensibles à cette pathologie. Un apport suffisant de vitamine C (acide ascorbique) par l'alimentation, réduit les risques de développement de la maladie (Super et al., 1981). La vitamine C peut d'ailleurs être utilisée dans le traitement de la méthémoglobinémie mais son action est souvent trop lente pour agir efficacement.

### *5.b) Risque carcinogène*

Les nitrates sont susceptibles de présenter un risque lié à leur transformation en nitrites et éventuellement en nitrosamines dans le tractus digestif. Les propriétés carcinogènes de ces substances ont été découvertes il y a un demi siècle (Magee et Barnes, 1956 ; Magee et Barnes, 1967). Il n'existe pas de données qui démontrent avec certitude les effets

carcinogènes des nitrates via la formation de nitrosamines chez l'animal (WHO, 1995). Les études épidémiologiques et toxicologique n'ont pas mis en évidence de relations certaines entre ingestion de nitrates et risque de cancers (Cantor, 1997 ; Messinga et al., 2003). Démontrer avec certitude une telle relation est particulièrement difficile étant donné le temps de latence entre la cause et le dépistage de la pathologie qui peut dépasser 20 ans (Hill, 1991). Cette démonstration est rendue encore plus ardue par la grande variabilité dans la durée et l'espace des teneurs en  $\text{NO}_3^-$  dans l'eau et les aliments. Cependant, les tests chez de nombreuses espèces animales ont montré l'effet carcinogène d'un grand nombre de nitrosamines (WHO, 1995). Diverses études permettent de suspecter fortement la responsabilité de teneurs élevées en nitrates dans l'eau et les aliments, et le développement de cancers de la prostate, du pharynx, de l'œsophage ou du colon (Cantor, 1997 ; Gulis et al., 2001). En absence de certitudes absolues, ces résultats imposent de prendre les précautions nécessaires afin de préserver la santé humaine.

#### Effets indirects

Dans les eaux marines littorales, l'accroissement des concentrations de nitrates entraîne l'apparition d'une prolifération algale qui peut être toxique pour l'homme directement et/ou indirectement par la consommation de coquillages. En France, la région Bretagne est particulièrement touchée depuis quelques années par la prolifération d'Ulves qui sont des algues à l'origine des « marées vertes ». Dans les eaux douces, l'eutrophisation accélérée (induite par les pollutions azotés mais aussi phosphatées) du milieu peut conduire au développement de phytoplanctons producteurs d'hépatotoxines et de neurotoxines.

### 6) Méthodes scientifiques de mesures

Le dosage des nitrates impose que la mesure soit réalisée dans les plus courts délais après le prélèvement car le  $\text{NO}_3^-$  peut rapidement être réduit.

Les ions nitrates peuvent être dosés directement. Ces méthodes directes présentent souvent un manque de sensibilité et sont affectées par diverses matrices interférentes. Afin de palier à ces deux inconvénients,  $\text{NO}_3^-$  est souvent préalablement réduit en  $\text{NO}_2^-$ . Ce sont donc les concentrations en nitrites qui sont évaluées. Cette approche nécessite donc une détermination des teneurs en nitrites présentes dans l'échantillon avant réduction des nitrates. Les concentrations en nitrates se déduisent alors de la différence entre les concentrations en nitrites avant et après réduction (Slack, 1987).

L'une des méthodes les plus courantes de détermination des teneurs en nitrates consiste à réduire les nitrates en nitrites à travers une colonne de cadmium. Les nitrites sont ensuite dosés par spectrophotométrie d'absorption moléculaire après diazotation de l' amino-4-benzènesulfonamide (sulfanilamide) en conditions acides avec le dichlorure de N-(naphtyl-1) diamino-1,2-éthane (N-1-naphtyléthylènediamine) (Slack, 1987 ; Rodier, 1996).

Les nitrates peuvent également être dosés directement par spectrophotométrie d'absorption moléculaire. Ainsi, en présence de salicylate de sodium, les nitrates donnent du paranitrosalicylate de sodium coloré en jaune et susceptible d'un dosage spectrophotométrique (Rodier, 1996). Dans les eaux, les nitrates peuvent également être dosés par chromatographie ionique ou directement par spectrophotométrie d'absorbance moléculaire dans l'UV lorsque la teneur en matières organiques est faible (APHA, 1976). Dans les denrées alimentaires, des méthodes basées sur la réduction enzymatique (Schmidt et al., 1992), la chromatographie gazeuse (Ross et Hotchkiss, 1985, l'HPLC (Reece et Hird, 2000) ou l'électrophorèse capillaire (Öztekın et al., 2002) peuvent également être utilisées.

Les méthodes de dosages des nitrates préconisées par les normes françaises et européennes dépendent de la matrice analysée qui peut être de l'eau (AFNOR NF EN ISO 13395 T90-

012 et EN ISO 13395 :1996) ou des denrées alimentaires diverses (AFNOR NF EN ISO 14673-1 VO4-172-1 et suivantes pour le lait et les produits laitiers, NF EN 12014-2 V03-010-2 pour les légumes et produits à bases de légumes, NF EN 12014-7 V03-010-7 et suivantes pour les produits carnés, NF EN 12014-5 VO3-010-5 pour les aliments à base de légumes pour bébés et petits enfants).

### **7) Réglementation actuelle**

La JECFA (association d'experts de la FAO et de l'OMS) et la commission européenne ont fixé entre 0 et 3,65 milligrammes de nitrates par kg et par jour la dose journalière admissible (DJA) pour l'homme. Pour un individu de 70 kg, cela correspond à 255 mg de nitrates par jour. A titre de comparaison, l'OMS (WHO, 1995) estime entre 120 et 300 mg la dose journalière ingérée quotidiennement par un adulte Européen. La DJA fixée par l'agence Américaine de protection de l'environnement (EPA) est fixée à environ  $7,1 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ .

#### *7.a) L'eau de consommation*

La valeur guide maximale de l'OMS pour les teneurs en nitrate dans les eaux de consommation est de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$ . Le décret 2001-1220 du 20 décembre 2001 fixe pour la France les concentrations maximales en nitrates dans l'eau de consommation à  $50 \text{ mg.L}^{-1}$ . La valeur guide recommandée par l'Europe est de  $25 \text{ mg.L}^{-1}$ . L'agence américaine pour la protection de l'environnement (EPA) fixe cette limite à  $45 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ ).

#### *7.b) Les aliments*

Les teneurs en nitrates dans les viandes sont également réglementées. La législation européenne (Directive de l'Union Européenne 95/2) suggère de limiter les additifs en début de traitement des viandes et impose une limite résiduelle de 250 mg de nitrates par kilogramme de viande.

En France, l'arrêté du 15 septembre 1964 (JOFR du 3 octobre 1964, p. 8924), la circulaire du 29 janvier 1965, le CSHPF du 23 mai 1978 et le code des usages II 39-3-124, réglementent les conditions et doses d'emploi de ces additifs en fonction des groupes de produits traités (pâtes et conserves de viandes, produits de la salaison non soumis à une maturation dessiccation, produits de la salaison soumis à une maturation dessiccation) (RREDA, 1989).

La législation Française limite les teneurs en nitrates dans les charcuteries à  $150 \text{ mg.kg}^{-1}$  et dans les aliments pour bébés à  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ . La Commission Européenne fixe les concentrations maximales admises dans les épinards frais et les laitues cultivées sous serre récoltés entre le 1<sup>er</sup> novembre et le 31 mars à respectivement 3000 et  $4500 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Ces teneurs sont abaissées respectivement à 2500 et  $3500 \text{ mg.kg}^{-1}$  pour ceux collectés entre le 1<sup>er</sup> avril et le 31 octobre. La limite est de  $2000 \text{ mg.kg}^{-1}$  pour les épinards cuisinés ou congelés et de  $2500 \text{ mg.kg}^{-1}$  pour les laitues cultivées en plein air.

### **8) Recommandation en vertu des principes de précaution**

Compte tenu des études qui confirment le risque d'effets nocifs aigus (méthémoglobinémie aiguë du nourrisson) à partir de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  de nitrates dans l'eau de consommation (Fan et al., 1987 ; Fan et Steinberg, 1996), il apparaît recommandable pour les populations à risque (nourrissons, femmes enceintes ou qui allaitent, personnes âgées dont l'acidité gastrique est diminuée, etc.) de s'alimenter à partir d'eau garantissant une teneur en nitrates inférieure à ce seuil. Il a également été montré que les nourrissons alimentés au sein présentent une flore intestinale caractérisée par une activité nitrate réductase moindre que les bébés alimentés au biberon (Hill, 1991). Le risque de méthémoglobinémie pourrait donc être accru chez ces derniers. Il apparaît recommandable d'assurer au nourrisson jusqu'à l'âge minimum de trois

mois une alimentation au sein susceptible de minimiser le développement de bactéries nitrato-réductrices et d'éviter d'exposer directement l'enfant à un apport de nitrate issu de l'eau d'alimentation. Les nitrates pouvant se retrouver dans le lait maternel, les mamans qui allaitent doivent éviter de boire de l'eau riche en nitrates. En général, l'apport de nitrate par le lait maternel semble négligeable. Green et al. (1981) ont estimé la concentration dans le lait maternel à 1,4 mg.L<sup>-1</sup> de nitrate. Dans le cas d'une alimentation au biberon, il est indispensable de s'assurer de l'absence ou de la très faible teneur en nitrate dans l'eau utilisée pour la préparation des aliments. Pour un enfant qui serait nourri avec une alimentation préparée à partir d'une eau contenant 50 mg.L<sup>-1</sup> de nitrate, l'ingestion de nitrate serait proche de 8,5 mg de nitrates par kilo et par jour (WHO, 2003). Cet apport serait près de six fois la dose toxique pour un nourrisson calculé selon Corré et Breimer (1979) et plus de deux fois supérieur à l'apport maximal journalier admissible défini par la JECFA pour un adulte. Il convient de rappeler que le nourrisson est beaucoup plus sensible à l'ingestion de nitrate que l'adulte. Il apparaît également prudent de limiter l'usage de légumes connus pour renfermer de fortes teneurs en NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (carottes, épinards, betteraves) pour l'alimentation des nourrissons de moins de quatre mois. Si certains auteurs (L'hirondel et L'hirondel, 2002 ; Testud, 2004) réfutent en partie les risques de méthémoglobinémie et de cancer imputés aux nitrates, tous les auteurs s'entendent sur l'importance de s'assurer d'une grande hygiène lors de la préparation d'aliments pour nourrissons afin d'éviter une contamination par les bactéries nitro-réductrices. L'alimentation du nourrisson doit donc être préparée avec des aliments en parfait état de conservation, en utilisant des ustensiles propres. L'aliment ne doit pas avoir séjourné à température ambiante durant une longue période avant d'être ingéré.

Les données actuelles des études épidémiologiques ne permettent pas de tirer une conclusion définitive sur les risques cancérigènes liés à une forte consommation de nitrates. Le risque est cependant loin d'être écarté. Le principe de précaution impose donc de limiter l'apport de nitrates que ce soit par l'intermédiaire d'aliments et/ou d'eaux contaminés.

### **Bibliographie**

- APHA, 1976, Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association (APHA), Washington, 420-423.
- Bishop C. A., Mahony N. A., Struger J., Ng P., Pettit K. E., 1999, Anuran development, density and diversity in relation to agricultural activity in the Holland River watershed, Ontario, Canada (1990-1992). *Environ. Monitor. Assess.*, 59, 21-43.
- Cantor K. P., 1997, Drinking water and cancer. *Cancer Cause Control* 8, 292-308.
- Comly H., 1945, Cyanosis in infants caused by nitrates in well water. *J. Am. Med. Assoc.* 129, 112-116.
- Corré W. J., Breimer T., 1979, Nitrate and nitrite in vegetables. Centre for Agricultural Publishing Documentation (Literature Survey No. 39), Wageningen.
- Duijvenbooden W., Matthijsen A. J. C. M., 1989, Integrated criteria document : Nitrate effects. Rapport n° 758473012, RIVM, Bilthoven.
- Fan A. M., Willhite C. C., Book S. A., 1987, Evaluation of the nitrate drinking water standard with reference to infant methemoglobinemia and potential reproductive toxicity. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 7, 135-148.
- Fan A. M., Steinberg V. E., 1996, Health Implications of Nitrate and Nitrite in Drinking Water : An Update on Methemoglobinemia Occurrence and Reproductive and Developmental Toxicity. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 23, 35-43.
- Green L. C., Ruiz de Luzuriaga K., Wagner D. A., Rand W., Istfan N., Young V. R., Tannenbaum S. R., 1981, Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 7764-7768.

- Gulis G., Czompolyova M., Cerhanw J. R., 2001, An Ecologic Study of Nitrate in Municipal Drinking Water and Cancer: Incidence in Trnava District, Slovakia. Environ. Res. Section A, 88, 182-187.
- Hill M. J., 1991, Nitrates and nitrites in food and water. Ellis Horwood, London, 196 pp.
- Janssen L. H. J. M., Visser H., Roemer F. G., 1989, Analysis of large scale sulphate, nitrate, chloride and ammonium concentrations in the Netherlands using an aerosol measuring network. Atmos. Environ., 23, 2783-2796.
- Leaf C. D., Wishnok J. S., Tannenbaum S. R., 1989, L-Arginine is a precursor to nitrate biosynthesis in humans. Biochem. Biophys. Res. Comm. 163, 1032-1037.
- Lespine A., Périquet A., 2001, Nitrate, alimentation et santé. Institut technique des céréales et des fourrages (ITCF), Paris, 24 pp.
- Levallois P., Phaneuf D., 1994, La contamination de l'eau potable par les nitrates : analyse des risques à la santé. Rev. Can. santé publique, 85, 192-196.
- L'hirondel J., L'hirondel J. L., 2002, Nitrate and Man: Toxic, Harmless or Beneficial? CABI Publishing, New York, 168 pp.
- Magee P. N., Barnes J. M., 1956, The production of malignant primary hepatic tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine. Brit. J. Cancer, 10, 114-120.
- Magee P. N., Barnes J. M., 1967, Carcinogenic nitroso compounds, Adv. Cancer Res., 10, 163-169.
- Marletta M. A., 1988, Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. Chem. Res. Toxicol. 1, 250-257.
- Mason C. F., 1996, Biology of freshwater pollution. Longman, Harlow, 3ème édition, 356 pp.
- Messinga T. T., Speijers G. J. A., Meulenbelt J., 2003, Health implications of exposure to environmental nitrogenous compounds. Toxicol. Rev., 22, 41-51.
- Meybeck M., 1982, Carbon, nitrogen and phosphorus transport by world rivers. Amer. J. Sci., 282, 401-450.
- Meybeck M., 1989, The quality of rivers : from pristine stage to global pollution. Palaeogeogr. Palaeoclimatol., 75, 283-309.
- Mitchell H., Schonle H., Grindley H., 1916, The origins of nitrate in urine. J. Biol. Chem., 24, 461-490.
- Oldham R. S., Latham D. M., Hilton-Brown D., Towns M., Cooke A. S., Burn A., 1997, The effect of ammonium nitrate fertiliser on frog (*Rana temporaria*) survival. Ag. Ecosyst. Environ., 61, 69-74.
- Öztekın N., Said Nutku M., Bedia Erım F., 2002, Simultaneous determination of nitrite and nitrate in meat products and vegetables by capillary electrophoresis. Food Chem., 76, 103-106.
- Peterson A., Stoltze S., 1999, Nitrate and nitrite in vegetables on the Danish market: content and intake. Food Add. Contam. 16, 291-299.
- Ramade F., 1998, Dictionnaire encyclopédique des sciences de l'eau. Ediscience International, Paris, 786 pp.
- Ramade F., 2005, Eléments d'écologie : Ecologie appliquée. 6<sup>ème</sup> édition, Dunod, Paris, 864 pp.
- Reece P., Hird H., 2000, Modification of the ion exchange HPLC procedure for the detection of nitrate and nitrite in dairy products. Food Addit. Contam., 17, 219-222.
- Rodier J., Bazin C., Broutin J. C., Chambon P., Champsaur H., Rodi L., 1996, L'analyse de l'eau. 8<sup>ème</sup> édition, Dunod, Paris, 1383 pp.
- Ross N. D., Hotchkiss J. H., 1985, determination of nitrate in dried foods by gas chromatography-thermal energy analyser. J. Assc. Off. Anal. Chem., 68, 41-43.
- Rouse J. D., Bishop C. A., Struger J., 1999, Nitrogen pollution: An assessment of its threat to amphibian survival. Environ. Health Perspect., 107, 799-803.

- RREDA., 1989, Répertoire sur la réglementation européenne des denrées alimentaires (RREDA). APRIA Diffusion, Tome 1, Paris.
- Santé Canada, 1992. Le nitrate et le nitrite. Consulté en janvier 2006 sur le site : [http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt\\_formats/hecs-sesc/pdf/pubs/water-eau/doc-sup-appui/nitrate\\_nitrite/nitrate\\_nitrite\\_f.pdf](http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt_formats/hecs-sesc/pdf/pubs/water-eau/doc-sup-appui/nitrate_nitrite/nitrate_nitrite_f.pdf)
- Schmidt H. H. H. W., Warner T. D., Nakane M., Forstermann U., Murad F., 1992, Regulation and subcellular location of nitrogen oxide synthase in RAW264.7 macrophage. *Mol. Pharmacol.*, 41, 615-624.
- Slack P. T., 1987, Analytical methods manual. 2nd edition, British Food Manufacturing Industries Research Association, Leatherhead.
- Super M., Heese H., MacKenzie D., Dempster W., DuPlessis J., Ferreira J., 1981, An epidemiological study of well water nitrates in a group of South West African/Namibian infants. *Water Res.* 15, 1265-1270.
- Testud F., 2004, Engrais minéraux. *Toxicol. Pathol.* 1, 21-28.
- Wagner D. A., Schultz D. S., Deen W. M., Young V. R., Tannenbaum S. R., 1983, Metabolic fate of an oral dose of [<sup>15</sup>N]-labelled nitrate in humans : effect of diet supplementation with ascorbic acid. *Cancer Res.*, 43, 1921-1925.
- Walker R., 1990, Nitrates, nitrites and N-Nitrosocompounds: A review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. *Food Add. Cont.*, 7, 717-768.
- WHO, 1995, Concern for Europe's Tomorrow, Health and the environment in the WHO European region. World Health Organization (WHO), Rapport WHO European Centre for Environment and Health, Stuttgart, 537 pp.
- WHO, 2003, Nitrate and nitrite in Drinking-water (Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality). World Health Organization (WHO), Rapport WHO/SDE/WSH/04.03/56, 16 pp.
- Yocom J. E., 1982, Indoor/outdoor air quality relationships: a critical review. *J. Air Pollut. Control Assoc.*, 32, 500-606.