

Titre: Développement d'un indice mesurant la stabilité enzymatique relative des sols pour évaluer l'impact d'une contamination organique complexe sur la qualité de sols dans un contexte de remédiation

Auteur: Roxanne Demuysère

Date: 2011

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Demuysère, R. (2011). Développement d'un indice mesurant la stabilité enzymatique relative des sols pour évaluer l'impact d'une contamination organique complexe sur la qualité de sols dans un contexte de remédiation [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
Citation: <https://publications.polymtl.ca/571/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/571/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Louise Deschênes
Advisors:

Programme: Génie chimique
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT D'UN INDICE MESURANT LA STABILITÉ
ENZYMATIQUE RELATIVE DES SOLS POUR ÉVALUER L'IMPACT D'UNE
CONTAMINATION ORGANIQUE COMPLEXE SUR LA QUALITÉ DE SOLS
DANS UN CONTEXTE DE REMÉDIATION

ROXANNE DEMUYSÈRE

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CHIMIQUE)

AVRIL 2011

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

DÉVELOPPEMENT D'UN INDICE MESURANT LA STABILITÉ
ENZYMATIQUE RELATIVE DES SOLS POUR ÉVALUER L'IMPACT D'UNE
CONTAMINATION ORGANIQUE COMPLEXE SUR LA QUALITÉ DE SOLS
DANS UN CONTEXTE DE REMÉDIATION

Présenté par : DEMUYSÈRE Roxanne

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès Sciences Appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. HENRY Olivier, Ph.D., président

Mme DESCHÊNES Louise, Ph.D., membre et directrice de recherche

M. DUBOIS Charles, Ph.D., membre

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier, tout d'abord, ma directrice de recherche, le Pr. Louise Deschênes, pour sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle m'a apportée en me proposant ce projet de recherche. Cela m'a donné l'opportunité de renforcer mes connaissances dans un domaine qui me tenait à cœur. Un grand merci également au Dr Valérie Bécaert pour l'aide reçue pendant ces deux années et ses conseils précieux; ainsi qu'à l'ensemble des membres du Jury pour l'évaluation de mes travaux.

Un merci spécial et tout particulier à Lucie Jean, pour sa très grande disponibilité, le support technique efficace au laboratoire, et pour son aide très précieuse tout au long de ce projet. Merci aussi à Sandra Estrela, pour la correction de l'anglais de l'ensemble de mes travaux réalisés au cours de cette maîtrise; ainsi qu'au partenaire industriel du projet pour les sols fournis et pour le soutien financier.

J'ai beaucoup apprécié travaillé, au laboratoire, aux côtés de Lucie, Isabelle et Jonathan, pour l'ambiance, leurs bonnes humeurs et aussi pour toutes les discussions constructives. Je remercie l'ensemble du CIRAIG et toutes les personnes que j'ai eu la chance de côtoyer pendant ces deux années, pour l'ambiance et leur accueil au sein du centre de recherche, et en particulier, mes amis et collègues des bureaux B657, A683.2 et A685. Merci aussi aux Dr. Cécile Bulle et Dr. Manuele Margni, ainsi qu'à Isabelle, Jonathan, Shirley, Ben, Guillaume, Vincent et tous ceux, qui m'ont apporté de bons conseils, que ce soit sur le côté technique ou rédactionnel de mon projet.

Je remercie également les partenaires de la Chaire internationale en Analyse du Cycle de Vie pour leur soutien financier : ArcelorMittal, Bell Canada, Cascades, Éco Entreprises Québec, Groupe EDF, Gaz de France, Hydro-Québec, Johnson & Johnson, Mouvements des Caisses Desjardins, RECYC-QUÉBEC, Rio Tinto Alcan, Rona, SAQ, Total, SAQ et Veolia Environnement.

Enfin, ma reconnaissance va à tous ceux, proches et amis, qui se sont intéressés de près ou de loin à mon projet et qui m'ont soutenue pendant ces deux années; vous m'avez été d'un grand réconfort!

RÉSUMÉ

Les sols sont des ressources naturelles essentielles au cycle de la vie. Leur dégradation est donc problématique puisque la perte de leur qualité d'origine peut avoir des impacts néfastes, comme la dégradation des services rendus par les écosystèmes pour promouvoir la santé humaine. Une des causes contribuant à la dégradation rapide des sols est l'émission de polluants dans l'environnement. Malgré la mise en place de politiques de réhabilitation des sites contaminés fixant des seuils réglementaires en fonction des usages des sols, la complexité dans la composition des sols induit qu'il est difficile d'estimer si, suite à une remédiation, le sol retrouve ses fonctionnalités d'origine et si toute toxicité due à la présence des contaminants est éliminée pour les écosystèmes et les humains. Cette difficulté est principalement rencontrée, lorsque les contaminants sont sous forme de mélanges complexes et/ou des composés persistants dans les sols.

Bien que la littérature regorge d'études sur le développement d'indices d'évaluation de la qualité des sols, la détermination d'un indice utilisant des indicateurs biologiques et mesurant à la fois de manière qualitative et quantitative les effets toxiques des contaminants dans les sols relève encore du défi. Pour être pertinent, un tel indice de qualité doit être sensible aux différents niveaux de contaminations, être adapté à tout type de contaminations, même les plus complexes, et être applicable à tout type de sols.

Pour évaluer l'effet des contaminants dans les sols, il est proposé de mesurer la stabilité des fonctions enzymatiques dans un sol, via l'indice de stabilité relative du sol (RSSI : « Relative Soil Stability Index »). Le calcul de cet indice se base sur la réponse dynamique d'enzymes extracellulaires, impliquées dans les réactions qui se produisent au sein des cycles biogéochimiques (C, N, P, S) régulant le cycle de la vie, face à une perturbation thermique, sur une période de temps donnée. Néanmoins, cet indice présente des lacunes dont 1) l'éventuelle stimulation ou inhibition de l'activité enzymatique par la présence de contaminants dans le sol qui n'est pas prise en compte dans le calcul; et 2) la comparaison entre les valeurs de RSSI qui est difficile à faire sans la présence d'une référence.

Ce projet de maîtrise se propose de pallier ces lacunes en adaptant l'outil de mesure de la stabilité enzymatique à tout contexte de contamination. L'indice qui en découle a été renommé: le RSSIr (« Relative Soil Stability Index using a Reference soil »). L'hypothèse de recherche sur

laquelle se base le projet est la suivante : *L'évaluation quantitative de la stabilité relative du sol via le RSSIr permet de détecter l'impact d'une contamination complexe aux hydrocarbures sur la qualité des sols en distinguant différents niveaux de concentrations, et cela quel que soit le type de sol.* Deux objectifs ont été ciblés : 1) Tester l'outil RSSIr et vérifier sa capacité à évaluer la qualité de sols de différents types et niveaux de contamination complexe; et 2) Vérifier l'utilisation de l'outil RSSIr dans le cadre d'un cas réel, pour évaluer la qualité de sols ayant subi des traitements biologiques de remédiation suite à une contamination. La contamination choisie pour ces expériences consistait en des mélanges complexes d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), composés organiques persistants et difficilement dégradables.

Dans un premier temps, trois sols de textures différentes (loam argilo-sableux, sol argileux, loam sableux) ont été contaminés artificiellement. Chaque type de sol a donné lieu à cinq échantillons de différents niveaux de contamination (0; 0,17; 1,70; 24 et 60 mL créosote.kg⁻¹ de sol sec), nommés C₀, C₁, C₂, C₃ et C₄, correspondant théoriquement à des concentrations en HAP respectives de 0, 87, 870, 12 432 et 31 173 mg total HAP.kg⁻¹ de sol sec. Dans un second temps, des sols contaminés principalement par des HAP ont été prélevés le long d'une chaîne de traitements biologiques (avant traitement, après co-compostage, pendant le traitement de phytoremédiation). Un échantillon témoin a également été prélevé.

Pour répondre aux deux objectifs, le schéma expérimental appliqué était semblable. Une perturbation thermique ponctuelle (60°C, 24 heures) a été appliquée aux échantillons de sols. L'impact de cette perturbation a été suivi sur les potentiels d'activités de trois enzymes (protéase, uréase, arylsulfatase) sur une période de 12 jours, puis quantifié par le calcul de valeurs RSSI et RSSIr. Le calcul d'une valeur RSSI se base sur la comparaison du travail qu'une enzyme produit dans un sol contaminé à la suite d'une perturbation avec le travail qu'elle accomplit dans le même sol contaminé mais non perturbé. Quant au RSSIr, la référence du sol est modifiée : le calcul d'une valeur RSSIr se base sur la comparaison du travail qu'une enzyme accomplit dans un sol contaminé à la suite d'une perturbation avec le travail qu'elle produit dans le même sol non contaminé et non perturbé (sol de référence). Des analyses statistiques ont été utilisées pour interpréter les résultats.

Avec les sols contaminés artificiellement, contrairement à l'outil RSSI, le RSSIr montre des résultats intéressants : calculé à partir du suivi des potentiels de la protéase et de l'uréase, il

permet de différencier les sols contaminés par des niveaux faibles de ceux contaminés par des niveaux élevés de créosote. La protéase est l'enzyme qui présente la plus grande stabilité dans les sols faiblement contaminés (indices calculés supérieurs à 100 %). Dans les sols hautement contaminés, la stabilité de cette enzyme est inhibée, en particulier dans le sol argileux (indices calculés de $7,3 \pm 8,3$ % dans le sol contaminé C₃ contre $184,3 \pm 17,2$ % dans le sol non contaminé C₀). Quant aux valeurs de RSSIr mesurées avec l'uréase, dans les sols faiblement contaminés, celles-ci ne dépassent pas le seuil de $53,7 \pm 5,9$ % (valeur enregistrée pour le loam argilo-sableux contaminé C₂), l'activité de l'uréase étant inhibée par la chaleur thermique appliquée. Globalement, il est observé que les mesures de stabilités basées sur les activités de la protéase et l'uréase décroissent avec l'augmentation du niveau de contamination. Toutefois, ces tendances varient différemment dans les trois sols testés, confirmant ainsi que l'effet toxique des HAP change avec la composition du sol et notamment avec le contenu en matière organique (MO) ou en argile.

Dans les sols de terrain, les concentrations mesurées confirment le rendement des traitements : des diminutions de 91 ± 4 % du contenu en HAP, suite au traitement de co-compostage et de 89 ± 3 % du contenu en C₁₀-C₅₀ entre le traitement de co-compostage et le traitement pendant phytoremédiation sont observées. Les valeurs de RSSIr, calculées à partir du suivi des potentiels de la protéase et de l'arylsulfatase, sont sensibles aux niveaux de contamination et aux traitements de bioremédiation appliqués. Les outils mesurant les stabilités enzymatiques dans les sols après traitements (co-compostage et phytoremédiation) présentent des valeurs largement supérieures à 100 % pour les mesures de RSSIr et légèrement inférieures à ce seuil pour les mesures de RSSI. Ces mesures de stabilité reflètent ainsi une nette amélioration de la stabilité fonctionnelle après les traitements. Cependant, les valeurs de stabilité du sol de référence peuvent atteindre des valeurs largement inférieures à celles calculées pour des sols contaminés : par exemple pour l'arylsulfatase un RSSIr de $25,4 \pm 2,7$ % dans le sol témoin (non contaminé) et un RSSIr de $48,7 \pm 10,5$ % dans le sol contaminé avant traitement sont calculés. Ainsi les résultats obtenus introduisent l'importance à accorder dans le choix du sol de référence. En effet, l'application de traitements biologiques participe aux changements de la structure et de la composition des sols et rend ainsi discutable le choix du sol de référence, ainsi que la méthode de mesure de la stabilité enzymatique dans un sol.

Finalement, le projet a permis de conclure tant sur les capacités de l'outil RSSIr à être un bon indice de qualité que sur ses perspectives d'outil écotoxicologique pour mesurer les effets toxiques des HAP sur les microorganismes. Pour faire suite à ce projet, le développement de la méthodologie peut se poursuivre dans les axes d'améliorations suivants : optimisation dans l'établissement des courbes dose-réponse, investigation sur les facteurs de variation de l'outil (en particulier ceux de la composition des sols), de l'âge de la contamination, ainsi que du type de contaminants.

ABSTRACT

Soils are natural and essential resources for the life cycle. Their degradation is therefore problematic, as a loss in their original quality can have negative impacts such as the degradation of ecosystem services to promote human health. The emission of pollutants in the environment represents one of the causes for rapid soil degradation. Despite established regulations for contaminated sites rehabilitation which define contaminant limits based on soil use, the complex nature of soils leads to difficulty in judging whether a soil recovers to its initial functionality after remediation, and whether the contaminant toxicity is suppressed for the ecosystems and humans. This difficulty is mostly found for contaminations by complex mixtures and/or persistent chemical compounds in soils.

While literature is overwhelmed with studies on the development of indices for soil quality evaluation, determining an index using biological indicators and measuring the toxic effects of contaminants in soils both quantitatively and qualitatively still remains a challenge. To be relevant, such a quality index has to be sensitive to various contamination levels, be adaptable to any contamination context -even the most complex ones-, and be applicable to any type of soil.

To evaluate the effect of contaminants in soils, this project proposes to measure soil enzymatic functions using the Relative Soil Stability Index (RSSI). In order to calculate this index, the dynamic response of extracellular enzymes, involved in reactions occurring in the biogeochemical cycles (C, N, P, and S), regulating the life cycle is monitored over a period of time when submitted to a thermal perturbation. Nevertheless, this index bears some deficiencies: 1) eventual stimulation or inhibition of enzyme activity due to the presence of contaminants in soil is not taken into account in the calculations, and 2) without a reference, the comparison between RSSI-values is difficult.

This master's thesis proposes to overcome the deficiencies mentioned above by adapting the tool for measuring enzymatic stability to any contamination context. The resulting index is renamed "Relative Soil Stability Index using a Reference soil" (RSSIr). The research hypothesis of this project is *the quantitative evaluation of relative soil stability using RSSIr, which allows for the detection of the impact of complex-hydrocarbon contamination on soil quality by discriminating different concentrations levels, regardless of soil type*. Two main objectives are addressed: 1) testing the RSSIr tool and verifying its ability to measure the quality of different

soil types and complex contamination scenarios; and 2) implementing the RSSIr tool in real scenarios for evaluating the quality of soil bioremediation. The selected site for these experiments is contaminated by PAH (polycyclic aromatic hydrocarbon) mixtures which are persistent organic compounds and difficult to degrade.

Firstly, three soils of various grain size mixtures (sandy clay loam, clay, sandy loam) were artificially contaminated. Each soil type lead to five samples with different contamination levels (0; 0.17; 1.70; 24 and 60 mL creosote. dry soil kg⁻¹), named C₀, C₁, C₂, C₃ and C₄, respectively, corresponding to theoretically respective PAH concentrations of 0, 87, 870, 12 432 and 31 173 mg total PAH. dry soil kg⁻¹. Secondly, contaminated soil samples, (mostly by PAH) were collected at various points along the biological treatment process (prior to treatment, after co-composting, during phytoremediation), along with a control soil sample. For both types of soil samples the experimental process was similar. A thermal perturbation (60°C, 24 hours) was applied to the soil samples. The impact of this perturbation was then monitored throughout a 12-day period by measuring the potential activity of three enzymes (protease, urease, arylsulfatase), and subsequently quantified by calculating RSSI and RSSIr values. The calculation of a RSSI value is based on the comparison made between enzyme activity in a contaminated soil following perturbation, and enzyme activity in the same contaminated soil, but not perturbed. As for the RSSIr tool, the reference soil is modified: the calculation of a RSSIr value is based on the comparison between the enzyme activity in a contaminated soil following a perturbation and the enzyme activity in the same uncontaminated and non-perturbed soil (the reference soil). Statistical analyses were used to examine the results.

With artificially contaminated soils, the RSSIr shows more interesting results compared to the RSSI tool: calculated from the protease and urease potential monitoring, the RSSIr allows for discriminating between low and high creosote contaminated soils. Protease shows the best stability in the low contaminated soils (stability index values higher than 100 %). In highly contaminated soils, the stability of this enzyme is inhibited, particularly in clay (values of 7,3 ± 8,3 % in the contaminated C₃ soil sample versus 184,3 ± 17,2 % in the non-contaminated C₀ soil sample). As for the RSSIr values measured with urease, in low contaminated soils values do not exceed the threshold of 53,7 ± 5,9 % (value obtained for the contaminated C₂ sandy clay loam); urease activity is inhibited by the applied thermal stress. Overall stability values based on protease and urease decrease when contamination levels increase. These trends however vary in

the three soils that were tested; this confirms that the toxic effects of PAHs change with soil composition, and specifically with varying organic matter or clay content.

In the site soil samples, the measured concentrations confirmed the efficiency of treatment: a decrease in PAH concentrations, up to 91 ± 4 % after co-composting treatment, and decrease of $C_{10}-C_{50}$ concentration of up to 89 ± 3 % between co-composting and phytoremediation treatments. RSSIr values were sensitive to contamination levels and to applied bioremediation treatments, calculated from the monitoring of protease and arylsulfatase potentials. Like the previous study, tools measuring enzymatic stabilities in soils after treatment (co-composting and phytoremediation) present values noticeably greater than 100 % when calculated with the RSSIr, and slightly lower than this threshold when calculated with the RSSI. These stability measurements therefore reflect a clear enhancement of functional stability after treatment. Moreover, stability values of the reference soil reach values significantly lower than those calculated for contaminated soils. For example, using arylsulfatase, an RSSIr value of $25,4 \pm 2,7$ % was obtained in the control soil sample (non-contaminated) and a RSSIr value of $48,7 \pm 10,5$ % was calculated for the contaminated soil sample. Consequently, the results showed the importance of reference soil choice. Biological treatment applications can lead to changes in soil structure and composition, making the choice of the reference soil, and the method to measure the enzymatic stability in a soil, rather arguable.

Finally, the project allows concluding on both the abilities of the RSSIr tool to be a good quality index and its perspectives as an ecotoxicological tool to evaluate the toxic effect of PAHs on microorganisms. Following this project, the index development method may be improved: notably, optimization in the establishment of dose-response curves, investigation on the factors of the tool variations (especially parameters from soil composition), on the contamination age and also contamination type.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT	VIII
TABLE DES MATIÈRES	XI
LISTE DES TABLEAUX.....	XVI
LISTE DES FIGURES.....	XVII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XIX
LISTE DES ANNEXES.....	XXI
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	2
1.1 Les sols des ressources dégradables.....	2
1.1.1 Rôle et fonctions des sols.....	2
1.1.2 La dégradation des terres.....	3
1.1.3 La pollution des sols aux hydrocarbures, et en particulier aux mélanges complexes de HAP	3
1.2 Évaluation de la qualité/santé des sols	8
1.2.1 Définitions essentielles.....	8
1.2.2 Critères de quantification de qualité et/ou santé des sols.....	9
1.2.3 Les indicateurs de qualité/santé des sols	9
1.2.4 Indices de qualité testés sur des sols contaminés aux hydrocarbures	23
1.2.5 Le concept de stabilité fonctionnelle des sols	26
1.3 Conclusion de la revue et ouverture sur le projet.....	31

CHAPITRE 2	HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE	33
2.1	Hypothèse de recherche	33
2.2	Objectifs	33
2.3	Sous-objectifs et organisation du mémoire	34
CHAPITRE 3	MÉTHODOLOGIE	35
3.1	Premier objectif : Vérifier la capacité de l'outil à évaluer la qualité de sols contaminés par différents niveaux de contamination et de textures différentes	35
3.1.1	Plan expérimental adopté	35
3.1.2	Conditionnement des sols à l'étude : contamination artificielle des sols	38
3.1.3	Méthodologie appliquée pour répondre au 1 ^{er} objectif	38
3.1.4	Résumé du déroulement des opérations et analyses au laboratoire pour chaque sol	44
3.2	Second objectif : Vérifier la capacité de l'outil à évaluer la qualité de sol avec un historique de contamination et ayant subi des traitements biologiques de remédiation	45
3.2.1	Plan expérimental	45
3.2.2	Conditionnement des sols de terrain	46
3.2.3	Méthodologie appliquée pour répondre au 2 nd objectif	46
3.2.4	Résumé du déroulement des opérations et analyses au laboratoire pour chaque sol	48
3.3	Comparaison rapide des approches méthodologiques des objectifs	49
CHAPITRE 4	RÉSULTATS : ÉVALUATION DE LA STABILITÉ FONCTIONNELLE DE SOLS CONTAMINÉS PAR UN MÉLANGE COMPLEXE D'HYDROCARBURES	50
4.1	Influence de la créosote sur les potentiels d'activités enzymatiques	50
4.2	Effet de la perturbation thermique sur les sols	53

CHAPITRE 5	EVALUATING THE ENZYMATIC FUNCTIONAL STABILITY OF COMPLEX HYDROCARBON-CONTAMINATED SOIL	55
5.1	Abstract	55
5.2	Introduction	56
5.3	Materials and methods	58
5.3.1	Soil property characterization	58
5.3.2	Chemical analysis of the creosote solution and soil creosote spiking.....	58
5.3.3	Experimental design.....	59
5.3.4	Enzyme assay monitoring	59
5.3.5	PAH and C10-C50 soil extraction and analysis	60
5.3.6	Enzymatic stability calculation	61
5.3.7	Statistical analysis	62
5.4	Results and discussion.....	62
5.4.1	Soil physicochemical property analysis	62
5.4.2	RSSIr vs. RSSI sensitivity to contamination levels	63
5.4.3	Influence of soil type on the RSSIr	68
5.5	Conclusion.....	69
5.6	Acknowledgements	69
5.7	References	70
CHAPITRE 6	RÉSULTATS : UTILISATION DE L'OUTIL POUR ÉVALUER LA QUALITÉ DE SOLS EN COURS DE BIOREMÉDIATION.....	73
6.1	Caractérisation des sols étudiés.....	73
6.1.1	Composition des sols.....	73
6.1.2	Composantes chimiques.....	75
6.1.3	Caractérisation de la contamination présente sur le site	78

6.2	Sensibilité de l'activité enzymatique à la contamination et aux traitements biologiques..	80
6.2.1	Les potentiels d'activité enzymatique dans les sols contaminés et en cours de bioremédiation.....	80
6.2.2	Influence des contaminants en présence sur les potentiels d'activité enzymatique...	81
6.2.3	Conclusion sur l'utilisation des potentiels d'activité enzymatique.....	83
6.3	Effet de l'application d'une perturbation thermique sur le potentiel de l'activité enzymatique mesuré dans les sols.....	83
6.4	Effet de la contamination et des traitements de bioremédiation sur la mesure de la stabilité enzymatique dans les sols.....	86
6.4.1	La stabilité fonctionnelle des sols mesurée via l'outil RSSIr.....	86
6.4.2	La stabilité fonctionnelle des sols mesurée via l'outil RSSI.....	89
6.4.3	Discussion sur les deux méthodes d'évaluation de la stabilité fonctionnelle	91
6.5	Conclusion et recommandations	93
6.5.1	L'impact de la contamination dans les sols et l'efficacité des traitements biologiques appliqués.....	93
6.5.2	Les possibilités de mesures de stabilité enzymatique	93
CHAPITRE 7	DISCUSSION GÉNÉRALE	95
7.1	Comparaison et discussion des résultats des deux études.....	95
7.1.1	Le contexte des études.....	95
7.1.2	Les principaux résultats.....	97
7.1.3	Les interférences rencontrées lors des mesures enzymatiques.....	98
7.2	Forces et faiblesses des outils de mesure de stabilité enzymatique (RSSI versus RSSIr) en tant qu'indices de qualité.....	99
7.2.1	Deux indices de stabilité enzymatique : le RSSIr versus le RSSI.....	99
7.2.2	Le RSSIr est-il un bon indice de qualité?.....	101

7.3	Importance dans le choix du sol de référence : le sol témoin	102
7.4	Les perspectives de l’outil RSSIr en tant qu’outil écotoxicologique	103
CONCLUSION		105
1.	Contributions du projet.....	105
2.	Recommandations pour la suite des travaux	106
3.	Perspectives dans les champs d’application de l’indice.....	107
BIBLIOGRAPHIE		108
ANNEXES		121

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1-1 : Critères, tirés de l'Annexe 2 de la <i>Politique de protection des sols et de réhabilitation des sols contaminés</i> (MDDEP, 2002)	5
Tableau 1-2 : Propriétés physico-chimiques des seize HAP prioritaires listées par l'US EPA, tiré et adapté de (Mackay <i>et al.</i> , 1992)	6
Tableau 1-3 : Indicateurs de qualité/santé des sols utilisés dans la littérature	11
Tableau 1-4 : Rôles et fonctions de certaines hydrolases dans les sols.....	19
Tableau 1-5 : Indices de résistance, récupération et taux de récupération issus de la littérature ...	28
Tableau 2-1 : Sous-objectifs et organisation des résultats dans le mémoire	34
Tableau 3-1 : Équivalence des concentrations et doses théoriques calculées	36
Tableau 5-1 : Physicochemical properties and theoretical concentrations in the natural soils. Values are represented as mean \pm s.e., n = 3.....	63
Tableau 6-1 : Caractérisation physique (texture, composition, CRC) et pH des sols de la Compagnie	74
Tableau 6-2 : Composantes chimiques (CT, COT, CIT, NTK) des sols de la Compagnie	76
Tableau 6-3 : Analyse de corrélation entre les composantes chimiques des sols	77
Tableau 6-4 : Analyse de corrélation entre les potentiels d'activités enzymatiques et les concentrations des sols (avant traitement, après traitement par co-compostage, pendant traitement par phytoremédiation)	82
Tableau 7-1 : Comparaison du contexte des deux études réalisées et récapitulatif des résultats importants.....	96
Tableau 7-2 : Forces et faiblesses des outils mesurant la stabilité fonctionnelle enzymatique; les signes « + » représentant la force de l'indice; les signes « - » une faiblesse	100
Tableau 7-3 : Réponse aux critères d'un bon indice de qualité énoncés par Doran et Zeiss (2000)	102

LISTE DES FIGURES

- Figure 1-1 : Exemple de la réponse d'une fonction face à une perturbation, appliquée juste avant le temps t_0 , adapté et modifié de (Herrick et Wander, 1998; Seybold *et al.*, 1999; Orwin et Wardle, 2004; Tugel *et al.*, 2005). La courbe supérieure correspond à la réponse du sol contrôle (C) et celle inférieure correspond à la réponse du même sol après avoir subi une perturbation (P). La mesure de la résistance se fait en général au temps t_0 , alors que la résilience peut se mesurer à plusieurs temps t_x27
- Figure 3-1 : Déroulement des expériences au laboratoire (planification réalisée pour chaque sol)44
- Figure 3-2 : Déroulement des expériences au laboratoire pour les sols de terrain.....48
- Figure 4-1 : Potentiels d'activité enzymatique ponctuels (jour 1) de la protéase, l'uréase et l'arylsulfatase par type de sol et niveau de contamination; les valeurs non connectées avec la même lettre étant significativement différentes, d'après le test LSD sur les moyennes ($n = 3$; $p < 0,05$)51
- Figure 5-1 : RSSI and RSSIr scores based on protease (A), urease (B) and arylsulfatase (C) activities obtained for each soil type and contamination level. For each enzyme and each soil type, contamination levels not connected by the same letter are significantly different, when using LSD Mean test ($n = 3$; $p < 0.05$). Creosote levels C_0 , C_1 , C_2 , C_3 and C_4 represent respectively 0; 0.17; 1.70; 24 and 60 mL creosote. dry soil kg^{-1} 66
- Figure 5-2 : Protease and urease activities of heat-perturbed soils (plain lines) and unperturbed soils (dashed lines), for contaminated soils (black symbols) and clean soils (white squares). Example curves of contaminated soils are presented for levels C_1 (triangles) and C_4 (diamonds) for sandy clay loam (A, B), clay (C, D) and sandy loam (E, F). Arrows indicate the day of heat application (day 2). Values are represented as mean \pm s.e. ($n = 3$).67
- Figure 5-3 : RSSIr scores variation as the function of creosote concentrations for the enzyme protease in sandy clay loam (circles), clay (squares) and sandy loam (triangles); Creosote concentrations are expressed in total PAH $\text{mg.dry soil kg}^{-1}$ and C_{10} - C_{50} concentrations are expressed in $\text{mg } C_{10}$ - $C_{50}.\text{dry soil kg}^{-1}$ ($n = 3$).69

- Figure 6-1 : Concentrations en HAP et en C₁₀-C₅₀ dans les sols contaminés avant traitement (AVT), après co-compostage (COP), pendant phytoremédiation (PHY) et dans le sol témoin (TEM); les valeurs non connectées avec la même lettre étant significativement différentes, d'après le test LSD sur les moyennes (n = 3; p < 0.05); les données étant transformées en log(x) pour l'analyse78
- Figure 6-2 : Potentiels d'activité enzymatique ponctuels de la protéase, l'uréase et l'arylsulfatase dans les sols contaminés avant traitement (AVT), après co-compostage (COP), pendant phytoremédiation (PHY) et le sol témoin (TEM); les valeurs non connectées avec la même lettre étant significativement différentes, d'après le test LSD sur les moyennes (n = 6; p < 0,05)80
- Figure 6-3 : Suivi des potentiels d'activité de la protéase (A), de l'uréase (B) et de l'arylsulfatase (C) dans des sols ayant subi une perturbation thermique (P) représentés par des lignes continues et dans les mêmes sols non perturbés (NP) représentés par des lignes discontinues à différentes étapes de restauration avant traitement (AVT), après co-compostage (COP), pendant phytoremédiation (PHY) et témoin (TEM)84
- Figure 6-4 : RSSIr obtenus pour la protéase, l'uréase et l'arylsulfatase dans les sols contaminés avant traitement (AVT), après co-compostage (COP), pendant phytoremédiation (PHY) et sol témoin (TEM); les valeurs non connectées avec la même lettre étant significativement différentes, d'après le test LSD sur les moyennes (n = 6; p < 0,05)87
- Figure 6-5 : RSSI obtenus pour la protéase, l'uréase et l'arylsulfatase dans les sols contaminés avant traitement (AVT), après co-compostage (COP), pendant phytoremédiation (PHY) et sol témoin (TEM); les valeurs non connectées avec la même lettre étant significativement différentes, d'après le test LSD sur les moyennes (n = 6; p < 0,05)89

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

2,4-D	Acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique
C	Carbone
CaCl ₂	Chlorure de calcium – Calcium chloride
CEAEQ	Centre d’expertise en analyse environnementale du Québec
CEC	Capacité d’échange cationique
CIT	Carbone inorganique total
COT	Carbone organique total
CRC	Capacité de rétention au champ
CT	Carbone total
EPA	Environmental Protection Agency
HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
HCl	Acide chlorhydrique – Hydrochloric acid
KCl	Chlorure de potassium – Potassium chloride
K _{oe}	Coefficient de partition octanol – eau
LCPE	Loi canadienne sur la protection de l’environnement
MDDEP	Ministère du développement durable, de l’environnement et des parcs
N	Azote
NTK	Azote total de Kjeldahl
P	Phosphore
PCP	Pentachlorophénol
PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbon
PNUE	Programme des Nations Unies pour l’environnement
RSSI	Relative Soil Stability Index

RSSIr	Relative Soil Stability Index using a Reference soil
S	Soufre
SiO ₂	Oxyde de silicium – Silicon oxide
SSSA	Soil Science Society of America
TC	Total carbon
TCA	Acide trichloroacétique
TIC	Total inorganic carbon
TKN	Total Kjeldahl Nitrogen
TOC	Total organic carbon
USDA	United States Department of Agriculture
WHC	Water holding capacity

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 – RÉCAPITULATIF DES ÉTUDES RÉCENTES DE LA LITTÉRATURE.....	121
ANNEXE 2 – PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX.....	128
ANNEXE 3 – COURBES DE SUIVIS ENZYMATIQUES	180
ANNEXE 4 – RÉGRESSIONS STATISTIQUES.....	184
ANNEXE 5 – ÉTABLISSEMENT DE COURBES DOSE-RÉPONSE.....	185
ANNEXE 6 – ÉTAPES DE CALCULS ET INCERTITUDES.....	186

INTRODUCTION

Les sols jouent un rôle essentiel dans le cycle de la vie par leurs échanges avec l'atmosphère, le soleil et les écosystèmes (Doran, 2002) et par la mise en œuvre de multiples fonctions (Nortcliff, 2002). Ressources naturelles non renouvelables, ils sont loin d'être inépuisables et peuvent se dégrader rapidement (Nortcliff, 2002; Bastida *et al.*, 2008). En effet, soumis à de multiples pressions d'origine anthropique, il en résulte une perte de leurs qualités d'origine qui peut engendrer des modifications de leurs propriétés. Les impacts de ces modifications, par exemple la dégradation des services rendus par les écosystèmes à l'homme, peuvent être considérables (Millenium Ecosystem Assessment, 2005).

L'émission de substances chimiques dans l'environnement contribue à la dégradation rapide de la qualité des sols; et la présence de contaminants dans les sols est souvent responsable d'impacts néfastes pour le bien-être de l'homme et des écosystèmes (PNUE, 2007). C'est pourquoi, depuis les trois dernières décennies, des politiques ont été élaborées pour réglementer l'usage et la réhabilitation des sites contaminés. Les réglementations existantes sont essentiellement basées sur des seuils maximums de concentrations de polluants conçus pour garantir des impacts minimums sur les écosystèmes et/ou la santé humaine. Néanmoins, elles ne garantissent pas le maintien de la fonctionnalité originelle des sols. Si quelques méthodologies ont été développées pour estimer la qualité et la fonctionnalité d'un sol, la détermination d'un indice permettant d'évaluer simplement la qualité de sols contaminés et de quantifier l'impact des contaminants sur les fonctionnalités d'un sol reste encore un défi à relever.

L'objet de ce mémoire, organisé en six chapitres, est de contribuer à ces réflexions en testant l'efficacité d'un nouvel indice, récemment élaboré. Le Chapitre 1 présente une revue de littérature axée sur la problématique de la qualité de sols contaminés, et plus spécifiquement par des hydrocarbures, ainsi qu'un inventaire critique des méthodologies existantes pour évaluer la qualité des sols. Au Chapitre 2 sont définis l'hypothèse de recherche et les objectifs spécifiques au projet. Le Chapitre 3 décrit la méthodologie employée pour atteindre les objectifs. Les résultats obtenus sont ensuite exposés dans les Chapitres 4, 5 et 6. Enfin une discussion générale sur l'ensemble du projet fait l'objet du Chapitre 7 et une conclusion synthétise les principaux résultats et formule des recommandations pour la suite des travaux.

CHAPITRE 1 REVUE DE LA LITTÉRATURE

Cette revue de la littérature est axée autour de deux grandes parties abordées par la problématique : les sols en tant que ressources dégradables et l'évaluation de la qualité des sols dans un contexte de contamination organique complexe d'hydrocarbures persistants dans l'environnement. Brièvement, la revue présente: 1) les fonctions des sols, 2) leur dégradation, 3) le sort des contaminants dans les sols, 4) les notions de qualité/santé des sols, 5) des indicateurs et indices biologiques de la littérature, et enfin 6) l'approche de la stabilité fonctionnelle.

1.1 Les sols des ressources dégradables

Les sols, matrices complexes essentielles à la vie, renferment des écosystèmes et jouent un rôle majeur pour la survie et le maintien de ceux-ci sur Terre. Comme l'eau et l'air, les sols ne sont pas des ressources inépuisables. Utilisés à des fins inappropriés, ils peuvent se dégrader irréversiblement à court terme et ne pas se régénérer (Nortcliff, 2002; Bastida *et al.*, 2008).

1.1.1 Rôle et fonctions des sols

Les sols sont des systèmes multiphasiques complexes et hétérogènes, composés d'air, d'eau, et de solides (sable, limon, argile, matière organique (MO), nutriments, écosystèmes, etc.). En outre, les sols sont des médias ouverts et dynamiques, échangeant de la matière et de l'énergie avec l'atmosphère, la biosphère et l'hydrosphère (Sposito, 2000) et sont dotés d'une multitude de fonctions dont la liste varie selon les auteurs. Selon Nortcliff (2002), ils doivent pouvoir accomplir cinq fonctions principales de base :

- ✓ Offrir un habitat physique, chimique et biologique pour les organismes vivants;
- ✓ Réguler les flux d'eau, le stockage et le recyclage des cycles des nutriments et d'autres éléments;
- ✓ Maintenir les activités et diversités biologiques pour subvenir à la croissance des plantes et la productivité des animaux;
- ✓ Filtrer, tamponner, transformer, immobiliser et détoxifier les substances organiques et inorganiques;
- ✓ Fournir un support mécanique aux organismes vivants et à leurs structures.

Ces fonctions sont déterminantes pour le fonctionnement du cycle biologique qui a un impact majeur sur le bien-être humain: les nutriments des sols jouent un rôle essentiel dans l'équilibre des écosystèmes qui sont eux-mêmes la base de services rendus à l'homme (production de nourriture, de biens de confort et consommation, etc.) (Millenium Ecosystem Assessment, 2005).

1.1.2 La dégradation des terres

La dégradation d'un sol correspond à la perte ou à la réduction de ses fonctions (Blum, 1997) et se traduit principalement par une baisse de sa « qualité », se manifestant par une diminution de ses capacités productives et de ses capacités de régulation environnementale (Lal *et al.*, 1997), contribuant ainsi au dérèglement des cycles biologiques (PNUE, 2007). Un dérèglement de ces cycles peut altérer les cycles des nutriments générant ainsi une dégradation des écosystèmes et indirectement un impact sur le bien-être de l'homme (Millenium Ecosystem Assessment, 2005). La dégradation peut être d'origine naturelle (séisme, érosion, etc.) ou anthropique par une mauvaise gestion issue des activités humaines (agriculture intensive, déforestation, industrialisation, pollution, etc.). Une remise en état s'avère souvent difficile (PNUE, 2007).

Les émissions de substances chimiques dans l'environnement sont un des facteurs importants de la dégradation des sols. Émises dans l'environnement (air, eau ou sol), elles migrent dans les sols en fonction de leurs propriétés. C'est pourquoi l'analyse d'un sol montre souvent des associations complexes de multiples polluants. Par exemple, les hydrocarbures rejetés dans l'environnement contiennent de nombreux composés organiques en proportions variables constitués essentiellement de carbone et d'hydrogène ainsi que de petites quantités d'azote, de soufre et d'oxygène (Le Conseil canadien des ministres de l'environnement, 2001).

1.1.3 La pollution des sols aux hydrocarbures, et en particulier aux mélanges complexes de HAP

Les hydrocarbures constituent la pollution la plus répandue au Canada (Le Conseil canadien des ministres de l'environnement, 2001). Principalement générés par l'industrie pétrolière et le transport, certains hydrocarbures, comme les aromatiques polycycliques (HAP), sont problématiques pour l'environnement (Gouvernement du Canada *et al.*, 1994b; U.S. EPA, 2008a).

1.1.3.1 Sources de contamination

Les HAP résultent de la combustion incomplète de la MO (U.S. EPA, 2008a) qui peut provenir de sources naturelles (feux de forêt, éruptions volcaniques, etc.) ou anthropogéniques (cokeries, usines à gaz, industries du bois et pétrolières, fumées de cigarettes, utilisation de combustibles, etc.) (Wilcke, 2000; Samanta *et al.*, 2002; INERIS, 2005). Au Canada, les feux de forêt représentent une source importante de contamination; suivis par les produits traités à la créosote, les déversements de produits pétroliers, les usines métallurgiques et les cokeries (Gouvernement du Canada *et al.*, 1994b). La créosote, source majeure de pollution aux HAP, pendant plus de 150 ans, dans l'environnement canadien (Gouvernement du Canada *et al.*, 1994b) et nord-américain, car utilisé comme agent de préservation du bois (U.S. EPA, 2008b), est issue de la distillation du goudron de houille et composée approximativement de 85 % de HAP (les principaux étant le phénanthrène, l'acénaphène, le naphthalène, le fluorène et le fluoranthène), 10 % de composés phénoliques et 5 % de composés hétérocycles (World Health Organization, 2004). Les composés de la créosote se répandent facilement dans les sols et migrent vers les eaux souterraines (World Health Organization, 2004; U.S. EPA, 2008b). Ce sont également des composés problématiques en raison de leurs propriétés cancérogènes pour les humains et du risque potentiellement toxique pour les espèces (World Health Organization, 2004; U.S. EPA, 2008b). Selon de récentes études, ce type de contamination dans les sols est encore d'actualité (Brooks, 2004; Jackson *et al.*, 2006; Evans *et al.*, 2009). Le processus de restauration des sites contaminés s'avère longue et n'est jamais totale (Fraser *et al.*, 2008).

1.1.3.2 Réglementation

En vertu de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement (LCPE)*, les HAP appartiennent à la *Liste des substances d'intérêt prioritaire*, qui répertorie les substances potentiellement nocives pour l'environnement et la santé humaine (Gouvernement du Canada *et al.*, 1994b), tout comme les sources d'HAP : huiles de moteur usées et créosote (Gouvernement du Canada *et al.*, 1994c; Gouvernement du Canada *et al.*, 1994a). Conformément à la *LCPE*, la créosote est aussi assujettie à la *Loi sur les produits antiparasitaires* d'Agriculture Canada (Gouvernement du Canada *et al.*, 1994c). Aujourd'hui, bien qu'essentiellement utilisée pour les voies de chemin de fer, son utilisation est surveillée (MDDEP, 2009). Quant aux sols contaminés, la *Politique de protection des sols et de réhabilitation des sols contaminés* régulièrement mise à

jour par le ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs (MDDEP) fixe des seuils maximums en contaminants (Tableau 1-1) pour la restauration de sites au Québec.

Tableau 1-1 : Critères, tirés de l'Annexe 2 de la *Politique de protection des sols et de réhabilitation des sols contaminés* (MDDEP, 2002)

HAP	Critères (en mg.kg ⁻¹ sol sec)		
	A	B	C
Naphtalène	0,1	5	50
Acénaphène	0,1	10	100
Acénaphthylène	0,1	10	100
Anthracène	0,1	10	100
Fluorène	0,1	10	100
Phénanthrène	0,1	5	50
Benzo(a)anthracène	0,1	1	10
Chrysène	0,1	1	10
Fluoranthène	0,1	10	100
Pyrène	0,1	10	100
Benzo(a)pyrène	0,1	1	10
Benzo(b)fluoranthène	0,1	1	10
Benzo(k)fluoranthène	0,1	1	10
Dibenzo(h)anthracène	0,1	1	10
Benzo(g,h,i)pérylène	0,1	1	10
Indeno(1,2,3-cd)pyrène	0,1	1	10

Avec : critère A : limite de quantification analytique pour les organiques et maximale acceptable pour des sites à vocation agricole; critère B : limite maximale pour des sites à vocation résidentielle, récréative et institutionnelle; critère C : limite maximale pour des sites à vocation commerciale non situés dans une zone résidentielle, et pour des sites à usage industriel.

1.1.3.3 Propriétés des HAP et leur sort dans l'environnement

Les plus communs sont les seize HAP répertoriés dans la liste des polluants prioritaires pour la remédiation établie par l'Agence de protection de l'environnement des États-Unis (EPA) (Keith et Telliard, 1979). Ces composés organiques ont la particularité de posséder au moins deux noyaux aromatiques responsables de leur très grande stabilité dans l'environnement.

Dans les sols, les HAP peuvent avoir différents sorts ou devenir :

- ✓ Volatilisation : migration et dégradation des substances dans l'air;
- ✓ Adsorption : association des composés aux particules du sol (comme les colloïdes);
- ✓ Lixiviation : solubilisation et mobilité des composés dans l'eau du sol;

- ✓ Décomposition chimique : dégradation chimique de composés ou association des composés avec des molécules aux surfaces des particules du sol et formation de complexes;
- ✓ Biodégradation : dégradation des composés par la biomasse microbienne;
- ✓ Bioaccumulation : adsorption dans les lipides des organismes vivants et accumulation dans la chaîne alimentaire;

Toutefois, le devenir de ces composés dans les sols dépend de leurs propriétés physico-chimiques, dont les principales sont répertoriées dans le Tableau 1-2.

Tableau 1-2 : Propriétés physico-chimiques des seize HAP prioritaires listées par l'US EPA, tiré et adapté de (Mackay *et al.*, 1992)

HAP	Formule brute	Nombre de cycles	Poids moléculaire (g/mol)	Solubilité à 20 °C (mg/L)	Pression de vapeur saturante à 20 °C (Pa)	Log (K_{oe} *) à 20 °C
Naphtalène	C ₁₀ H ₈	2	128.2	31	36.8	3.37
Acénaphène	C ₁₂ H ₁₀	3	154.2	3.8	1.52	3.92
Acénaphthylène	C ₁₂ H ₈	3	152.2	16.1	4.14	4
Anthracène	C ₁₄ H ₁₀	3	178.2	0.045	0.0778	4.54
Fluorène	C ₁₃ H ₁₀	3	166.2	1.9	0.715	4.18
Phénanthrène	C ₁₄ H ₁₀	3	178.2	1.1	0.113	4.57
Benzo(a)anthracène	C ₁₈ H ₁₂	4	228.3	0.011	6.06.10 ⁻⁴	5.91
Chrysène	C ₁₈ H ₁₂	4	228.3	0.002	8.4.10 ⁻⁷	5.6
Fluoranthène	C ₁₆ H ₁₀	4	202.3	0.26	8.72.10 ⁻³	5.22
Pyrène	C ₁₆ H ₁₀	4	202.3	0.132	0.0119	5.18
Benzo(a)pyrène	C ₂₀ H ₁₂	5	252.3	0.0038	2.13.10 ⁻⁵	6.04
Benzo(b)fluoranthène	C ₂₀ H ₁₂	5	252.3	0.0015	6.7.10 ⁻⁵	5.8
Benzo(k)fluoranthène	C ₂₀ H ₁₂	5	252.3	0.0008	4.12.10 ⁻⁶	6
Dibenzo(h)anthracène	C ₂₂ H ₁₄	5	278.3	0.0006	9.16.10 ⁻⁸	6.75
Benzo(g,h,i)pérylène	C ₂₁ H ₁₂	6	264.3	0.062	1.3.10 ⁻⁸	6.6
Indeno(1,2,3-cd)pyrène	C ₂₂ H ₁₂	6	276.3	0.062	1.3.10 ⁻⁸	6.6

* K_{oe} : coefficient de partition entre l'octanol et l'eau

Les propriétés physico-chimiques des HAP confirment qu'ils sont de nature hydrophobe (faible solubilité) et ont tendance à s'adsorber très facilement sur le carbone organique et les particules du sol (fort coefficient K_{oe}). Par ces deux grandes propriétés, les HAP sont des composés organiques récalcitrants et persistants dans les sols. Leur persistance dans l'environnement augmente généralement avec leur poids moléculaire et donc avec le nombre de cycles aromatiques présents dans leurs molécules (Liu *et al.*, 2007; Haritash et Kaushik, 2009). Le temps de contact des HAP avec le sol, fonction notamment de l'âge de la contamination,

influe sur les facteurs de persistance et sort des composés. Généralement, ces composés sont problématiques dans l'environnement puisqu'ils ont un effet toxique sur la flore et la faune et s'accumulent par la suite facilement dans la chaîne alimentaire (Samanta *et al.*, 2002). La manière la plus économique et la plus efficace de les traiter est le recours à la bioremédiation (Liu *et al.*, 2007; Haritash et Kaushik, 2009). Les traitements qui utilisent l'excavation suivie d'une incinération ou d'un confinement des sols contaminés aux HAP sont coûteux et ne règlent pas complètement le problème de toxicité. Les techniques de bioremédiation, quant à elles, ne permettent généralement pas leurs dégradations complètes, mais elles aident à les transformer en d'autres composés, moins toxiques pour l'environnement, tout en utilisant moins d'énergie (Haritash et Kaushik, 2009). Les processus de biostimulation (ajouts de nutriments et oxygène au milieu) et de bioaugmentation (ensemencement du milieu avec une souche microbienne) peuvent rendre les contaminants plus biodisponibles (solubles dans les phases aqueuses), et accessibles aux microorganismes du sol, pour dégradation par les microorganismes (Haritash et Kaushik, 2009).

1.1.3.4 Effet des propriétés des sols sur le devenir des HAP dans les sols

Les sols renferment de nombreuses composantes (physiques, chimiques, biologiques), essentielles pour l'équilibre des fonctions du sol (Nortcliff, 2002; Karlen *et al.*, 2003). Nombreuses, les propriétés des sols dépendent souvent les unes des autres et certaines influent sur le sort des HAP : composition particulaire du sol, capacité d'échange cationique (CEC), présence de MO, pH, âge de la contamination. Le choix de ne présenter qu'uniquement ces propriétés se justifie par la littérature : elles ont en effet un rôle essentiel sur le degré d'adsorption et/ou de biodisponibilité des HAP (Hwang et Cutright, 2002; Maliszewska-Kordybach, 2005; Li *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010). La texture du sol, déterminée par la distribution granulométrique des particules minérales (argile [0 à 2 μm], limon [2 à 50 μm], sable [50 μm à 2 mm]) (Natural Resources Conservation Service, 2009), représente une indication sur la répartition des HAP dans le sol : les particules les plus fines (argileuses et limoneuses) retiennent la majorité des HAP (Krauss et Wilcke, 2002; Li *et al.*, 2010); conférant ainsi une hétérogénéité dans la distribution des HAP dans le sol (Krauss et Wilcke, 2002). Les particules inorganiques, telles les argileuses, ainsi que celles organiques, telles les substances humiques (constituants de la MO à teneur de 60 % - 70 %) ont des propriétés « colloïdales » favorisant l'adsorption des HAP, leur

immobilisation dans le sol, et par conséquent la baisse de leur biodisponibilité en vue d'une dégradation (Ortega-Calvo *et al.*, 1997; Hwang et Cutright, 2002). Une faible dégradation des HAP a été observée dans les sols associés à de forts contenus en carbone organique total (COT), les HAP s'accumulant en effet, par séquestration dans les sols, phénomène qui s'accroît avec l'augmentation du contenu en MO et COT (Yang *et al.*, 2010). Le pH joue aussi un rôle sur l'accumulation des HAP dans le sol : l'acidité d'un sol ne favorise pas la dégradation des HAP par les microorganismes (Maliszewska-Kordybach *et al.*, 2009). De même qu'un pH basique ne permet pas toujours une meilleure lixiviation des HAP dans le sol, notamment lorsqu'il y a présence de MO dissoute (ou acides humiques dissouts) (Kim et Osako, 2003). Quant à l'âge de la contamination, ce paramètre peut jouer sur la biodégradation et/ou la diminution de la biodisponibilité. Par leur persistance dans l'environnement, la diminution de la biodisponibilité des HAP dans les sols priment avec l'âge de la contamination. Adsorbés sur la MO et séquestrés dans le sol, les HAP deviennent, au fur et à mesure du temps, inaccessibles aux organismes du sol et aussi aux enzymes extracellulaires (Alexander, 2000; Reid *et al.*, 2000; Wilcke, 2000). Une étude récente suggérait même qu'avec le temps, le sort des HAP dépendait plus des propriétés des sols que de celles des contaminants (Maliszewska-Kordybach, 2005).

1.2 Évaluation de la qualité/santé des sols

1.2.1 Définitions essentielles

Dans la littérature, les termes « qualité » et « santé » sont souvent utilisés comme synonymes. Le terme « qualité » est toutefois conseillé pour définir la capacité d'un sol à répondre à un besoin spécifique (ou à réaliser une fonction spécifique), alors que le terme « santé » est plutôt utilisé pour définir la capacité d'un sol à être un écosystème dynamique et à maintenir l'ensemble de ses fonctions vitales (Pankhurst *et al.*, 1997; Doran et Zeiss, 2000). Un sol en bonne santé implique un effet de durabilité dans le temps; il doit maintenir, sur le long terme, ses capacités à produire et instaurer un environnement de qualité et à assurer la santé des écosystèmes (Doran et Safley, 1997). La définition de la qualité d'un sol généralement retenue dans la littérature est celle établie par le comité de la Société des Sciences du Sol des États-Unis (SSSA : *Soil Science Society of America*) en 1996 (Kirchmann et Andersson, 2001) : la qualité d'un sol se définit comme étant « la capacité d'un sol à fonctionner, à l'intérieur des frontières d'un écosystème,

pour soutenir la productivité des plantes et des animaux, maintenir ou améliorer la qualité de l'eau et de l'air, soutenir la santé humaine et supporter les habitations humaines », et plus simplement comme étant « la capacité d'un sol à fonctionner » (Karlen *et al.*, 1997). Ce comité a par ailleurs établi que les mots « qualité » et « santé » ne devraient pas être utilisés de manière équivalente, bien que plusieurs auteurs continuent de le faire (Bécaert et Deschênes, 2006). La définition du comité SSSA a été reprise par Doran et Safley (1997) qui définissent la santé d'un sol par la « capacité d'un sol à fonctionner en continu dans le temps comme un système dynamique et vivant ». Dans le cadre de contaminations, l'évaluation de la santé/qualité d'un sol doit pouvoir rendre compte de l'effet des contaminants en présence et, plus spécifiquement, mesurer leur toxicité (ou leurs effets néfastes) sur les fonctions du sol (Bécaert et Deschênes, 2006).

1.2.2 Critères de quantification de qualité et/ou santé des sols

La littérature déborde d'études sur le développement d'indices quantitatifs pour l'évaluation de la qualité/santé des sols (Bécaert et Deschênes, 2006; Bastida *et al.*, 2008). Pourtant au vu de la complexité des fonctions d'un sol, la quantification apparaît difficile à réaliser (Gil-Sotres *et al.*, 2005). Un indice de qualité doit montrer les capacités d'un sol à accomplir ses fonctions de manière durable (Karlen *et al.*, 2003). Outre cela, l'indice devrait également refléter à la fois le dynamisme des propriétés des fonctions du sol, ainsi que les propriétés biologiques, chimiques, physiques et leurs interactions (Karlen *et al.*, 2003). Aussi la capacité d'un sol à fonctionner ne peut être mesurée directement. Il faut, pour cela, faire appel à des indicateurs permettant d'évaluer ces fonctions. Selon Doran et Zeiss (2000), un bon indicateur de qualité/santé d'un sol doit respecter cinq critères. Il doit être : 1) Sensible aux changements; 2) Corrélé avec les fonctions du sol; 3) Impliqué dans les processus des écosystèmes; 4) Interprétable et utile pour les utilisateurs; 5) Facile et peu coûteux à mesurer.

1.2.3 Les indicateurs de qualité/santé des sols

Habituellement, une diminution des concentrations en polluants permet de juger le rendement d'une décontamination (Maila et Cloete, 2005), mais ne donne aucune indication sur les effets néfastes (toxiques) des contaminants sur les fonctions du sol potentiellement diminués ou augmentés. Les indicateurs basés sur les propriétés des sols ou les écosystèmes sont des moyens

autres que les concentrations pour tester l'impact des contaminants sur la qualité d'un sol. Dans la section qui suit, est présentée une revue critique d'indicateurs et fonctions biologiques.

1.2.3.1 Les indicateurs de qualité _ Généralités

Il existe des indicateurs de qualité des sols de type « physique » (texture, densité, etc.), et « chimique » (MO, pH, C, N, P, etc.) (Doran et Safley, 1997). Mais les biologiques sont plus dynamiques et sujets au changement à court terme, par conséquent plus aptes à interpréter la qualité d'un sol (Bastida *et al.*, 2008). Les indicateurs biochimiques de qualité de sol présentés au Tableau 1-3 sont applicables pour des sols dégradés au sens large, et pas uniquement contaminés.

Tableau 1-3 : Indicateurs de qualité/santé des sols utilisés dans la littérature

Indicateurs	Commentaires
Bioessais	Ces tests standardisés évaluent l'effet d'une exposition à une contamination à une espèce définie. De tels tests sont souvent utilisés pour évaluer la toxicité des contaminants dans les sols et tout particulièrement des hydrocarbures, sur la faune, la flore ou les microorganismes du sol (Maila et Cloete, 2005). (voir section 1.2.3.2)
MO (en mg de carbone organique. kg ⁻¹ sol sec)	La MO contenue dans le sol est un indicateur de type « chimique » souvent utilisé et considéré comme important par certains auteurs (Gregorich <i>et al.</i> , 1997; Knoepp <i>et al.</i> , 2000; de la Paz Jimenez <i>et al.</i> , 2002). Malgré le fait que ce soit un facteur facilement mesurable, la MO dépend pourtant trop de la composition du sol (Nortcliff, 2002), n'est pas suffisamment sensible (Pascual <i>et al.</i> , 1999) et est difficilement quantifiable dans un contexte de contamination aux hydrocarbures, puisque la présence de composés organiques fait augmenter le COT.
Biomasse microbienne (en mg C.kg ⁻¹ sol sec)	Indicateur le plus relié par les auteurs au concept de qualité d'un sol (Gil-Sotres <i>et al.</i> , 2005), la biomasse microbienne est une source de nutriments qui supporte beaucoup de fonctions, comme celles impliquées dans les cycles de transformation des éléments (C,N,P,S) (Nannipieri <i>et al.</i> , 2002). Indicateur de suivi du C organique dans les sols (Carter <i>et al.</i> , 1999) et de changement dans la gestion du sol (Knight et Dick, 2004). (voir section 1.2.3.3)
Quotient métabolique (qCO₂) : Ratio de la respiration sur la biomasse	Bon indicateur de l'activité microbienne le plus utilisé de la littérature (Bastida <i>et al.</i> , 2008), sensible aux impacts des conditions climatiques (température, pH), des changements de gestion du sol, et aux contaminations métalliques (Winding <i>et al.</i> , 2005). (voir section 1.2.3.3)
Minéralisation de N (en mg N. kg ⁻¹ sol sec. jour ⁻¹)	Indicateur de l'immobilisation de l'ammonium par les microorganismes du sol en mesurant la conversion de l'azote organique en azote ammoniacal, c'est un paramètre qui s'est avéré sensible aux perturbations sur le terrain (Knoepp <i>et al.</i> , 2000), aux contaminations par des métaux lourds (Tscherko <i>et al.</i> , 2007). Son utilisation, en tant qu'indicateur de qualité du sol, a cependant, aussi été critiquée (Gil-Sotres <i>et al.</i> , 2005). (voir section 1.2.3.3)
Nitrification (en mg N. kg ⁻¹ sol sec. jour ⁻¹)	Paramètre mesurant l'oxydation de l'ammonium, il devrait être préféré à celui de la minéralisation selon Winding et collaborateurs (2005). (voir section 1.2.3.3)
Potentiel d'activité enzymatique (en mg substrat. kg ⁻¹ sol sec. h ⁻¹)	Catalyseurs biologiques pour des réactions microbiennes dans le sol, les enzymes sont des indicateurs de contrôle de la libération des nutriments pour la croissance des plantes et des microorganismes (Burns, 1978). Elles sont étroitement associées à la MO, à la biomasse et à l'activité microbienne (Dick, 1997; Tate, 2002; Knight et Dick, 2004). (voir section 1.2.3.4)

Dans le cadre de contamination aux hydrocarbures, les fonctions et indicateurs pour évaluer la qualité des sols ainsi que les contextes étudiés varient selon les auteurs : contamination unique à complexe, différences dans les choix des hydrocarbures (HAP, pentachlorophénol (PCP), diesel, gazoline, pétrole brut, créosote...), et d'une étude à l'autre (Tableau A.1- 1 et Tableau A.1- 2, Annexe 1). À ce jour il n'y a aucun test standard permettant l'évaluation directe de l'impact

d'une contamination aux hydrocarbures sur les sols. Toutefois, il existe des indicateurs reliés à l'activité microbienne, ainsi que des bioessais réalisés sur les écosystèmes.

1.2.3.2 Les indicateurs biologiques _ Les bioessais

Pour estimer le seuil de toxicité des contaminants dans un sol conjugué au suivi du rendement, en termes de réduction des concentrations, de la restauration des sols, certains auteurs préconisent l'utilisation de bioessais. Les réponses des écosystèmes permettent l'identification d'effets toxiques ou non des hydrocarbures présents dans le sol sur les récepteurs (Maila et Cloete, 2005). Les paragraphes suivants mettent principalement en lumière les trois niveaux trophiques usuels.

❖ Effet des hydrocarbures sur les vers de terres

Le paramètre suivi est, en général, le taux de survie ou de mortalité des vers de terre (*Eisenia Fetida* ou *Lumbricus rubellus*). Ainsi le taux de mortalité des vers de terre tend à augmenter face à des sols contaminés par des hydrocarbures, tels du pyrène (Brown *et al.*, 2004), du phénanthrène (Shin et Kim, 2001) ou du diesel (Shin et Kim, 2001). Toutefois, la toxicité des contaminants sur les vers de terre dépend du type d'hydrocarbures et de leur composition : la présence d'un seul HAP dans le sol aurait un effet plus toxique à court terme sur les vers de terre que la présence de diesel (Shin et Kim, 2001), et les mélanges d'hydrocarbures contenant plus de HAP seraient moins toxiques pour les vers de terre que ceux contenant moins de HAP (Salanitro *et al.*, 1997; Dorn *et al.*, 1998). Dans des sols en cours de bioremédiation, l'effet toxique des hydrocarbures est variable : une augmentation de la mortalité des vers de terre a déjà été observée, après application de traitements biologiques dans des sols contaminés initialement par des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques (Dawson *et al.*, 2007), ou par des HAP (Phillips *et al.*, 2000). Ces résultats peuvent s'expliquer par la formation de métabolites intermédiaires, produits issus de la dégradation de contaminants, parfois plus toxiques que les hydrocarbures. Les effets toxiques sur les vers de terre varient d'une étude à l'autre et dépendent entre autres des hydrocarbures en présence, des propriétés du sol et des espèces-récepteurs.

❖ Effet des hydrocarbures sur les plantes

Les paramètres suivis sont, en général, la germination des graines ou l'élongation des racines (Maila et Cloete, 2005) de plantes de différents types : seigle (*Seccale cereale L.*), blé (*Triticum vulgare L.*), laitue (*Lactuca sativa L.*), maïs (*Zea mays L.*), chou (*Brassica olearacea*), etc. Face à

des contaminations aux hydrocarbures, la toxicité de sols contaminés (HAP ou diesel) testée n'a pas été vérifiée sur tous les types de plantes (Maliszewska-Kordybach et Smreczak, 2003a; Plaza *et al.*, 2005). L'effet toxique des contaminants dans les sols est aussi parfois annulé, les plantes s'adaptant à leur nouvel environnement et/ou utilisant la contamination comme source d'énergie. Ainsi une inhibition de la germination de graines de cresson (*Lepidium sativum* L.) pouvait être enregistrée juste après une contamination (au diesel), puis ne plus être détectée après plusieurs mois (Serrano *et al.*, 2009). Aussi l'application de traitements biologiques dans des sols contaminés aux hydrocarbures permet généralement d'améliorer la germination des graines de plantes. En effet, l'inhibition de la germination de graines d'herbes ivraies (*L. perenne*), de moutarde (*B. alba*) et de pois (*P. sativum*) était presque complètement annulée après application de traitements biologiques dans des sols contaminés aux hydrocarbures (Dawson *et al.*, 2007). Malgré cela, bien que la bioremédiation réduise la toxicité des contaminants sur les plantes, l'effet inverse peut également être observé : la germination de graines de laitue (*Lactuca Sativa*) pouvait être aussi bien stimulée qu'inhibée pendant la dégradation de HAP dans des sols (Hamdi *et al.*, 2007). La phytotoxicité des hydrocarbures ne peut être prédite (les effets pouvant être inhibés ou stimulés en comparaison avec le sol contrôle).

❖ Effet des hydrocarbures sur les microorganismes

Un des tests couramment utilisés pour évaluer l'impact de sols contaminés aux hydrocarbures sur les microorganismes est le Microtox® en phase solide (mesure de la réduction de lumière émise par des bactéries luminescentes dans les sols contaminés). Ce test a déjà montré des effets d'inhibition de la luminescence de bactéries en présence d'hydrocarbures dans des sols. Ces effets d'inhibition de l'intensité lumineuse traduisent les effets toxiques des contaminants sur les bactéries luminescentes. Ainsi, sur les bactéries *Photobacterium phosphoreum*, ce test détectait la toxicité d'une contamination élevée aux hydrocarbures pétroliers (47 500 mg. kg⁻¹ sol sec) (Plaza *et al.*, 2010) ou d'une contamination de produits pétroliers bruts (contenant entre 140 et 960 mg naphtalène. kg⁻¹ sol sec) (Dorn *et al.*, 1998). Le test Microtox® en phase solide (sur les *Vibrio fischeri*) a aussi montré une certaine sensibilité progressive en fonction des niveaux de contamination aux hydrocarbures : un effet inhibitoire croissant de la luminescence des bactéries a été observé dès 23 mg.kg⁻¹ sol sec (Brohon *et al.*, 2001). Le suivi de la bioremédiation de sols contaminés avec des hydrocarbures pétroliers a déjà montré des résultats encourageants quant à la diminution de la toxicité de sols contaminés sur les microorganismes (Dorn et Salanitro, 2000;

Plaza *et al.*, 2005). En revanche, les tests Microtox® n'ont pas toujours démontré leur utilité pour distinguer significativement les sols contaminés des mêmes sols après traitement : la toxicité des contaminants (créosote), sur les *Photobacterium phosphoreum* était plus élevée dans les sols en cours et fin de traitement que dans ces mêmes sols avant traitement (Phillips *et al.*, 2000).

Bien que le test Microtox® en phase solide montre des sensibilités différentes en fonction des niveaux de contamination (faibles et fortes), il présente plusieurs limites dont les suivantes : un seul type de bactéries est ciblé (les luminescentes), les bactéries visées sont aquatiques, des interférences de coloration avec les constituants du sol peuvent se produire, etc.

❖ Conclusion sur les bioessais

L'utilisation de bioessais pour vérifier l'efficacité de traitements de restauration est une approche attrayante. Pourtant, la trop grande variabilité de réponses des écosystèmes aux contaminations rend leur utilisation critiquable, puisqu'il est difficile de se fier aux résultats. Quant au test Microtox®, il présente l'intérêt de cibler un niveau trophique intéressant, mais il ne permet pas de généraliser les résultats à toute la communauté microbienne indigène du sol.

1.2.3.3 Les indicateurs biologiques _ Les fonctions impliquant les microorganismes

Au-delà du biotest Microtox®, l'étude des fonctions microbiennes dans le sol est à la mode. Dans le cadre de la restauration des sols contaminés par des hydrocarbures, la communauté microbienne indigène présente un intérêt par rapport aux autres niveaux trophiques : elle peut potentiellement intervenir dans la dégradation des composés organiques. Ci-dessous sont présentées les fonctions accomplies principalement par les communautés microbiennes et les plus étudiées par les auteurs dans le cadre de contamination aux hydrocarbures.

❖ Croissance de la biomasse microbienne (en mg C. kg⁻¹ sol sec)

La croissance de la biomasse microbienne est sensible aux pollutions aux hydrocarbures : celle-ci était, en effet, inhibée avec la présence de fortes concentrations aux hydrocarbures (diesel, gazoline, pétrole brut, etc.) (Labud *et al.*, 2007; Pena *et al.*, 2007; Serrano *et al.*, 2009). L'inhibition de la croissance de la biomasse peut, cependant, être plus ou moins marquée selon le niveau de contamination. En effet, la quantité de biomasse diminuait dans des sols moyennement à fortement pollués par des hydrocarbures, mais pas dans certains sols plus faiblement pollués (< 2 120 mg. kg⁻¹ sol sec) (Megharaj *et al.*, 2000). Il a également été observé une quantité de

biomasse microbienne plus élevée dans des sols contaminés que dans leurs homologues non contaminés (Margesin *et al.*, 2000a). Quant à l'ajout d'amendements organiques (fertilisants, nutriments, etc.), il tend généralement à stimuler la biomasse. Ainsi, la quantité de la biomasse diminuait suite à une contamination aux hydrocarbures, mais augmentait de manière significative après l'application d'amendements organiques pour les traitements biologiques (Dawson *et al.*, 2007; Tejada *et al.*, 2008).

Bien que la croissance de la biomasse microbienne soit inhibée par la présence d'hydrocarbures dans les sols, dans le cadre d'une bioremédiation, il est difficile de conclure que son augmentation soit due essentiellement à la dégradation des composés, les amendements organiques contribuant eux aussi à une nouvelle biomasse. Aussi, n'importe quel C (organique ou inorganique) est mesuré.

❖ La respiration microbienne (en mg de C-CO₂. kg⁻¹ sol sec. jour⁻¹)

La respiration microbienne est plutôt stimulée par la présence de contaminants aux hydrocarbures. Elle semblait augmenter avec de faibles ou fortes concentrations et n'importe quels hydrocarbures : diesel (Margesin *et al.*, 2000a; Labud *et al.*, 2007; Pena *et al.*, 2007), HAP (Margesin *et al.*, 2000a; Maliszewska-Kordybach et Smreczak, 2003a), pétrole brut (Labud *et al.*, 2007), gazoline (Labud *et al.*, 2007; Tejada *et al.*, 2008). Cette stimulation de la respiration peut s'expliquer par la résistance de certains microorganismes, responsables de la dégradation des composés, à la toxicité des hydrocarbures, ou bien à la minéralisation de cellules microbiennes n'ayant pas survécu à la contamination (Margesin *et al.*, 2000a; Labud *et al.*, 2007; Pena *et al.*, 2007). Pour une telle contamination organique, la respiration microbienne n'est pas une mesure adaptée. Aussi, l'ajout d'amendements organiques et de fertilisants lors d'une bioremédiation augmentait également la respiration microbienne que ce soit des contaminations aux HAP, diesel (Margesin *et al.*, 2000a) ou gazoline (Tejada *et al.*, 2008). Cette augmentation de la respiration pouvait s'expliquer par la stimulation de la croissance microbienne due aux substrats ajoutés lors des amendements organiques au sol (Tejada *et al.*, 2008). En contradiction, la respiration microbienne n'était pas toujours significativement augmentée par les traitements biologiques dans des sols contaminés par des hydrocarbures (Dawson *et al.*, 2007).

Quoi qu'il en soit, une contamination organique et/ou une présence d'amendements organiques ont tendance à stimuler la respiration microbienne d'un sol. Contrairement à

l'inhibition d'une fonction microbienne, la stimulation de la respiration ne permet pas de conclure quant à l'impact des composés toxiques ou des traitements biologiques.

❖ Le quotient métabolique (en $\text{mg C-CO}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{ C-Biomasse par jour}$)

En présence d'hydrocarbures, le quotient métabolique (ratio de la respiration microbienne sur la croissance de biomasse) augmente fortement (Caravaca et Roldán, 2003; Pena *et al.*, 2007). Pourtant, l'interprétation du quotient métabolique peut être controversée : il ne semble pas évident qu'une faible valeur soit le signe d'une activité microbienne équilibrée et une forte valeur, celui d'une activité microbienne perturbée (Sparling, 1997). Un fort quotient peut aussi être obtenu, pour les mêmes raisons citées ci-dessus pour la respiration microbienne. L'ajout des nutriments organiques dans le sol contaminé influençait aussi la stimulation du quotient métabolique de sols contaminés par du diesel ou des HAP (Margesin *et al.*, 2000a). À l'inverse, d'autres études ont montré qu'à une exception près l'application de différents traitements ne permet pas toujours d'augmenter le quotient métabolique (Margesin *et al.*, 2000b; Silva *et al.*, 2009).

L'interprétation des résultats du quotient métabolique est particulièrement controversée dans la littérature et de ce fait, semble difficilement exploitable.

❖ La minéralisation de N (en $\text{mg N} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ sol sec} \cdot \text{jour}^{-1}$)

Les sols non contaminés possèdent une minéralisation de l'azote significativement plus élevée que dans les sols contaminés avec des hydrocarbures (pétroliers, diesel ou HAP) (Lindstrom *et al.*, 1999; Margesin *et al.*, 2000a; Plaza *et al.*, 2010). Lors d'ajout de fertilisants pendant une bioremédiation de sols contaminés au diesel ou HAP, la minéralisation de l'azote était de nouveau activée et favorisée (Margesin *et al.*, 2000a). Ce phénomène s'explique par la minéralisation des amendements azotés organiques mais aussi par la stimulation des microorganismes pour la dégradation de composés azotés. Dans les sols contaminés par une forte dose de diesel ($10\,000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ sol sec}$), cette stimulation lors de l'application de traitements biologiques était plus marquée que dans des sols contaminés par de plus faibles doses de HAP ($1\,000 \text{ mg par kg sol sec}$) (Margesin *et al.*, 2000a).

Selon Winding et collaborateurs (2005), cette fonction est discutable, étant donné qu'une trop grande diversité de microorganismes relativement insensibles aux perturbations

environnementales est impliquée. Pourtant, le fait de viser l'ensemble des microorganismes du sol impose une certaine prise en compte de la biodiversité dans le sol.

❖ La nitrification ou dénitrification ($\text{mg N.kg}^{-1} \text{ sol sec}$)

Le processus de nitrification, qui transforme l'ammonium/ammoniac en nitrates et qui est une fonction importante du cycle biogéochimique de l'azote est inhibé par la contamination aux hydrocarbures, tels que le diesel, les HAP et les hétérocycles (Deni et Penninckx, 1999; Sverdrup *et al.*, 2002; Płaza *et al.*, 2010). Aussi, lors de traitements des sols par bioremédiation, les amendements d'origine organique nécessitent des sources de nutriments azotés permettant ainsi la stimulation des processus de dénitrification pour la transformation des nitrates en ammonium (Vinas *et al.*, 2005; Vázquez *et al.*, 2009).

Un des inconvénients de ces fonctions est qu'elles ne sont accomplies que par les bactéries spécifiques (nitrifiantes ou dénitrifiantes), et non par toute la communauté microbienne.

❖ Conclusion sur les fonctions microbiennes

Ces fonctions intéressent, puisqu'elles impliquent un niveau trophique présent à même le sol. Pourtant, bien qu'elles soient relativement sensibles aux contaminations dans les sols, elles sont critiquables : certaines se restreignent à certains types de microorganismes, d'autres sont difficilement interprétables, d'autres encore ne permettent pas de différencier une contamination organique d'un amendement en MO, etc. Aussi, l'application de traitements biologiques dans les sols participe à la stimulation et favorise les fonctions microbiennes, jusqu'à parfois laisser place à une mauvaise interprétation : mesure de la biodégradation des composés au lieu d'une indication de stimulation du processus de biodégradation des composés (Maila et Cloete, 2005).

1.2.3.4 Les indicateurs biologiques _ Les enzymes

L'étude des activités enzymatiques est convoitée par les auteurs, et surtout par ceux qui étudient dans le domaine de la contamination aux hydrocarbures. Les enzymes interviennent pour l'accomplissement de certaines fonctions biologiques tout en faisant face aux contraintes environnementales. Leurs activités présentent l'avantage d'évoluer plus rapidement comparativement aux autres fonctions microbiennes en cas de perturbation (Dick, 1997). Les enzymes participent aussi à un grand nombre de fonctions du sol, impliquées dans les cycles biogéochimiques : décomposition de la MO, transformation du COT du sol, libération de

nutriments organiques pour la croissance des plantes, fixation de l'azote, détoxification des substances xénobiotiques, nitrification et dénitrification (Dick, 1997).

❖ Présentation générale des enzymes, en tant qu'indicateurs de qualité

Deux types d'enzymes existent : les intracellulaires (à l'intérieur des cellules viables des microorganismes) et les extracellulaires (à l'extérieur des cellules). La déshydrogénase, intracellulaire, est largement utilisée dans l'évaluation de l'impact d'hydrocarbures sur l'activité biologique dans les sols (Maila et Cloete, 2005). D'autres enzymes souvent utilisées sont les hydrolases, qui sont sécrétées dans la fraction aqueuse du sol. Ces enzymes catalysent les réactions d'hydrolyse et leurs potentiels d'activité sont facilement quantifiables. Par ailleurs, comme l'activité de ces enzymes est spécifiquement liée à l'organisation de la communauté microbienne, à la décomposition des détritiques organiques et aux conditions environnementales (Sinsabaugh *et al.*, 2002), les enzymes sont de bons indicateurs d'évaluation du fonctionnement des microorganismes dans les sols. Le Tableau 1-4 présente les rôles et fonctions d'hydrolases.

Il est à noter que d'autres types d'enzymes existent dans la littérature et se sont parfois avérées sensibles aux contaminations aux hydrocarbures : la fluorescein diacetate (Andreoni *et al.*, 2004; Gianfreda *et al.*, 2005; Plaza *et al.*, 2010), la phosphomonoestérase (Margesin *et al.*, 2000b; Pena *et al.*, 2007; Plaza *et al.*, 2010), la lipase (Riffaldi *et al.*, 2006; Plaza *et al.*, 2010), la catalase (Margesin *et al.*, 2000a; Margesin et Schinner, 2001)...

Toutefois, les hydrolases sont préférées pour leur sensibilité aux changements, leur implication dans les cycles biogéochimiques, leurs méthodes d'analyse et leur usage plus fréquent dans la littérature.

Tableau 1-4 : Rôles et fonctions de certaines hydrolases dans les sols

Enzymes	Cycle	Rôles / Fonctions et Commentaires
Arylsulfatase	S	Catalyseur de la réaction d'hydrolyse des esters sulfates organiques en sulfates (minéralisation de S), elle est produite par les plantes, mais aussi par les microorganismes. Son activité est corrélée avec la biomasse microbienne (Klose <i>et al.</i> , 1999). C'est un indicateur sensible aux contaminations par des métaux lourds (Renella <i>et al.</i> , 2004; Tscherko <i>et al.</i> , 2007) et ayant un certain potentiel dans l'évaluation de sols pollués aux hydrocarbures (Gianfreda <i>et al.</i> , 2005; Scelza <i>et al.</i> , 2007; Serrano <i>et al.</i> , 2009).
β-Glucosidase	C	Produite par une variété d'organismes (plantes, animaux, bactéries, fungi), elle intervient dans l'hydrolyse des β -glucosides en glucose. Elle participe à la dégradation des carbohydrates et procure des sources d'énergie et de substrat pour les microorganismes hétérotrophes (de la Horra <i>et al.</i> , 2003). Son activité est corrélée avec la biomasse microbienne (Knight et Dick, 2004). Souvent étudiée dans le cadre de l'évaluation de la qualité/santé d'un sol (Knight et Dick, 2004; Makoi et Ndakidemi, 2008), c'est un bon indicateur d'activité microbienne pour les sols brûlés ou fertilisés (Ajwa <i>et al.</i> , 1999), pour le changement dans la gestion des sols (Eivazi et Tabatabai, 1990; Bandick et Dick, 1999; Knight et Dick, 2004) et pour les contaminations aux métaux lourds (Tscherko <i>et al.</i> , 2007). Bien qu'étudiée dans le domaine des contaminations aux hydrocarbures, son activité n'a pas toujours montré une bonne sensibilité à de tels contaminants (Gianfreda <i>et al.</i> , 2005; Riffaldi <i>et al.</i> , 2006; Scelza <i>et al.</i> , 2007).
Phosphatase	P	Elle hydrolyse les esters et déshydrate l'acide phosphorique. Elle intervient dans la minéralisation du phosphore inorganique. Bon indicateur de la fertilité d'un sol (Ajwa <i>et al.</i> , 1999; Acosta-Martínez <i>et al.</i> , 2007), son activité est sensible à l'impact du feu dans les sols (Staddon <i>et al.</i> , 1998), ainsi qu'aux sols pollués par des hydrocarbures (Labud <i>et al.</i> , 2007; Pena <i>et al.</i> , 2007; Scelza <i>et al.</i> , 2007; Serrano <i>et al.</i> , 2009).
Protéase	N	Elle transforme les protéines en oligopeptides. C'est une enzyme peu étudiée dans la littérature, mais qui aurait un bon potentiel pour évaluer la fertilité dans les sols (de la Horra <i>et al.</i> , 2003), l'impact de métaux lourds (Effron <i>et al.</i> , 2004; Renella <i>et al.</i> , 2004; Lorenz <i>et al.</i> , 2006) et aussi d'hydrocarbures (Margesin <i>et al.</i> , 2000a; Labud <i>et al.</i> , 2007; Serrano <i>et al.</i> , 2009).
Uréase	N	Responsable de la libération de l'azote inorganique dans le cycle de l'azote, l'uréase catalyse, en effet, la réaction d'hydrolyse de l'urée fertilisante, en libérant de l'azote ammoniacal et du CO ₂ . Son activité est corrélée avec la biomasse microbienne du sol (Klose et Tabatabai, 1999). Enzyme très étudiée dans la littérature pour son rôle dans l'agriculture (Makoi et Ndakidemi, 2008), mais aussi en tant qu'indicateur pour évaluer la qualité de sols contaminés par des hydrocarbures (Margesin <i>et al.</i> , 2000b; Andreoni <i>et al.</i> , 2004; Gianfreda <i>et al.</i> , 2005; Maila et Cloete, 2005; Labud <i>et al.</i> , 2007; Pena <i>et al.</i> , 2007; Serrano <i>et al.</i> , 2009). Bon indicateur d'activité microbienne dans les sols brûlés ou fertilisés (Ajwa <i>et al.</i> , 1999), son activité peut aussi être sensible à la température et à la présence de contaminants métalliques (Yang <i>et al.</i> , 2006).

Dans les sols, l'activité enzymatique d'hydrolases peut provenir d'enzymes qui s'accumulent dans les sols ou de celles provenant de cellules vivantes (Kiss *et al.*, 1975; Dick, 1997). Aussi, les enzymes accumulées dans les sols sont des enzymes dites « libres » et sont principalement

libérées dans le sol par les microorganismes. Elles peuvent aussi provenir de résidus de plantes ou d'animaux. Ces enzymes peuvent s'adsorber sur les particules colloïdales (argileuses ou organiques), ou bien encore s'associer avec les substances humiques de la MO (humus), responsables de leurs stabilisation dans les sols (Kiss *et al.*, 1975; Tate, 2002; Chakrabarti *et al.*, 2004). Un autre intérêt de ces enzymes est lié aux méthodes d'analyse (rapides et peu coûteuses) (Dick, 1997; Nannipieri *et al.*, 2002). Les enzymes sont également très sensibles aux perturbations et changements infligés dans l'environnement (Dick, 1997), leur activité étant influencée par les propriétés des sols (pH, humidité, MO, composition), par la gestion de l'utilisation du sol et les variations du climat (Tate, 2002; Knight et Dick, 2004). Chaque enzyme peut cependant avoir une sensibilité différente aux perturbations dans l'environnement.

❖ Activités enzymatiques dans les sols contaminés aux hydrocarbures

Certains auteurs considèrent que l'activité enzymatique est un indicateur plus sensible que le suivi d'autres paramètres microbiens dans le cadre d'une contamination aux HAP (Maliszewska-Kordybach et Smreczak, 2003a) ou aux hydrocarbures pétroliers comme l'huile de diesel (Li *et al.*, 2007). Une réduction de l'activité enzymatique dans des sols serait le signe d'un effet toxique de la contamination aux hydrocarbures sur les microorganismes (Andreoni *et al.*, 2004). Généralement, l'impact des hydrocarbures sur l'activité biologique, et plus particulièrement l'activité enzymatique dans les sols dépend de paramètres tels que les concentrations et la composition des hydrocarbures, les propriétés des sols (Margesin *et al.*, 2000a; Maliszewska-Kordybach et Smreczak, 2003a; Labud *et al.*, 2007; Pena *et al.*, 2007), ainsi que l'âge de la contamination ou le temps d'exposition (Megharaj *et al.*, 2000; Andreoni *et al.*, 2004).

✓ Effet des types d'hydrocarbures (inhibition et/ou stimulation)

En général, à la suite d'une contamination au diesel, les activités enzymatiques dans le sol (β -glucosidase, arylsulfatase, uréase, protéase, phosphatase) ont tendance à diminuer (Serrano *et al.*, 2009). L'uréase dans le sol était inhibé de 36 % à 79 % par une contamination au diesel (de 0 à 400 mL. kg⁻¹ sol sec) (Pena *et al.*, 2007), et négativement affecté ($r = -0,52$, $p < 0.05$) avec quatre niveaux de concentrations faibles en HAP (0 à 100 mg. kg⁻¹ sol sec) (Gianfreda *et al.*, 2005).

Pourtant, des effets favorables, tels que la stimulation de l'enzyme, peuvent aussi être constatés. Dans une étude, la contamination artificielle d'un sol avec une forte quantité d'huile de

diesel (10 000 mg. kg⁻¹ sol sec) avait augmenté significativement l'activité de l'uréase et de la protéase respectivement de 48 % et 95 % alors qu'une concentration plus faible d'un mélange de deux HAP (phénanthrène et naphthalène à 1 000 mg. kg⁻¹ sol sec) diminuait l'activité de l'uréase de 25 % et augmentait celle de la protéase de 33 % (Margesin *et al.*, 2000a).

✓ Effet des propriétés des sols

La résistance et la récupération de l'activité enzymatique à la suite d'une contamination est spécifique à chaque type de sol (Maliszewska-Kordybach et Smreczak, 2003a). En effet, l'impact des hydrocarbures sur l'activité enzymatique dépend de la composition du sol et surtout du degré d'adsorption des contaminants organiques sur la MO ou l'argile du sol. La présence de MO et d'argile dans les sols réduit la disponibilité aqueuse des contaminants; ce qui se traduit souvent par une plus forte inhibition de l'enzyme dans les sols sableux comparativement aux sols riches en colloïdes organiques et inorganiques qui retiennent plus facilement les contaminants. Labud et collaborateurs (2007) ont étudié l'impact de plusieurs hydrocarbures sur les activités enzymatiques d'hydrolases (uréase, protéase, phosphatase, β -glucosidase) dans des sols argileux et sableux pour deux concentrations (50 000 et 100 000 mg. kg⁻¹ sol sec): les effets d'inhibition causés par les hydrocarbures étaient plus élevés dans le sol sableux que dans celui argileux. Par ailleurs, dans le sol argileux, des stimulations de l'uréase, la protéase et la phosphatase avaient été observées, en particulier avec une contamination au diesel.

✓ Effet de l'âge de la contamination

Dans les sols contaminés, l'âge de la contamination peut induire un effet complémentaire : la séquestration des contaminants organiques sur la MO ou sur les argiles s'accroît dans le temps. Comme dans les sols contaminés artificiellement, les activités de l'uréase étaient diminuées d'environ 10 % à 70 % avec l'augmentation des concentrations en diesel (de 2 150 à 21 400 mg de C₁₀-C₅₀ kg⁻¹ sol sec) (Megharaj *et al.*, 2000) dans des sols exposés à la contamination sur le long terme. Andreoni et collaborateurs (2004) ont comparé l'impact de plusieurs enzymes dans des sols exposés de manière différente à la contamination en HAP (pas ou peu d'exposition, ~0 mg de HAP.kg⁻¹ sol sec; déversement accidentel à moyen terme, ~31 mg de HAP.kg⁻¹ sol sec; et contamination à long terme, ~94 mg de HAP.kg⁻¹ sol sec). Dans cette étude, les potentiels enzymatiques dans les sols avaient été comparés entre eux : plus la présence de HAP était importante, plus le potentiel enzymatique était élevé, que ce soit pour l'arylsulfatase ou l'uréase.

Cependant, cette étude ne permettait pas de conclure sur le fait que l'âge de la contamination eût une influence plus conséquente ou non que le niveau de contamination en lui-même.

❖ Activités enzymatiques dans les sols contaminés aux hydrocarbures et ayant subi des traitements de bioremédiation

Les études menées sur la mesure enzymatique dans les sols ayant reçu des traitements de biorestauration montrent que l'utilisation de différentes méthodes de stimulation pour la biodégradation d'hydrocarbures affecte les paramètres biologiques dans les sols. En effet, certaines études ont montré l'effet positif de l'amendement de MO sur certaines propriétés et activités biologiques du sol : augmentation significative de la biomasse microbienne et des potentiels d'activités de l'arylsulfatase, β -glucosidase, phosphatase, protéase et uréase (Pascual *et al.*, 1999; Riffaldi *et al.*, 2006; Tejada *et al.*, 2008). Après un traitement par bioremédiation de deux sols peu et moyennement contaminés aux HAP, les potentiels de l'arylsulfatase et de la phosphatase avaient significativement augmenté d'environ 30 % à 90 % dans chaque sol (Andreoni *et al.*, 2004). En revanche, seul le potentiel de l'uréase ne montrait aucune différence entre les sols contaminés et leurs homologues après traitement. Andreoni et collaborateurs (2004) expliquaient cette différence par l'interférence potentielle avec la présence de certains métaux lourds. Une autre étude a montré que l'activité de l'uréase n'était pas significativement stimulée ($p < 0,05$), malgré l'ajout de diverses sources de nutriments azotés et phosphorés au sol contaminé par du diesel (Margesin *et al.*, 2000b).

❖ Limites dans l'utilisation des enzymes

Bien que les hydrolases soient sensibles aux contaminations dans les sols, l'utilisation des enzymes demeure critiquée par la communauté scientifique. Les mesures ponctuelles de leurs potentiels ne permettent généralement pas de donner une approche quantitative sur la qualité du sol et sa dégradation causée par la présence de polluants (Trasar-Cepeda *et al.*, 2000; Bécaert et Deschênes, 2006). Des sols contaminés aux hydrocarbures ont parfois montré des potentiels enzymatiques plus élevés que leurs homologues témoins; la quantification de la santé d'un sol via l'activité enzymatique doit donc être complétée par d'autres informations, faisant intervenir entre autres les propriétés biochimiques du sol (biomasse, azote...) (Trasar-Cepeda *et al.*, 2000). Nannipieri et collaborateurs (2002) sont d'avis qu'il faudrait intégrer plusieurs enzymes dans un même indice et non pas une seule, étant donné la diversité des processus métaboliques. Le

recours aux enzymes a aussi été critiqué d'un point de vue méthodologique dans la littérature : leurs potentiels sont déterminés dans des conditions trop optimales (ajustement du pH et de l'humidité du sol et ajout de substrat) (Dick, 1997; Bastida *et al.*, 2008).

1.2.3.5 Conclusion sur les indicateurs biologiques

Pour quantifier la santé d'un sol, la majorité des indicateurs biologiques utilisés proviennent soit de bioessais mesurant les effets sur les écosystèmes, soit des propriétés biochimiques qui se focalisent sur l'activité microbienne ou celle des enzymes du sol. L'utilisation des propriétés biochimiques plutôt que des bioessais offre la possibilité d'observer les différents flux et transferts de la MO et les nutriments entre sols et l'environnement (Gil-Sotres *et al.*, 2005). Cependant, l'utilisation des propriétés biochimiques des sols est complexe, puisqu'il y a un manque de valeurs de références et de standardisation des méthodes pour l'évaluation de la qualité des sols (Gil-Sotres *et al.*, 2005; Bécaert et Deschênes, 2006; Bastida *et al.*, 2008). Cette lacune est justifiée en raison de la trop grande hétérogénéité du sol; et par conséquent l'indice de qualité des sols « idéal » n'existe pas (Karlen *et al.*, 2003). De là, il ressort aussi la difficulté à définir un indice de qualité des sols, étant donné la complexité dans la détermination d'indicateurs appropriés, tout en considérant les applications multiples pour la gestion des sols (Knoepp *et al.*, 2000). Trasar-Cepada et collaborateurs (2008) considèrent que la complexité du comportement des enzymes rend difficile leur utilisation comme indicateurs de la dégradation de sols via leur utilisation. La quantification en un indice pour évaluer la qualité ou la santé d'un sol requiert la prise en compte de plusieurs fonctions et de leurs variations spatio-temporelles face à des changements. Par conséquent, une seule mesure ne suffit pas, puisque plusieurs propriétés et/ou fonctions doivent être prises en compte (Doran et Safley, 1997; Nortcliff, 2002; Karlen *et al.*, 2003). Quelques auteurs ont étudié des propriétés multiples et les ont intégrées dans un même indice par une régression multiple (Trasar-Cepeda *et al.*, 1997; de la Paz Jimenez *et al.*, 2002; Zornoza *et al.*, 2007). Selon eux, l'équilibre entre les différentes propriétés du sol serait ainsi mieux respecté.

1.2.4 Indices de qualité testés sur des sols contaminés aux hydrocarbures

Les indicateurs, comme présentés à la Section 1.2.3, de qualité des sols sont utilisés comme moyen pour mesurer une tendance. Les indices représentent des mesures quantifiées (souvent

calculés par le biais d'indicateurs) permettant un classement. Cette section présente des indices récents utilisés dans la littérature dans le cadre de contamination de sols aux hydrocarbures.

1.2.4.1 Indice quantitatif basé sur l'équilibre biogéochimique du sol

Trasar-Cepada et collaborateurs (1997) ont proposé un indice reflétant l'équilibre d'un sol (Équation 1-1) par le biais d'une régression multiple, en exprimant l'azote total en fonction de la biomasse microbienne, la minéralisation de l'azote et trois potentiels enzymatiques.

Équation 1-1 : Équilibre biogéochimique d'un sol, tirée de Trasar-Cepada et collaborateurs (1997)

$$\begin{aligned} \text{Total } N_c (\times 10^{-3} \text{ mg N par kg de sol sec}) = & \\ & 0.38 \text{ Biomasse microbienne (mg C. kg sol sec}^{-1}) + \\ & 1.40 \text{ Capacité de minéralisation de l'azote (mg N. kg sol sec}^{-1}) + \\ & 13.60 \text{ Potentiel de la phosphomonoestérase } (\mu\text{mol p} - \text{nitrophenol. g sol sec}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) + \\ & 8.90 \text{ Potentiel de la } \beta - \text{glucosidase } (\mu\text{mol p} - \text{nitrophenol. g sol sec}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) + \\ & 1.60 \text{ Potentiel de l'uréase } (\mu\text{mol NH}_3 \cdot \text{g sol sec}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) \end{aligned}$$

Cet indice a été testé sur des sols contaminés aux hydrocarbures (Trasar-Cepada *et al.*, 2000; Pena *et al.*, 2007), en utilisant le ratio N_c/N_k ; où N_c était la quantité d'azote total (mg N total. kg^{-1} sol sec) donnée via l'équation et N_k la quantité d'azote mesurée (mg N de Kjeldahl. kg^{-1} sol sec) par la méthode standard de Kjeldahl. Selon Trasar-Cepada et collaborateurs (2000) et d'après les résultats obtenus avec cet indice, des sols contaminés par des hydrocarbures pétroliers et collectés sur un site industriel à différentes distances d'une conduite de pétrole défectueuse (à distance variable de la fuite, avec ou sans traces apparentes de contamination en surface), ont un effet négligeable sur la qualité biogéochimique du sol. À l'opposé, dans une autre étude où un loam sableux a été contaminé artificiellement par différentes doses de diesel (entre 0 et 400 mL. kg^{-1} sol sec), ce même indice N_c/N_k était fortement corrélé ($p < 0,001$) et décroissait avec la quantité d'huile de diesel : la qualité biogéochimique du sol diminuait avec l'augmentation de la concentration en diesel dans les sols (Pena *et al.*, 2007).

1.2.4.2 Indice qualitatif basé sur l'utilisation de différents niveaux trophiques

Dawson et collaborateurs (2007) ont étudié une batterie d'indicateurs biologiques en considérant plusieurs niveaux trophiques : biomasse microbienne, respiration basale, respiration induisant un substrat, activité de la déshydrogénase, mortalité de vers de terre (*Eisenia fetida* et *Lumbricus terrestris*), germination de graines (moutarde *B. alba*, ivraies *L. perenne*, pois *P. sativum*), etc. Ces derniers ont utilisé une méthode de détermination de la qualité des sols par le biais d'une méthode de pointage inspirée d'une autre étude quantifiant la sensibilité et la robustesse des indicateurs (Andrews *et al.*, 2002). La sensibilité était mesurée en pointant les effets (d'inhibition) significativement négatifs obtenus des sols contaminés en comparaison avec le sol contrôle (non contaminé) : une valeur de 0 était attribuée, lorsqu'il n'y avait pas de différence, une valeur de 1 était attribuée au sol contaminé, en cas de différence significative avec le contrôle et une valeur de 2 était attribuée si le premier sol contaminé montrait un effet significativement différent avec le second sol le moins contaminé, et ainsi de suite. La robustesse de cette méthode informait sur la reproductibilité du test et se déterminait en effectuant le calcul de l'inverse du coefficient de variance (Broos *et al.*, 2005). Les indicateurs retenus (9 sur un total de 21 testés) pour estimer la qualité des sols étaient ceux dont la sensibilité était strictement supérieure ou égale à 1 avec une robustesse supérieure à 20 (Dawson *et al.*, 2007). Pour l'ensemble des tests retenus une note de 1 a été attribuée à la meilleure observation d'un point de vue écologique, puis l'indice de qualité se déterminait par une moyenne des notes associées aux indicateurs pour chaque sol. Cette étude a permis de montrer l'amélioration de la santé écologique d'un sol prélevé près d'une ancienne usine de gaz contaminé avec des hydrocarbures aliphatiques et des HAP (640 mg. kg⁻¹ sol sec) et subissant différents modes de traitements (tels que l'ajout de nutriments et/ou surfactants); et de souligner l'intérêt d'utiliser différents niveaux trophiques pour un même indice (Dawson *et al.*, 2007).

1.2.4.3 Conclusion sur l'usage de ces indices

Bien que l'équation d'équilibre biogéochimique des sols (Trasar-Cepeda *et al.*, 1997) ait montré sa sensibilité pour mettre en évidence des contaminations aux hydrocarbures, cette méthode demande la mesure de plusieurs variables différentes et ponctuelles. La méthode proposée par Dawson et collaborateurs (2007) est intéressante, puisqu'elle intègre divers niveaux trophiques. Cependant elle est qualitative, longue et coûteuse à appliquer, puisqu'elle nécessite la

réalisation de nombreux tests. Ainsi, l'utilisation de ces indices n'est pas basée sur une évaluation plus quantitative qui permettrait de traduire directement la qualité d'un sol et de faire appel à des méthodes plus simples et facilement applicables.

1.2.5 Le concept de stabilité fonctionnelle des sols

Si la santé ou qualité d'un sol peut se définir tout simplement par la capacité d'un sol à accomplir l'ensemble de ses fonctions (Karlen *et al.*, 1997), alors une autre approche intéressante de l'évaluation de la santé d'un sol est la mesure de la stabilité des fonctions d'un sol.

1.2.5.1 Stabilité, résistance et résilience

Le concept de stabilité se définit comme étant la capacité d'un écosystème à résister et récupérer l'ensemble de ses fonctions suite à une perturbation environnementale (Seybold *et al.*, 1999). Il repose essentiellement sur deux composantes : la résistance et la résilience (Pimm, 1984; Griffiths *et al.*, 2001; Orwin et Wardle, 2004). La résistance représente la mesure de l'affectation des fonctions du sol (Pimm, 1984), et elle peut être définie comme la capacité d'un sol à continuer de fonctionner normalement après avoir subi un stress, telle une perturbation environnementale (Herrick et Wander, 1998). La résilience est la vitesse à laquelle le sol récupère et retourne à son état initial (Pimm, 1984), et par conséquent, la capacité d'un sol à récupérer son intégrité fonctionnelle à la suite d'un stress (Herrick et Wander, 1998). Un sol qui récupère la plupart de ses fonctions à la suite d'un stress, possède la capacité de faire face à un changement environnemental; la notion de stabilité dans le temps s'intègre bien dans une optique de développement durable.

Le temps est, en effet, une composante importante. Au cours du temps, un sol subit des changements à la suite de perturbations environnementales (Tugel *et al.*, 2005) et le temps permet de montrer le retour à la stabilité du sol (Ajwa *et al.*, 1999). La Figure 1-1 illustre un exemple de réponse de deux mêmes fonctions dans le temps dont l'une d'entre elles a subi une perturbation. Une perturbation fait référence à des événements ponctuels dans le temps, qui peuvent influencer sur la composition, la morphologie ou la capacité du sol à fonctionner (Tugel *et al.*, 2005). Plusieurs types de perturbations ont été testés pour évaluer la stabilité du sol via la résistance et la résilience. Certains auteurs ont fait subir des perturbations de type climatique à des échantillons

de sol, comme la chaleur, le gel et la sécheresse ou de type anthropogénique telle une contamination métallique.

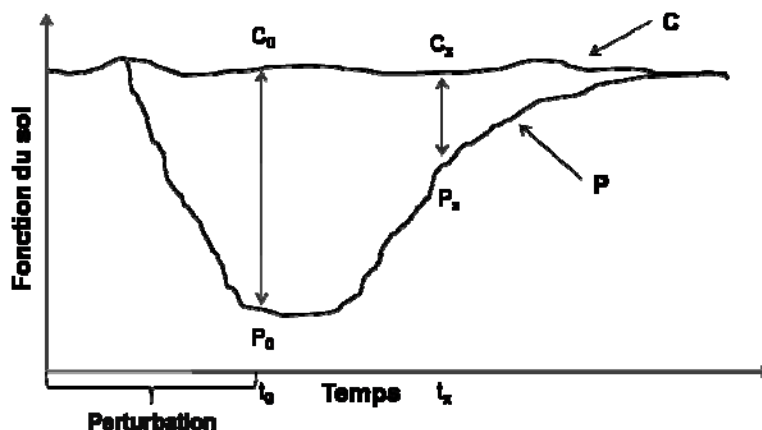


Figure 1-1 : Exemple de la réponse d'une fonction face à une perturbation, appliquée juste avant le temps t_0 , adapté et modifié de (Herrick et Wander, 1998; Seybold *et al.*, 1999; Orwin et Wardle, 2004; Tugel *et al.*, 2005). La courbe supérieure correspond à la réponse du sol contrôle (C) et celle inférieure correspond à la réponse du même sol après avoir subi une perturbation (P). La mesure de la résistance se fait en général au temps t_0 , alors que la résilience peut se mesurer à plusieurs temps t_x .

Bien que certains auteurs aient préconisé l'étude de la stabilité de la MO du sol (Herrick et Wander, 1998) ou du COT (Tugel *et al.*, 2005), la réponse de la fonction la plus utilisée est celle mesurant la minéralisation de résidus de plantes (herbes *L. Perenne* ou orge *Hordeum vulgare*) ajoutées (en $\text{mg CO}_2\cdot\text{g}^{-1}\text{ sol sec}$) (Griffiths *et al.*, 2001; Kuan *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010). Quant à Orwin et Wardle (2004), ils ont étudié la respiration induite par substrat de glucose (en $\text{g CO}_2\text{-C}\cdot\text{g sol sec}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). Concernant les perturbations appliquées, elles différaient selon les auteurs:

- ✓ Perturbation au cuivre à teneur de 500 mg par kg sol sec (Griffiths *et al.*, 2001; Kuan *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010);
- ✓ Perturbation thermique : 40°C sur 18 heures (Griffiths *et al.*, 2001); 50°C sur 24 heures (Kuan *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010) et -20°C sur 18 heures (Griffiths *et al.*, 2001);
- ✓ Séchage à l'air libre pendant 18 heures à 25°C, réduisant le contenu en eau du sol de 55 % à 10 % de sa capacité de rétention au champ (CRC) (Orwin et Wardle, 2004).

Les perturbations de type anthropogénique, comme la contamination au cuivre, sont persistantes, alors que celles de types climatiques proposées sont plutôt de type ponctuel.

1.2.5.2 Quantification de la résistance et de la résilience

Dans la littérature, plusieurs indices de résistance et de résilience ont été définis de manière individuelle. Bien que la résistance soit mesurée au temps qui suit immédiatement la perturbation, la majorité des indices de résilience sont des mesures ponctuelles au cours du temps. Le Tableau 1-5 présente des indices, issus de la littérature, mesurant la résistance, la résilience (ou récupération) et le taux de récupération, suite à l'application d'une perturbation.

Tableau 1-5 : Indices de résistance, récupération et taux de récupération issus de la littérature

Indices		Sources
Résistance	$\frac{P_0}{C_0}$	(Kaufman, 1982; Herrick et Wander, 1998)
	$\left(C_0 - \frac{P_0}{C_0}\right) \cdot 100 \text{ (en \%)}$	(Griffiths <i>et al.</i> , 2001)
	$1 - \frac{2 \cdot C_0 - P_0 }{(C_0 + C_0 - P_0)}$	(Orwin et Wardle, 2004)
	$\int_0^T \frac{1}{T} \frac{P(t)}{C(t)} \cdot 100 \cdot dt \text{ (en \%)}$	(Zhang <i>et al.</i> , 2010)
Résilience ou Récupération	$\frac{P_x - P_0}{C_0 - P_0}$	(Herrick et Wander, 1998; Seybold <i>et al.</i> , 1999)
	$\left(C_x - \frac{P_x}{C_x}\right) \cdot 100 \text{ (en \%)}$	(Griffiths <i>et al.</i> , 2001)
	$1 - \frac{2 \cdot C_0 - P_0 }{(C_0 - P_0 + C_x - P_x)}$	(Orwin et Wardle, 2004)
	$\int_0^T \frac{1}{(T_{Fin} - T)} \frac{P(t)}{C(t)} \cdot 100 \cdot dt \text{ (en \%)}$ avec T_{Fin} le temps final du suivi	(Zhang <i>et al.</i> , 2010)
Taux de récupération	$\left[\frac{d \left(\frac{P_x - P_0}{C_0 - P_0} \right)}{dt} \right]_{max}$	(Herrick et Wander, 1998; Seybold <i>et al.</i> , 1999)

*Où t_0 : le temps juste après la perturbation appliquée, t_x un temps quelconque succédant à t_0 ; C_0 et C_x : les réponses de la fonction contrôle aux temps respectifs t_0 et t_x ; P_0 et P_x : les réponses de la fonction perturbée aux temps respectifs t_0 et t_x .

Herrick et Wander (1998) ont défini des indices en considérant que la résistance est proportionnelle à la perte de l'intégrité des fonctions suite à la perturbation et que la résilience est proportionnelle à la récupération de ces fonctions (Pimm, 1984). Kaufman (1982) ainsi que Herrick et Wander (1998) définissaient un ratio comparant la fraction du sol perturbé avec le sol contrôle pour la résistance. La récupération définie par Herrick et Wander (1998), ainsi que par

Seybold et collaborateurs (1999) détermine le ratio de ce que le sol a récupéré sur ce qu'il a perdu. Cet indice tend vers l'infini si le sol s'avère être très résistant. Le taux de récupération a ensuite été défini comme étant la vitesse maximale de récupération (la dérivée de la récupération maximale dans le temps). Griffiths et collaborateurs (2001) ont défini des indices fonction de C_0 pour la résistance et C_x pour la résilience. Quant aux indices proposés par Orwin et Wardle (2004), leurs valeurs augmentaient proportionnellement avec la résistance et la résilience du sol. En revanche, elles n'avaient aucune signification biologique. Récemment, Zhang et collaborateurs (2010) ont proposé des indices intégratifs du ratio de la fonction perturbée sur celle contrôle dans le temps. Une valeur élevée pour l'indice intégratif de la résistance (résilience) signifiait que la fonction avait une grande résistance (résilience) face à une perturbation. Contrairement aux autres auteurs, Zhang et collaborateurs (2010) intègrent la dynamique de récupération des fonctions.

L'utilisation de tels indices (Tableau 1-5) a permis de montrer que la fonction mesurant la décomposition de résidus de plantes était moins résistante au cuivre qu'à la chaleur, et qu'elle récupérait moins bien des perturbations dans les sols dégradés (Griffiths *et al.*, 2001; Kuan *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010). Les sols étudiés différaient selon les plantations ou la végétation sur le terrain (Orwin et Wardle, 2004; Zhang *et al.*, 2010), la diversité des plantes, la pratique d'agriculture (Griffiths *et al.*, 2001); ou des amendements artificiels (semences, biocide, azote ou boues d'eaux usées) (Kuan *et al.*, 2006). Griffiths et collaborateurs (2001) ont également utilisé un sol provenant d'un site industriel contaminé aux hydrocarbures, les plus abondants étant le toluène, l'éthylbenzène, le xylène et triméthylbenzène (avec comme concentrations respectives 320; 180; 510 et 510 mg. kg⁻¹ de sol sec) et l'ont comparé avec un sol homologue non contaminé. Les mesures de résistance et de résilience étaient moins élevées dans le sol pollué.

1.2.5.3 L'indice de stabilité relative du sol

L'indice de la stabilité relative du sol « Relative Soil Stability Index » (RSSI) est un indice de santé du sol mesurant la stabilité d'une fonction et prenant en compte les trois composantes présentées ci-dessus: résistance, résilience et taux de récupération (Bécaert, 2004). Le RSSI amène quelques nouveautés par rapport aux indices présentés précédemment (Section 1.2.5.2) : il combine en un même indice les notions de résistance et de récupération, ainsi que la prise en compte du temps (intégration du taux de récupération). Par cet indice, Bécaert (2004) propose

d'appliquer un stress environnemental au sol, puis d'observer la résistance, la récupération et le taux de récupération des fonctions enzymatiques du sol. Le stress appliqué au sol est une dessiccation à 60°C, pendant 24 heures (Bécaert, 2004), afin de simuler la température qu'un sol peut atteindre lors d'une canicule en été (Davis *et al.*, 2003; Bécaert, 2004) et pour que la survie des microorganismes dans le sol soit suffisamment affectée à cette température (Bécaert, 2004). Juste après l'application de la perturbation thermique, le contenu en eau initial est réajusté.

Le RSSI utilise le suivi du potentiel d'activité enzymatique sur une période de temps déterminée pour comparer le travail que le sol peut accomplir suite à l'application de la perturbation thermique avec le travail que le sol aurait accompli s'il n'avait pas subi de perturbation. Une valeur en pourcentage (Équation 1-2) est ensuite calculée en réalisant le ratio entre le potentiel d'activité enzymatique du sol perturbé ($AE_{\text{perturbé}}$) intégrée sur une période de temps et le potentiel d'activité de son homologue non perturbé intégrée sur la même période de temps ($AE_{\text{non perturbé}}$).

Équation 1-2. Le RSSI, tiré de Bécaert et collaborateurs (2006)

$$\text{RSSI} = \frac{\int_{\text{Jour 2}}^{\text{Jour 15}} AE_{\text{perturbé}} \cdot dt}{\int_{\text{Jour 2}}^{\text{Jour 15}} AE_{\text{non perturbé}} \cdot dt} \times 100\%$$

Les valeurs de RSSI calculées sont comprises entre 0 % et 100 %. Une valeur de RSSI proche de 100 %, signifie que le sol perturbé a une réponse enzymatique qui se rapproche de celle du même sol non perturbé : le sol perturbé possède une bonne résistance et une bonne récupération face à la perturbation. Tandis qu'une valeur de RSSI proche de 0 % signifie que le sol perturbé est complètement inhibé par la perturbation : les capacités du sol à résister et récupérer face à une perturbation sont donc quasi inexistantes. Le RSSI a déjà été testé et a donné des résultats prometteurs pour des contaminations simples et présentes en faibles concentrations telles que l'acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique (2,4-D) (Bécaert, 2004) et le cuivre (Dussault, 2006). Ainsi, les deux cas d'étude ont montré que le RSSI peut différencier un sol contaminé de son homologue non contaminé par comparaison de leurs stabilités fonctionnelles suite à l'application d'une perturbation (Bécaert *et al.*, 2006; Dussault *et al.*, 2008). Les activités de l'arylsulfatase, la β -glucosidase et l'uréase étaient les plus aptes à évaluer l'impact du 2,4-D : la présence de ce contaminant (36 mg. kg⁻¹ sol sec) a, en effet, réduit la stabilité de ces enzymes dans le sol

(Bécaert *et al.*, 2006). Dans l'étude menée par Dussault et collaborateurs (2008), c'est la protéase qui a montré la plus grande sensibilité pour une contamination au cuivre ($250 \text{ mg. kg}^{-1} \text{ sol sec}$).

Le RSSI est un indice original, car il permet de détecter les capacités de récupération du sol, bien que ce phénomène ne puisse être observé avec une simple mesure de potentiel d'activité enzymatique (Bécaert, 2004). Par ailleurs, cet indice tient compte du facteur temporel souvent négligé dans la recherche d'indices de qualité ou de santé des sols (Bécaert, 2004; Bastida *et al.*, 2008).

Malgré cela, cet indice mérite quelques ajustements :

- ✓ Dans le cas où la contamination inhiberait le potentiel d'activité de l'enzyme à la valeur limite de détection de l'appareil de mesure (par exemple), il est fort possible que, suite à l'application d'une perturbation, le potentiel d'activité de cette même enzyme ne soit pas modifié et le score du RSSI risque alors d'être proche de 100 %, et par conséquent, le sol considéré comme de bonne qualité.
- ✓ Une autre difficulté réside dans le fait que les comparaisons entre scores RSSI ne sont pas évidentes, puisqu'il y a un manque au niveau de la référence de comparaison. Une simple modification dans les propriétés des sols entraîne des valeurs de RSSI différentes (Bécaert *et al.*, 2006; Dussault *et al.*, 2008).

1.3 Conclusion de la revue et ouverture sur le projet

Suite à cette revue de littérature, quatre constats importants ressortent :

- ❖ Il n'existe pas vraiment de méthode standardisée permettant de quantifier de manière satisfaisante à la fois la qualité et la toxicité de sols contaminés.

Le fait de pouvoir attribuer des valeurs à la qualité permettrait une comparaison aisée d'un sol contaminé avec son homologue non contaminé ou bien de sols contaminés à différents niveaux de contamination entre eux.

- ❖ Les bioessais effectués sur les écosystèmes (vers de terre, plantes, bactéries luminescentes) ne considèrent pas suffisamment les fonctions et propriétés du sol.

Souvent recommandés dans le cadre d'études d'analyse de risque de sites contaminés, les bioessais font aussi preuve d'une trop grande variabilité dans les réponses des écosystèmes.

- ❖ Les microorganismes représentent un niveau trophique à promouvoir.

Beaucoup de chercheurs portent un grand intérêt à l'étude de fonctions accomplies par la communauté microbienne à même le sol (Winding *et al.*, 2005; Bécaert et Deschênes, 2006). Les potentiels d'activités enzymatiques sont des fonctions largement étudiées, puisque les enzymes sont essentiellement produites par les microorganismes. Elles jouent un rôle dans les cycles biogéochimiques des nutriments, responsables de l'équilibre des sols. Par ailleurs, un point négatif ressort fréquemment de l'étude d'une fonction microbienne dans le temps : la comparaison des fonctions entre différents sols repose sur une base qualitative. La quantification de la qualité dans les sols s'avère aussi être un défi.

- ❖ L'approche conceptuelle de la stabilité fonctionnelle est une voie intéressante.

Ce concept présente plusieurs intérêts, comme la possibilité d'évaluer, dans le temps, les fonctions du sol affectées par une perturbation ponctuelle et de quantifier la manière dont ces fonctions résistent et récupèrent à même le sol. Il va de soi que des sols de qualité possèdent une meilleure résistance et récupération.

- ❖ Un outil tel que le RSSI présente des particularités attrayantes pour évaluer la qualité d'un sol contaminé.

Le RSSI a la capacité de rendre une valeur (en %) facilement interprétable et associable à une qualité d'un sol. Par ailleurs, il repose sur les fonctions enzymatiques d'extracellulaires produites en grande partie par les microorganismes et impliquées dans les cycles biogéochimiques du sol. Le dynamisme des fonctions est considéré avec l'intégration de la composante temporelle et des trois composantes importantes caractérisant la stabilité d'une fonction d'un sol : la résistance, la récupération et le taux de récupération.

Finalement, l'ensemble de ces constats confirme l'idée que l'évaluation de la stabilité fonctionnelle enzymatique est une méthode attractive. Néanmoins, pour combler les difficultés de l'outil RSSI énumérées précédemment, celui-ci nécessite une adaptation ou modification.

CHAPITRE 2 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

La revue de littérature a permis de constater une grande pluralité d'indicateurs et de méthodologies pour rendre compte de la qualité d'un sol contaminé qui se distingue notamment par une sensibilité variable aux hydrocarbures. Cependant, peu d'indicateurs proposent de quantifier l'impact d'une contamination. L'évaluation de la stabilité enzymatique, avec un outil comme le RSSI, semble être une approche intéressante, malgré les lacunes identifiées. La proposition consiste à intégrer une référence dans l'indice RSSI, afin de pouvoir comparer des sols de caractéristiques identiques et ainsi évaluer l'impact de la présence de contaminants dans les sols. Ce nouvel indice modifié est appelé le « Relative Soil Stability Index using a Reference soil » (RSSIr).

2.1 Hypothèse de recherche

L'hypothèse de recherche sur laquelle repose ce projet est la suivante :

L'évaluation quantitative de la stabilité relative du sol via le RSSIr permet de détecter l'impact d'une contamination complexe aux hydrocarbures sur la qualité des sols en distinguant différents niveaux de concentrations, et quel que soit le type de sol.

L'originalité de l'hypothèse se justifie par le fait que l'évaluation de la stabilité fonctionnelle via l'activité enzymatique d'un sol n'a jamais encore été testée pour une application dans un contexte de remédiation. En revanche, l'hypothèse sera réfutée si l'utilisation de la stabilité enzymatique ne montre pas de sensibilités significatives entre les niveaux (faible versus élevé) de concentration de la contamination dans différents types de sol.

2.2 Objectifs

L'objectif général du projet consiste à tester l'applicabilité de l'outil d'évaluation de la stabilité enzymatique des sols pour quantifier la qualité de sols contaminés à différents niveaux de contamination. La contamination étudiée est un mélange complexe d'hydrocarbures. Suite à l'hypothèse de recherche, deux objectifs spécifiques ont été définis :

1. Tester l'outil RSSIr et vérifier sa capacité à évaluer la qualité de sols de différents types et niveaux de contamination complexe;

2. Vérifier l'utilisation de l'outil RSSIr dans le cadre d'un cas réel, pour évaluer la qualité de sols ayant subi des traitements biologiques de remédiation suite à une contamination.

2.3 Sous-objectifs et organisation du mémoire

Les résultats du premier objectif sont exposés au Chapitres 4 et 5. Une partie est présentée sous la forme d'un article intitulé « *Evaluating the Enzymatic Functional Stability of Complex Hydrocarbon-contaminated Soil* » et soumis au journal scientifique *Chemosphere*. Les résultats du second objectif sont présentés au Chapitre 6. Le Tableau 2-1 introduit les sous-objectifs et leurs places dans le mémoire.

Tableau 2-1 : Sous-objectifs et organisation des résultats dans le mémoire

Sous-objectifs	Méthodologie (Sections)	Résultats (Sections)
PREMIER OBJECTIF : Tester l'outil RSSIr et vérifier sa capacité à évaluer la qualité de sols de différents types et niveaux de contamination complexe :		
ÉVALUATION DE LA STABILITÉ FONCTIONNELLE DE SOLS CONTAMINÉS ARTIFICIELLEMENT		
1.1 Évaluer la sensibilité de chaque enzyme à la contamination	3.1.3.1	4.1
1.2 Évaluer l'effet de la perturbation thermique sur les sols contaminés (→ évaluation qualitative)	3.1.3.2	4.2
1.3 Évaluer l'impact de la contamination sur la stabilité fonctionnelle (→ évaluation quantitative)	3.1.3.3	5.4.2
1.4 Estimer l'effet du type de sol sur la mesure de la stabilité fonctionnelle	3.1.3.4	5.4.3
SECOND OBJECTIF : Vérifier l'utilisation de l'outil RSSIr dans le cadre d'un cas réel, pour évaluer la qualité de sols ayant subi des traitements biologiques de remédiation suite à une contamination :		
ÉVALUATION DE LA STABILITÉ FONCTIONNELLE DE SOLS CONTAMINÉS EN COURS DE BIOREMÉDIATION		
2.1 Évaluer l'effet des traitements sur les propriétés des sols	3.2.3.1	6.1
2.2 Évaluer la sensibilité de chaque enzyme à la contamination	3.2.3.2	6.2
2.3 Évaluer l'effet de la perturbation thermique sur les sols à différentes étapes de traitement (→ évaluation qualitative)	3.2.3.3	6.3
2.4 Évaluer l'impact de la contamination et des différents traitements biologiques sur la stabilité fonctionnelle des sols contaminés (→ évaluation quantitative)	3.2.3.4	6.4

CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE

Ce chapitre présente la méthodologie appliquée dans ce projet. Celle-ci se déroule autour des deux objectifs principaux :

- ✓ Vérifier la capacité de l'outil à évaluer la qualité des sols de différents types et niveaux de contamination complexe;
- ✓ Vérifier la capacité de l'outil à évaluer la qualité de sol avec un historique de contamination et ayant subi des traitements biologiques de remédiation.

3.1 Premier objectif : Vérifier la capacité de l'outil à évaluer la qualité de sols contaminés par différents niveaux de contamination et de textures différentes

3.1.1 Plan expérimental adopté

Le plan expérimental a été planifié en fonction des sous-objectifs à atteindre : étudier une contamination réaliste; étudier différents types de sols et se placer dans un contexte de restauration.

3.1.1.1 Choix de la contamination

La contamination choisie est la créosote, un mélange complexe d'hydrocarbures, dont les principaux contaminants, les HAP, sont reconnus pour leurs propriétés problématiques pour l'environnement de par leurs persistances et leurs dégradations difficiles (U.S. EPA, 2008a). La créosote a été très utilisée pendant longtemps comme pesticide, dont la conséquence fut l'accroissement de terrains contaminés par cette substance. Elle est encore utilisée aujourd'hui de manière réglementée pour les voies de chemin de fer (MDDEP, 2009), et par conséquent, elle se positionne comme une source probable de contamination réelle sur le continent nord-américain.

3.1.1.2 Choix des sols à l'étude

Pour étudier l'impact de la créosote sur les fonctions du sol et l'influence de la composition des sols, trois sols naturels de textures différentes ont été utilisés dans cette étude. Ces sols ont été sélectionnés et échantillonnés dans des lieux non contaminés de la région de Montréal

(Delson, Pointes-aux-Trembles et Joliette) de sorte à obtenir des compositions différentes au niveau de leur granulométrie.

3.1.1.3 Choix des concentrations à l'étude

Pour se placer dans un contexte de restauration, cinq concentrations ont été sélectionnées : le sol non contaminé (sol de référence), deux concentrations faibles et deux élevées. Les concentrations faibles choisies, afin de satisfaire les objectifs de restauration imposés par le MDDEP, correspondent respectivement aux critères B et C. Les concentrations élevées ont été prises de manière plus arbitraire, mais pouvant correspondre à des contaminations réalistes et probables sur des sites contaminés (Zapf-Gilje *et al.*, 2001; Fraser *et al.*, 2008). Étant donné que la créosote est un mélange, les critères B et C ont été calculés en équivalent de HAP. Ainsi, l'ensemble des HAP faisant partie de la liste des critères du MDDEP a été retenu comme faisant partie de la créosote. L'addition des critères B et C de toutes ces substances (MDDEP, 2002) a été effectuée et considérée comme objectifs de restauration en équivalent de HAP total pour les sols sur une base sèche.

La caractérisation de la créosote a été réalisée en laboratoire externe par Maxxam (voir section 5.3.2), la connaissance de la concentration totale en HAP mesurée dans la créosote fut de 471 390 mg total HAP. kg⁻¹ de créosote, et cette valeur a ensuite été transformée en concentrations théoriques (mg HAP total. kg⁻¹ de sol sec) en doses théoriques (mL créosote. kg⁻¹ sol sec). Les concentrations étudiées dans ce projet sont énumérées dans le Tableau 3-1.

Tableau 3-1 : Équivalence des concentrations et doses théoriques calculées

Désignation	Concentrations théoriques (mg HAP total. kg ⁻¹ sol sec)	Doses théoriques* (mL de créosote. kg ⁻¹ sol sec)	Concentrations équivalentes** (mg B(a)P. kg ⁻¹ sol sec)
C ₀	0	0	0
C ₁ critère B	87	0,17	1,4
C ₂ critère C	870	1,70	14,0
C ₃	12 432	24	200
C ₄	31 173	60	500

* La densité de la créosote ayant été déterminée expérimentalement : 1,0837 g par mL.

** Établies en utilisant les facteurs de toxicité d'équivalence (FTE) recommandés par l'Institut National français de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS, 2003)

3.1.1.4 Choix des enzymes testées

Les enzymes ont été sélectionnées parmi les hydrolases extracellulaires (arylsulfatase, β -glucosidase, phosphatase, protéase, uréase) impliquées dans les cycles biogéochimiques clés et pour lesquelles des protocoles simples à réaliser existent. Le choix s'est aussi appuyé en tenant compte de leurs propriétés décrites dans la littérature : sensibilité aux contaminations (simple et complexe), aux types d'hydrocarbures (HAP, diesel, produits pétroliers, créosote...), aux niveaux de contamination (faibles, élevés) et à la stabilité fonctionnelle des sols contaminés. Basées sur la revue de littérature, trois hydrolases ont ainsi été retenues : la protéase, l'uréase et l'arylsulfatase.

❖ Les enzymes impliquées dans le cycle de l'azote

✓ La protéase

Le potentiel d'activité de la protéase a montré une sensibilité en présence d'hydrocarbures dans les sols. On peut citer, entre autres, les études concernant la bioremédiation dans des sols contaminés par du diesel (10 000 mg. kg⁻¹ sol sec), par un mélange de deux HAP (1 000 mg. kg⁻¹ sol sec) (Margesin *et al.*, 2000b), par la présence de trois mélanges d'hydrocarbures (diesel, gazoline, ou huile de pétrole brut) en concentrations élevées (5 % et 10 % (p/p)) dans les sols (Labud *et al.*, 2007), et finalement l'étude sur la simulation d'un déversement important de diesel dans un sol (Serrano *et al.*, 2009).

✓ L'uréase

L'uréase est en général stimulé par de faibles concentrations en hydrocarbures et inhibé en présence de fortes concentrations. On peut citer, entre autres, les mêmes études énumérées ci-dessus pour la protéase, puis celles dont l'historique de contamination à faibles concentrations de HAP (inférieures à 100 mg par kg sol sec) remonte à quelques années (3 ans et 50 ans d'exposition) (Andreoni *et al.*, 2004; Gianfreda *et al.*, 2005) et enfin, l'étude sur les différents niveaux de contamination artificielle de diesel (de 0; 20; 40; 80; 160 et 400 mL. kg⁻¹ sol sec) (Pena *et al.*, 2007).

✓ Enzyme impliquée dans le cycle du soufre : l'arylsulfatase

Cette enzyme a montré une certaine sensibilité pour l'évaluation de sols pollués aux hydrocarbures. On peut citer, entre autres, l'étude de Gianfreda et collaborateurs (2005) mentionnée précédemment, celle de la dégradation de sols contaminés artificiellement avec du

phénanthrène ($150 \text{ mg. kg}^{-1} \text{ sol sec}$) par de l'ajout de compost et de souches bactériennes (Scelza *et al.*, 2007) et enfin, celle portant sur le déversement important de diesel dans un sol (1 L. m^{-2} de sol) (Serrano *et al.*, 2009).

3.1.2 Conditionnement des sols à l'étude : contamination artificielle des sols

Après le prélèvement des échantillons de sols dans la région de Montréal, les sols ont été tamisés à une fraction inférieure à 2 mm, puis stockés à 10 C. Chaque type de sol a été contaminé de la manière suivante. Le volume de créosote nécessaire pour la contamination a été ajouté dans des pots massons ambrés de 1 L avec 2 mL de dichlorométhane comme solvant. Après l'évaporation des résidus de dichlorométhane, 600 g de sol ont été introduits dans chaque pot. Les microcosmes furent ensuite placés pendant 24 h dans un agitateur mécanique, pour garantir une meilleure homogénéisation de la contamination. Après contamination, les sols ont été ramenés à 60 % de leur CRC, par ajout d'eau Millipore préalablement stérilisée, afin que les microorganismes du sol soient dans leurs conditions optimales. Ce choix se justifie aussi par le fait que la dégradation des composés organiques par la communauté microbienne est optimisée entre 30 % et 90% de la CRC (Dibble et Bartha, 1979). Dans le cadre de la réalisation d'essais enzymatiques dans les sols contaminés aux hydrocarbures, d'autres auteurs ont aussi travaillé avec des sols humidifiées à 60 % de leur CRC (Maliszewska-Kordybach et Smreczak, 2003a; Tejada *et al.*, 2008). Les échantillons de sols ont ensuite été entreposés à la température ambiante et à la noirceur pendant deux semaines de manière à ce que la communauté microbienne s'adapte à son nouvel environnement.

3.1.3 Méthodologie appliquée pour répondre au 1^{er} objectif

3.1.3.1 Étape 1 : Tester la sensibilité de chaque enzyme à la contamination

❖ Analyses aux laboratoires : essais enzymatiques

Les potentiels d'activité de la protéase, l'uréase et l'arylsulfatase ont été mesurés dans chaque échantillon. Chaque mesure de potentiel enzymatique a donné lieu à trois répliques et deux échantillons-contrôle.

✓ Activité de la protéase

Le potentiel d'activité de la protéase ($\mu\text{g tyrosine.g}^{-1}.\text{2h}^{-1}$) se détermine en incubant 1 g de sol pendant 2 h à 50°C avec 5 mL de solution de caséine à 2 % (p/v) comme substrat et 5 mL d'une solution tampon Tris (0,05 M, pH 8,1) (Ladd et Butler, 1972). Les protéines sont ensuite précipitées par l'ajout d'une solution d'acide trichloracétique et les acides aromatiques aminés réagissent avec un réactif de Folin en solution alcaline, pour former un complexe bleu. Ce complexe, produit de la réaction, est ensuite quantifié par colorimétrie à 700 nm.

✓ Activité de l'uréase

Le potentiel d'activité de l'uréase ($\mu\text{g N-NH}_4^+.\text{g}^{-1}.\text{2h}^{-1}$) se détermine en incubant 1 g de sol pendant 2 h à 37°C avec une solution d'urée comme substrat (0,5 mL, 720 mM) et 4 mL de solution tampon borate (0,1M, pH 10). L'ammonium est ensuite extrait avec 6 mL d'une solution de chlorure de potassium (2M) et d'acide chlorhydrique (1mM), quantifié via la réaction de Berthelot modifiée (Kandeler, 1996) et par colorimétrie à 685 nm.

✓ Activité de l'arylsulfatase

Le potentiel d'activité enzymatique de l'arylsulfatase ($\mu\text{g p-nitrophenol.g}^{-1}.\text{2h}^{-1}$) se détermine en incubant 1 g de sol pendant 2 h à 37°C avec une solution de potassium-p-nitrophenylsulfate (20mM, 1mL) comme substrat et 4mL de tampon acétate (0.5M, pH5.8) (Strobl et Traunmüller, 1996). La réaction est ensuite stoppée par l'addition de 1 mL de chlorure de calcium (0,5M) et 10 mL d'hydroxyde de sodium. Le produit extrait (p-nitrophenol) était ensuite quantifié par colorimétrie à 420 nm.

❖ Caractérisation de la contamination

Les contaminants quantifiés sont les HAP et les autres hydrocarbures ($\text{C}_{10}\text{-C}_{50}$). Chaque extraction et analyse ont donné lieu à des duplicatas.

✓ Caractérisation des HAP

Les HAP ont été extraits par une méthode adaptée de celle du Soxhlet (U.S. EPA, 1996) en utilisant une unité de Soxtec (modèle 1043, Tecator). Les échantillons de sols (1 g) ont été tout d'abord déshydratés avec du sulfate de magnésium dans des tubes en cellulose. La solution de récupération utilisée était une solution de décafluorobiphényle (Aldrich). Dans le Soxtec, les HAP ont été extraits pendant 16 h avec une solution de dichlorométhane à 110°C, puis le solvant

fut remplacé par de l'acétonitrile (après évaporation du dichlorométhane, rinçage de 30 min à 180°C). Les HAP extraits dans l'acétonitrile furent ensuite analysés avec un HPLC selon la méthode de l'U.S. EPA (1986). Le HPLC utilisé était équipé de détecteurs ultraviolet (UV Spectra Focus) et fluorescence (FL3000 Spectra Focus), d'une bouteille d'hélium, d'un contrôleur SN4000, d'une pompe P4000, d'un injecteur automatique AS3000, d'une colonne chromatographique pour HAP 150x4.6mm CSC-A300, d'une colonne de protection CSC 20mm, d'une pré-colonne à filtre CSC 1/16"SSi.

La concentration totale en HAP obtenue compte les seize HAP prioritaires répertoriés dans la liste de l'US EPA (Keith et Telliard, 1979). La solution de calibration « 1647d, Priority Pollutant » utilisée contenait ces seize HAP prioritaires.

✓ Caractérisation des C₁₀-C₅₀

Les C₁₀-C₅₀ ont été extraits en suivant le protocole du CEAEQ (2002). Les échantillons de sol ont été déshydratés avec du sulfate de sodium, puis transférés dans des flacons avec de l'hexane. Les flacons ont été agités mécaniquement pendant 10 min, puis placés dans un bassin à ultrason (10 min), puis agités pendant 30 min. Les extraits furent filtrés dans des colonnettes contenant de l'oxyde de silicium de sorte à retenir les impuretés aromatiques. Les filtrats extraits furent ensuite analysés au GC-FID (Varian CP-3380), selon le protocole du CEAEQ (2007). Le GC-FID était équipé d'une colonne capillaire (25mx0.32mm, CP-SIL8CB low bleed/MS), d'un injecteur automatique (CP-8200) et d'un détecteur FID. La solution de calibration utilisée était de l'huile de diesel impériale.

❖ Analyse des résultats

Pour tester la sensibilité de chaque enzyme à la contamination, des analyses statistiques ont été effectuées, en utilisant le logiciel STATISTICA 9.0 (StatSoft Inc, 2009). Des analyses de corrélations de Pearson ($p < 0,05$) ont été utilisées pour tester le degré de relation entre deux variables (concentrations versus potentiels d'activités enzymatiques) et des analyses de variance (ANOVA) ont été réalisées par le test LSD de comparaison des moyennes de potentiels enzymatiques entre traitements (niveaux de contamination). Certaines données, comme les potentiels d'activités de l'uréase, ont dû être transformées par la fonction $\log(1+x)$, afin de garantir la linéarité entre certaines variables et de réduire la variance.

3.1.3.2 Étape 2 : Tester l'effet de la perturbation thermique sur les sols contaminés

❖ Analyses au laboratoire

✓ Application de la perturbation thermique

La stabilité enzymatique a été suivie au cours du temps. Au début de ce suivi, les sols ont été séparés en deux et la moitié des microcosmes, préalablement pesés, ont été envoyés au four à 60°C pendant une période de 24 heures. Après la perturbation, les microcosmes ont été à nouveau pesés et la perte de poids a été compensée avec de l'eau Millipore, préalablement stérilisée.

✓ Suivi enzymatique dans le temps

Au premier jour du suivi dans le temps (jour 1), un échantillonnage est effectué dans tous les microcosmes (sols à l'état non perturbé). Le suivi enzymatique dans les échantillons de sols perturbés et non perturbés a été régulièrement effectué sur une période de douze jours.

La durée pour la période du suivi de l'activité enzymatique s'appuie sur la littérature. Plusieurs auteurs ont observé à la suite de l'application d'une perturbation au sol, une stabilité établie des fonctions biologiques au bout de 15 jours dans le sol (Degens *et al.*, 2001; Griffiths *et al.*, 2001; Orwin et Wardle, 2004). Bécaert et collaborateurs (2006) avaient observé une récupération des potentiels enzymatiques (arylsulfatase, β -glucosidase, phosphatase, protéase, uréase) entre le 10^e et 15^e jour dans les sols contaminés au 2,4-D (contamination simple organique) ayant subi une perturbation thermique à 60 °C pour une durée de 24 heures.

Les jours d'échantillonnage ont été choisis selon les recommandations de Bécaert (2004) un total de six est nécessaire pour le calcul de la stabilité enzymatique, dont un le jour de la perturbation thermique et cinq autres aux jours 2, 3, 5, 8 et 12 pour les sols perturbés et le sol de référence (sol non contaminé, non perturbé). Quatre points d'échantillonnages ont également été prévus pour les sols contaminés, non perturbés aux jours 1, 4, 9 et 12.

❖ Évaluation qualitative de la stabilité fonctionnelle

L'effet de la perturbation sur chaque niveau de contamination et pour chacune des enzymes a été observé et analysé qualitativement, et ce, pour chacun des types de sols. La résistance et la récupération des enzymes sont tout particulièrement observées : la résistance du potentiel d'activité est l'affectation de la fonction juste après l'application de la perturbation (Pimm, 1984)

et la récupération correspond au retour de la fonction dans son état initial (Herrick et Wander, 1998).

3.1.3.3 Étape 3 : Tester l'impact de la contamination sur la stabilité fonctionnelle, et les valeurs de RSSIr

❖ Évaluation quantitative de la stabilité fonctionnelle : calcul des valeurs de RSSIr

En utilisant les données obtenues du suivi des potentiels enzymatiques, le nouvel indice de stabilité relative du sol, renommé « Relative Soil Stability Index using a Reference soil » (RSSIr) a été calculé pour chaque niveau de contamination et chacun des sols. Ce nouvel indice utilise le sol non contaminé et non perturbé comme sol de référence et permet l'intégration des facteurs de stimulation et/ou d'inhibition de l'activité enzymatique due à la contamination présente dans le sol. Le RSSIr évalue, ainsi, le travail que peut accomplir un sol contaminé ayant subi une perturbation avec le travail qu'aurait accompli son homologue non contaminé, non perturbé (Équation 3-1).

Équation 3-1. Le RSSIr

$$\text{RSSIr} = \frac{\int_{\text{Jour 1}}^{\text{Jour 12}} \text{AE}_{\text{perturbé}} \cdot dt}{\int_{\text{Jour 1}}^{\text{Jour 12}} \text{AE}_{\text{référence}} \cdot dt} \times 100\%$$

L'intérêt majeur de ce nouvel indice est de permettre la comparaison de différents sols contaminés à différents niveaux et selon une même référence, en relation avec le RSSI.

❖ Analyse des résultats

À l'aide du logiciel STATISTICA 9.0, des analyses de corrélations utilisant les coefficients de Pearson ($p < 0,05$) pour évaluer le degré de relation entre deux variables (concentrations versus RSSIr) et des ANOVAs pour la comparaison des moyennes (valeurs de RSSIr) entre traitements (niveaux de contamination) ont été réalisées. Certaines données (concentrations et valeurs de RSSIr de l'uréase) ont dû être transformées par la fonction $\log(1+x)$, afin de garantir la linéarité entre certaines variables et réduire la variance.

3.1.3.4 Étape 4 : Tester l'effet du type de sol sur l'outil RSSIr

❖ Analyses aux laboratoires

✓ Caractérisation des sols naturels

La distribution granulométrique des sols a été effectuée et leur texture a été classifiée selon le diagramme triangulaire établi par l'USDA (sable [2mm-50µm]; limon [50µm-2µm]; argile [<2µm]), d'après les méthodes ASTM D1140-92 (ASTM, 1997a) et D422-63 (ASTM, 1997b). La capacité de rétention au champ (CRC) a été déterminée selon la méthode D2980-71 (ASTM, 1996), le pH a été mesuré avec une sonde potentiométrique (Orion Surfow semi-micro Ross combination pH electrode) d'après la méthode D-4972-95a (ASTM, 1995). Le contenu en azote total de Kjeldahl (NTK) a été déterminé selon la méthode standard de Kjeldahl. Le contenu en carbone total (CT) a été mesuré en utilisant un four à induction (LECO Corporation, St-Joseph, MI) selon la méthode D2974 (ASTM, 1998). Le contenu en carbone inorganique total (CIT) a été mesuré par une méthode infrarouge suite à un traitement à l'acide phosphorique. Quant au carbone organique total (COT), son contenu a été calculé en effectuant la différence entre les valeurs de CT et de CIT. Les analyses ont toutes été réalisées en triplicatas.

✓ Caractérisation de la contamination

Les échantillonnages pour la caractérisation de la contamination ont été effectués aux jours 2 (jour suivant la perturbation thermique) et 12 (jour de fin) du suivi enzymatique dans les sols perturbés et non perturbés. Les échantillons prélevés ont été congelés jusqu'au jour de l'extraction des contaminants du sol, afin de limiter l'éventuelle dégradation microbienne. La quantification des contaminants au jour 2 avait pour objectif d'évaluer l'éventuelle volatilisation des contaminants organiques due à la chaleur entre les sols perturbés et non perturbés. Le prélèvement au jour 12 était réalisé à titre préventif afin de quantifier, si besoin, l'éventuelle dégradation des composés pendant les deux semaines de suivi du potentiel enzymatique. Au vu des propriétés physico-chimiques des contaminants, la dégradation des HAP a été négligée (voir Section 1.1.3.3). Suite à cet échantillonnage, la caractérisation de la contamination s'est effectuée comme décrit précédemment (section 3.1.3.1).

❖ Analyse des résultats

Pour tester l'influence du type de sol sur l'outil RSSIr, des analyses statistiques ont été effectuées, à l'aide du logiciel STATISTICA 9.0. Des analyses de covariance (ANCOVA) ont été

réalisées pour les enzymes qui montraient une sensibilité à l'outil RSSIr. Ces analyses consistaient en des ANOVAS combinées à des régressions individuelles, permettant de comparer les effets des traitements entre chacun des types de sols. Les potentiels d'activités de l'uréase et les concentrations ont été transformés par la fonction $\log(1+x)$, afin de garantir la linéarité entre certaines variables, respecter la normalité et réduire la variance.

3.1.4 Résumé du déroulement des opérations et analyses au laboratoire pour chaque sol

Pour chaque sol naturel, les expériences se sont déroulées comme décrit sur la Figure 3-1.

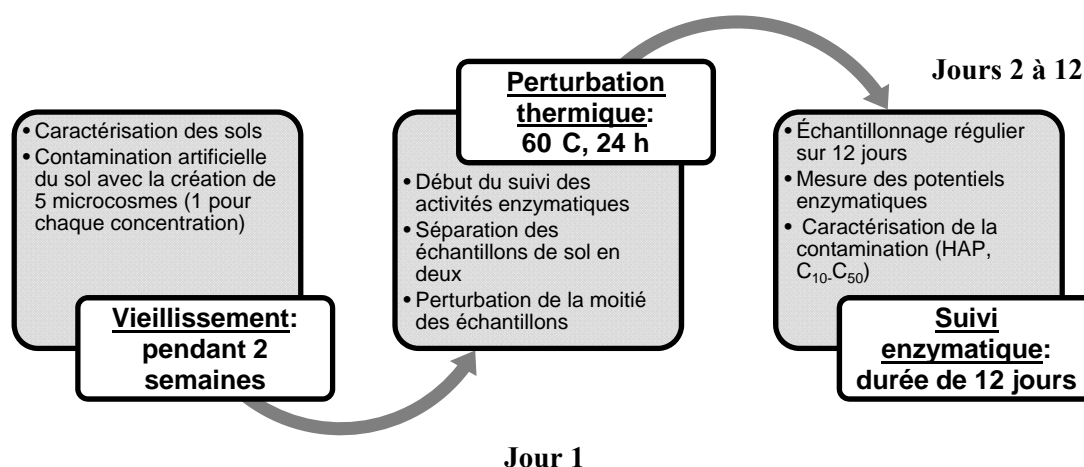


Figure 3-1 : Déroulement des expériences au laboratoire (planification réalisée pour chaque sol)

Chaque cycle d'expérience a donné lieu au traitement d'un seul sol naturel. Tous les niveaux de contamination d'un type de sol ont été traités en même temps. Lors du suivi enzymatique sur une période de 12 jours, les journées d'échantillonnage ont donné lieu à la détermination des potentiels d'activité des trois enzymes dans les sols. L'ensemble des données récoltées au laboratoire ont été compilées et les calculs de potentiels enzymatiques ponctuels et de valeurs de stabilité enzymatique ont été effectués. L'interprétation des données s'est effectuée essentiellement par analyse statistique.

3.2 Second objectif : Vérifier la capacité de l'outil à évaluer la qualité de sol avec un historique de contamination et ayant subi des traitements biologiques de remédiation

3.2.1 Plan expérimental

Le plan expérimental consiste essentiellement au choix des sols de terrains contaminés et à celui des enzymes.

3.2.1.1 Les sols de terrain

Les sols de terrain choisis ont connu un historique de contamination à des mélanges d'hydrocarbures, en particulier des HAP et en cours de bioremédiation. Le terrain d'où proviennent les sols est le site d'une ancienne usine de goudron de houille, dans le Nord-Pas-de-Calais, région située au Nord de la France. Les sols de ce site sont, actuellement, en cours de restauration. Les techniques utilisées pour la décontamination sont des traitements biologiques : un co-compostage, suivi d'une phytoremédiation (Gan *et al.*, 2009). Le co-compostage est une technique visant à mélanger des sols contaminés avec des agents structurants (branches d'arbres déchiquetées, rebuts de compost...) et de les agencer en andains. Ces sols sont ensuite retournés à fréquence variable par un système mécanique, pour permettre leur aération. Après co-compostage, les sols sont épandus sur des portions de terrains non contaminés du site et traités par phytoremédiation. Cette dernière technique consiste à planter de jeunes saules sur les sols contaminés afin d'extraire, d'absorber et d'immobiliser les contaminants présents dans les sols. Ces techniques de restauration ont permis de diminuer la concentration en contaminants dans les sols; malgré cela rien n'indique que ces traitements permettent de détoxifier les sols et d'améliorer ainsi leur qualité.

Quatre échantillons de sols (10 kg), prélevés le long de la chaîne de traitement ont été fournis.

- ✓ Sol contaminé avant traitement;
- ✓ Sol contaminé après traitement de co-compostage;
- ✓ Sol contaminé pendant le traitement de phytoremédiation;
- ✓ Sol témoin, ayant une concentration bruit de fond (sol prélevé sur le site en dehors de la zone contaminée).

3.2.1.2 Choix des enzymes

La protéase, l'uréase et l'arylsulfatase ont été sélectionnées en s'appuyant sur la littérature existante pour les mêmes motifs que ceux précisés dans la section 3.1.1.4.

3.2.2 Conditionnement des sols de terrain

Les sols ont été tamisés à une fraction inférieure à 2 mm, puis entreposés à 10°C. Comme pour la première étude, les sols ont été ramenés à 60 % de leur CRC, par ajout d'eau Millipore préalablement stérilisée, afin que les microorganismes du sol soient dans leurs conditions optimales. Quelques jours avant le début des expériences et pendant toute la phase expérimentale, les échantillons de sols ont été entreposés à la température ambiante et à la noirceur.

3.2.3 Méthodologie appliquée pour répondre au 2nd objectif

3.2.3.1 Étape 1 : Tester l'effet des traitements sur les propriétés des sols

- ❖ Analyses aux laboratoires
- ✓ Caractérisation des sols

Les textures et propriétés des sols de terrain ont été caractérisées comme décrit dans l'étude précédente à la section 3.1.3.4.

- ✓ Caractérisation de la contamination

La caractérisation des HAP et C₁₀-C₅₀ a été réalisée dans chaque échantillon de sol. L'échantillonnage dans les sols, ainsi que l'extraction des HAP et C₁₀-C₅₀ des sols et leurs analyses ont été réalisés comme décrit dans la section 3.1.3.1. En revanche, les extractions ont été faites en triplicatas.

- ❖ Analyse des résultats

Les propriétés des sols ont été comparées et analysées statistiquement à l'aide du logiciel STATISTICA 9.0. Ainsi, des ANOVAs ont été effectuées pour comparer les moyennes (CT, COT, CIT, NTK) entre traitements (sols). Des analyses de corrélations (coefficients de la matrice de Pearson) ont été réalisées afin de détecter les éventuels liens entre les différentes propriétés du sol. Des ANOVAs effectuées sur les concentrations en contaminants ont permis d'observer les rendements des différents traitements appliqués.

3.2.3.2 Étape 2 : Tester la sensibilité de chaque enzyme à la contamination

❖ Analyses aux laboratoires : Essais enzymatiques

Les potentiels enzymatiques de la protéase, de l'uréase et de l'arylsulfatase ont été déterminés comme décrit à la section 3.1.3.1. En comparaison avec les essais enzymatiques réalisés dans le cadre de la première étude, le nombre de réplicas a été multiplié par deux, compte tenu de l'hétérogénéité des sols. Chaque mesure de potentiel enzymatique a ainsi donné lieu à six réplicas et quatre échantillons-contrôle.

❖ Analyse des résultats

Le logiciel STATISTICA 9.0 a été utilisé pour tester la sensibilité de chaque enzyme à la contamination. Des analyses de corrélations de Pearson ($p < 0,05$) ont été réalisées, lorsque possible, pour tester le degré de relation entre deux variables (concentrations versus potentiel d'activités enzymatiques) et des analyses de variance (ANOVA) ont été réalisées par le test LSD de comparaison des moyennes (potentiels enzymatiques) entre traitements (niveaux de contamination).

3.2.3.3 Étape 3 : Tester l'effet de la perturbation thermique sur les sols à différentes étapes de traitement

❖ Analyses au laboratoire

✓ Application de la perturbation thermique

La stabilité enzymatique a été suivie au cours du temps. Comme pour la première étude, au début de ce suivi, les sols ont été séparés en deux. Une perturbation thermique de 60°C a été appliquée comme décrit section 3.1.3.2 pendant 24 heures.

✓ Suivi enzymatique dans le temps

Selon le même schéma que celui décrit à la section 3.1.3.2, six points d'échantillonnage ont aussi été faits pour la mesure des potentiels enzymatiques et dans l'ensemble des microcosmes (sols perturbés et non perturbés) aux jours 1 (avant perturbation), 2, 3, 5, 8 et 12.

❖ Évaluation qualitative de la stabilité fonctionnelle

L'effet de la perturbation sur chaque sol et pour chacune des enzymes a été observé et analysé qualitativement, comme dans la première étude (section 3.1.3.2).

3.2.3.4 Étape 4 : Tester l'impact de la contamination et des différents traitements biologiques sur la stabilité fonctionnelle des sols contaminés

❖ Évaluation quantitative de la stabilité fonctionnelle

La stabilité fonctionnelle a été quantifiée via l'utilisation du RSSIr (Équation 3-1), mais également avec le RSSI (Équation 1-2). Les valeurs de RSSIr et RSSI ont été calculées pour chacune des enzymes et chacun des sols.

❖ Analyses des résultats

Le logiciel STATISTICA 9.0 a été utilisé comme aide à l'interprétation des résultats. Ainsi des analyses de corrélations (coefficients de Pearson) pour évaluer le degré de relation entre deux variables (concentrations versus RSSIr ou RSSI) et des ANOVAs pour comparer des moyennes (valeurs de RSSIr ou RSSI) entre traitements (niveaux de contamination) ont été réalisés. Par ailleurs, certaines variables ont été transformées avec la fonction Log(x), pour réduire la variance.

Les performances de deux outils (RSSI et RSSIr) ont ensuite été comparées et leur capacité à mettre en évidence l'efficacité des traitements biologiques sur la qualité des sols a été discutée.

3.2.4 Résumé du déroulement des opérations et analyses au laboratoire pour chaque sol

Les expériences avec les sols de terrain se sont déroulées comme décrit sur la Figure 3-2.

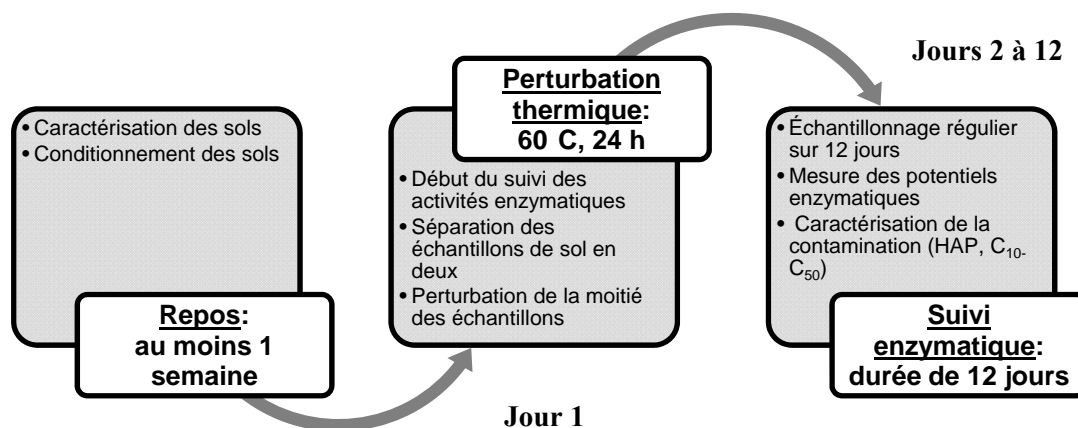


Figure 3-2 : Déroulement des expériences au laboratoire pour les sols de terrain

La contamination des sols étant ancienne (supérieure à une dizaine d'années), chaque cycle d'expérience a donné lieu au suivi d'une seule enzyme à la fois. Cela a permis, entre autres, l'augmentation du nombre de répliques dans la réalisation des essais enzymatiques.

3.3 Comparaison rapide des approches méthodologiques des objectifs

Pour les deux objectifs, les approches méthodologiques sont semblables. Les différences résident principalement dans :

- ✓ Le plan expérimental : celui-ci se réduit au simple choix des sols de terrain et des enzymes pour le second objectif;
- ✓ Le nombre de répliques : celui-ci augmente lors de la réalisation des essais enzymatiques (de $n = 3$ à $n = 6$) et lors des extractions à la vue de la caractérisation de la contamination (de $n = 2$ à $n = 3$) pour le second objectif;
- ✓ Les points d'échantillonnage pour le suivi enzymatique des sols non perturbés.

CHAPITRE 4 RÉSULTATS : ÉVALUATION DE LA STABILITÉ FONCTIONNELLE DE SOLS CONTAMINÉS PAR UN MÉLANGE COMPLEXE D'HYDROCARBURES

Ce chapitre contient les résultats obtenus pour répondre à une partie du premier objectif qui est de tester l'outil de stabilité et vérifier la capacité du RSSIr à évaluer la qualité de sols contaminés par différents niveaux de contamination et de textures différentes. Ainsi ce chapitre ne traite que des premiers et seconds sous-objectifs qui sont 1) d'évaluer la sensibilité de chaque enzyme à la contamination et 2) d'évaluer l'effet de la perturbation sur les sols contaminés. Les troisième et quatrième objectifs (3) évaluer l'impact de la contamination sur la stabilité fonctionnelle via les outils RSSI ou RSSIr et 4) estimer l'influence du type de sol sur la mesure de la stabilité fonctionnelle) sont présentés dans le chapitre suivant sous la forme d'une publication.

Suite à leurs caractérisations, les trois sols utilisés pour l'étude sont respectivement un loam argilo-sableux, un sol argileux et un loam sableux. Les résultats de leurs caractérisations sont présentés à la section 5.4.1 du Chapitre 5.

4.1 Influence de la créosote sur les potentiels d'activités enzymatiques

Les potentiels d'activité enzymatique mesurés dans chaque sol au jour 1 du suivi enzymatique sont présentés à la Figure 4-1 pour les trois enzymes et chaque type de sol.

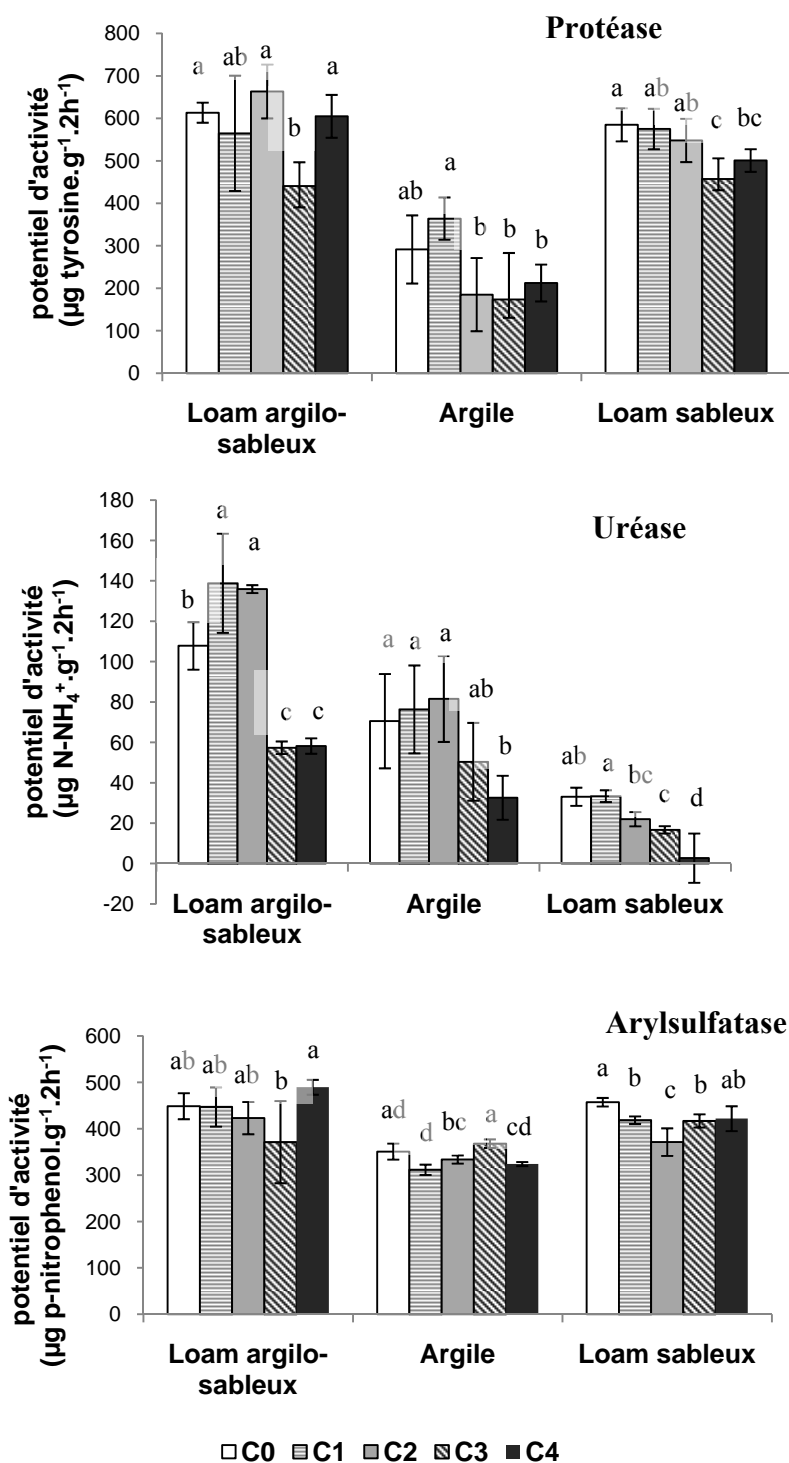


Figure 4-1 : Potentiels d'activité enzymatique ponctuels (jour 1) de la protéase, l'uréase et l'arylsulfatase par type de sol et niveau de contamination; les valeurs non connectées avec la même lettre étant significativement différentes, d'après le test LSD sur les moyennes (n = 3; p < 0,05)

Les analyses de variances montre que statistiquement les potentiels d'activités enzymatiques de la protéase et de l'arylsulfatase ne mettent pas en évidence une différence significative entre les sols hautement (C_3 , C_4) et faiblement contaminés (C_0 , C_1) (Figure 4-1). Aussi les analyses de corrélation testées ne permettent pas d'établir un lien quelconque entre ces potentiels d'activités et les niveaux de contamination : les potentiels d'activités de la protéase ne respectent pas la distribution normale et les potentiels d'activités de l'arylsulfatase ne sont significativement pas corrélés avec les concentrations en contaminants ($r = -0,11$, $p = 0,47$ avec les HAP et $r = 0,10$, $p = 0,76$ avec les C_{10} - C_{50}).

Des trois enzymes, seule l'uréase semble être affectée par la contamination à la créosote. Cette enzyme est en effet stimulée dans les sols faiblement contaminés à la créosote (C_1 et C_2) et inhibée dans les sols hautement contaminés (C_3 et C_4). De plus, les potentiels d'activités de l'uréase sont significativement et modérément corrélés avec les concentrations en contaminants dans le sol ($r = -0,50$, $p < 0,001$ avec les HAP et $r = -0,37$, $p = 0,013$ avec les C_{10} - C_{50}). C'est également le cas d'études récentes de la littérature, qui évaluaient l'influence des HAP sur l'activité de l'uréase (Margesin *et al.*, 2000a; Gianfreda *et al.*, 2005). Ce constat était également valable avec d'autres types de mélanges d'hydrocarbures, comme les fractions pétrolières (Megharaj *et al.*, 2000; Labud *et al.*, 2007), le diesel (Margesin *et al.*, 2000a; Labud *et al.*, 2007; Pena *et al.*, 2007). En effet, il semble que cette enzyme soit inhibée et stimulée par la présence de niveaux de contamination respectivement faibles et élevés des hydrocarbures (Margesin *et al.*, 2000a; Labud *et al.*, 2007).

Les potentiels d'activités de l'uréase ne dépendent pas seulement du niveau de contamination, mais les valeurs sont également influencées par le type de sol. En effet, les résultats suggèrent que le potentiel d'activité de l'uréase est fortement et négativement affecté dans certains sols, en particulier dans le loam sableux : la présence de créosote réduit le potentiel d'activité de l'uréase de 33, 49 et 92 % dans respectivement les sols de niveaux C_2 , C_3 et C_4 . L'effet des hydrocarbures (diesel, HAP, ...) sur la communauté microbienne ne dépend pas seulement de la composition des polluants, mais aussi de la composition du sol (Maliszewska-Kordybach et Smreczak, 2003a; Labud *et al.*, 2007). Par exemple, une étude a montré que la communauté microbienne est plus fortement affectée dans un sol sableux que un sol argileux, en raison du contenu en particules d'argile qui a tendance à adsorber les contaminants organiques, et retenir ainsi ces molécules dans les sols (Labud *et al.*, 2007). L'uréase est en fait une enzyme librement sécrétée dans la

fraction aqueuse du sol (Dick, 1997), qui est généralement stabilisée sur les particules d'argiles et complexent avec les substances humiques du sol (Kiss *et al.*, 1975; Chakrabarti *et al.*, 2004). L'adsorption des HAP est plus fortes sur les colloïdes du sol (argile, MO) et renforcent l'immobilisation de l'uréase sur les particules du sol. Ainsi la créosote affecte l'activité de l'uréase directement sur les enzymes sécrétées et accumulées dans le sol et/ou indirectement sur les microorganismes.

Toutefois, bien que les potentiels d'activités de l'uréase représentent des valeurs quantitatives, celles-ci dépendent trop du type de sol et ne peuvent être interprétés individuellement et prises pour des indices de qualité.

4.2 Effet de la perturbation thermique sur les sols

Suite à l'application de la perturbation thermique, le suivi des potentiels d'activités des trois enzymes a été réalisé sur une période de 12 jours pour chacun des types de sols. Les courbes d'évolution des potentiels d'activités de la protéase et de l'uréase pour les niveaux C₀, C₁ et C₄ dans les sols perturbés et non perturbés sont illustrées à la Figure 5-2 au Chapitre 5. Les figures d'évolutions des potentiels des sols de niveaux C₂ et C₃ ont été joints en Annexe 3, les courbes représentant la même tendance que celles des niveaux respectifs C₁ et C₄. De même, les résultats associés au suivi des potentiels d'activité de l'arylsulfatase montrent globalement que la perturbation thermique a un impact similaire à celui visualisé pour l'uréase. Les courbes d'évolution associées à cette enzyme sont jointes en Annexe 3.

Dépendamment des niveaux de contamination à la créosote, la perturbation thermique n'affecte pas les trois enzymes de la même manière. Qualitativement, la protéase présente, dans les sols faiblement contaminés (C₀, C₁ et C₂) une capacité à résister et récupérer de la perturbation thermique appliquée au jour 2, alors que l'uréase et l'arylsulfatase ne semblent ni résister, ni récupérer de la perturbation, même après une période de 12 jours.

Dans les sols présentant des niveaux de contamination élevés, la protéase est inhibée (de 24 à 53%) et ne récupère pas pendant toute la durée du suivi de 12 jours. Dans la littérature, la perturbation thermique peut provoquer la libération de protéase lors de la lyse des cellules microbiennes. Ce phénomène a été constaté par Dussault et collaborateurs (2008), suite à l'observation d'une forte augmentation du potentiel d'activité de la protéase dans des sols

contaminés au cuivre ($250 \text{ mg. kg}^{-1} \text{ sol sec}$). Toutefois, cette augmentation du potentiel d'activité enzymatique n'est pas visible dans les sols de niveaux C_3 et C_4 . Il semblerait qu'à ces concentrations la créosote inhibe plus fortement la protéase en l'adsorbant sur les particules du sol, jusqu'à ne plus permettre sa libération, lors de la lyse des cellules microbiennes.

En ce qui concerne les deux autres enzymes (uréase et arylsulfatase), les courbes de suivi de leurs potentiels d'activité enzymatique (Figure 5-2, Chapitre 5; Figure A.3- 2, Figure A.3- 3 et Figure A.3- 4 en Annexe 3) montrent que ces deux enzymes sont inhibées par la perturbation thermique et ne récupèrent pas sur la période de 12 jours. Ces deux enzymes sont, en effet, sensibles à la chaleur et plusieurs mois peuvent s'écouler avant qu'elles ne récupèrent (Staddon *et al.*, 1998; Ajwa *et al.*, 1999). Toutefois, dans des sols non et faiblement contaminés au 2,4-D, l'uréase semblait complètement désactivée, alors que l'arylsulfatase faisait l'objet d'une récupération après quelques jours seulement (Bécaert *et al.*, 2006).

CHAPITRE 5 EVALUATING THE ENZYMATIC FUNCTIONAL STABILITY OF COMPLEX HYDROCARBON-CONTAMINATED SOIL

Ce chapitre contient la suite des résultats obtenus pour répondre au premier objectif qui est de tester l'outil de stabilité et vérifier la capacité du RSSIr à évaluer la qualité de sols contaminés par différents niveaux de contamination et de textures différentes et fait l'objet d'une publication intitulée « *Evaluating the Enzymatic Functional Stability of Complex Hydrocarbon-contaminated Soil* » et soumise en Mars 2011 au Journal *Chemosphere*. Cet article propose d'évaluer l'impact de contaminants sur des sols en utilisant une méthode, initialement introduite et développée par Valérie Bécaert (2004), lors de ses études doctorales, et pour laquelle une modification est suggérée. Cette méthode consiste en l'étude de la stabilité fonctionnelle du sol par le biais d'une fonction microbienne importante dans le sol : le potentiel enzymatique. Les objectifs spécifiques de l'article sont d'examiner la sensibilité de l'outil RSSIr face à différents niveaux de concentrations (faibles versus élevées) d'une contamination complexe d'hydrocarbures et de valider l'utilisation de ce même outil sur différentes textures de sols.

5.1 Abstract

To assess the impacts of contaminants on soils, functional enzymatic stability was evaluated using the Relative Soil Stability Index (RSSI). Modifications in the RSSI were suggested to account for the inhibitive effect of contaminants by introducing a reference soil in the new index, termed the Relative Soil Stability Index using a reference soil (RSSIr). This study aims to test both indices using a complex contamination. Three soils (sandy clay loam, clay and sandy loam) were artificially contaminated with five creosote levels: 0; 0.17; 1.7; 24 and 60 mL.dry soil kg⁻¹. Half the soil samples were perturbed using a 24-hour, 60°C-desiccation. Protease, urease and arylsulfatase activities were then regularly monitored for 12 days. Among both tools, only the RSSIr showed the ability to assess the functional stability of creosote-contaminated soils by monitoring protease and urease activities. Protease was the most stable enzyme in low-contaminated and uncontaminated soils (RSSIr scores approximately and higher than 100 % in most low-contaminated soils and less than 75 % in highly-contaminated soils). Clay was the most impacted soil by the contamination. The RSSIr can thus discriminate between creosote levels and act as a soil health ecotoxicological indicator in a remediation context.

Keywords: Terrestrial ecotoxicity, PAH contamination, Enzymatic stability, Heat-stress

5.2 Introduction

Measuring contaminant concentration is the most common way of monitoring the success of site remediation. Politics and regulations implemented in Europe (Belgium, Netherlands Italy, Germany) (Carlon, 2007) and in Québec (MDDEP, 2002) rely on concentrations to determine soil contamination status. However, concentrations do not provide any information on the effect of contaminants on the biological receptors that are in contact with the impacted soils and, more specifically, on soil health (Bécaert and Deschênes, 2006). Moreover, when dealing with chemical mixtures, the lack of information on compound interactions makes the approach inappropriate for evaluating soil toxicity. When assessing remediated soils, biological tests need to be combined with traditional chemical analyses (Plaza et al., 2005). Biological indicators are more suitable for soil toxicity evaluation and are sensitive enough to rapidly respond to changes in soils (Bastida et al., 2008).

Microorganisms constitute an interesting biological indicator to evaluate soil toxicity when monitoring soil remediation: they operate within communities and interact with soil species, functions and components (organic matter, particles, pH, etc.) (Winding et al., 2005). As compared to traditional ecotoxicological tests, microorganisms used as indicators provide practical advantages: short-time realization and lower costs. Microbial enzymatic activity measurements are attractive (Gianfreda et al., 2005; Labud et al., 2007). However, the complex behaviour of enzymes is a drawback to their use as soil indicators (Trasar-Cepeda et al., 2008). One measurement is insufficient, since many properties and/or functions must be considered (Karlen et al., 2003). These assessments led to the development of integrated single indices (Bécaert and Deschênes, 2006; Bastida et al., 2008). Quantification into a single index to assess soil health requires considering many functions and their spatial-temporal variations in response to change. A quality index must also show the capacity of a soil to perform its functions in a sustainable way, reflecting the dynamics of soil function properties as well as the biological, chemical and physical properties and interactions (Karlen et al., 2003).

The concept of soil functional stability, defined as the capacity of a soil to withstand and recover from a stress (Seybold et al., 1999), constitutes an interesting approach to evaluate the

dynamic response of an ecosystem. The functional stability depends on two components: resistance and recovery (Pimm, 1984). When evaluating functional stability, resistance and recovery parameters are usually individually calculated (Griffiths et al., 2001; Orwin and Wardle, 2004; Zhang et al., 2010). Bécaert and collaborators (2006) proposed to integrate both parameters and the dynamic recovery rate into a single index: the Relative Soil Stability Index (RSSI), based on extracellular hydrolase potential monitoring over a time period and the use of heat-stress. Stability quantification is carried out by comparing the amount of work a function can perform in perturbed and unperturbed soils. Hydrolase has the advantage of responding more quickly to a perturbation than other microbial functions (Dick, 1997) and is easily measured using quick and inexpensive methods (Nannipieri et al., 2002). Enzymes reflect soil microbial community organization (Sinsabaugh et al., 2002) and play a key role in many of the soil functions involved in biogeochemical cycles (C,N,P,S) (Dick, 1997). Initially developed to evaluate soil health and aimed at monitoring the functional stability of enzymatic functions (Bécaert et al., 2006; Dussault et al., 2008), the RSSI tool showed good potential as a basis for the development of a terrestrial ecotoxicological tool using the microbial trophic level. However, it does not consider the inhibitive effect of high contaminant concentrations on the enzymes, which should be accounted for in a context of soil remediation. This paper suggests modifications in RSSI score calculations to account for this inhibitive effect by introducing a reference soil.

The aim of this study was to test the adapted RSSI (i.e. RSSIr) calculation and methodology with a complex contaminant (creosote) to assess its ability to discriminate between high and low contamination levels for use in remediation site monitoring. Different soil types were used to examine the impacts of soil properties on the tool. Stability after heat-stress was monitored through the activity of enzymes that play a key role in N- and S-cycles: protease, urease and arylsulfatase. Creosote was chosen for its composition: mainly PAHs and dioxins and furans traces—highly toxic compounds (World Health Organization, 2004). Moreover, PAHs have already shown negative impacts on the selected enzymes (Andreoni et al., 2004; Gianfreda et al., 2005).

5.3 Materials and methods

5.3.1 Soil property characterization

Natural soils were collected from the upper 20 cm of three locations (Delson, Pointe-aux-Trembles, Joliette) in the Montréal area (Canada), sieved through 2 mm mesh and stored at 10°C. Soil property characterization was performed: total carbon (TC) as described in Method D2974 (ASTM, 1998) by using an induction furnace (LECO Corporation, St-Joseph, MI); total inorganic carbon (TIC) by infrared determination after a phosphoric acid treatment; water holding capacity (WHC) as referred in Method D2980-71 (ASTM, 1996); the Standard total Kjeldahl nitrogen (TKN) and pH using a potentiometer (Orion Surfow semi-micro Ross combination pH electrode) according to Method D-4972-95a (ASTM, 1995). Total organic carbon (TOC) was calculated with the difference between TC and TIC. Particle size distribution according to Methods D1140-92 (ASTM, 1997a) and D422-63 (ASTM, 1997b) enabled soil texture determination using the USDA classification system (sand [2 mm - 50 μ m]; silt [50 μ m - 2 μ m]; clay [< 2 μ m]).

5.3.2 Chemical analysis of the creosote solution and soil creosote spiking

The creosote solution was provided by a manufacturer located in the Montréal area. PAHs and C₁₀-C₅₀ were analyzed by a GC model 6890A (Agilent, USA) coupled with a 5973MS detector (Agilent, USA) and by a GC-FID model 6890N (Agilent, USA), respectively. Settings (temperatures, time, injection volumes) for both GCs were those set out by D'Amours and collaborators (2008).

Five creosote contamination levels (0; 0.17; 1.70; 24 and 60 mL. dry soil kg⁻¹) were chosen: C₀ for uncontaminated soil, C₁, C₂ respectively for criteria B (maximal limit allowed for residential sites) and C (maximal limit allowed for industrial sites) soil restoration aims, as set out by the Québec government (MDDEP, 2002), C₃ and C₄ for high concentrations. Creosote spiking was performed in 1 L amber containers. Dichloromethane (2 mL), only used to help disperse contaminants on bottle walls, was added to the creosote. After dichloromethane residue volatilization, soil (600 g) was introduced. Microcosms were then placed in a mechanical tumble agitator for 24 h to ensure homogenization and better surface contact between contaminants and soil particles. Soils were moisturized with Millipore water up to 60 % (w/w) WHC and stored at

room temperature for two weeks for contamination ageing and soil microflora adaptation to contaminants.

5.3.3 Experimental design

The experimental design consisted of 30 microcosms (300 g): 3 soil types X 5 concentrations X 2 operating modes (heated or not). On day 1 of the experiments, a perturbation similar to a heat-wave or moderate fire was applied to half of the 30 microcosms by heating them in a ventilated oven at 60°C for a 24 hour-period (Bécaert et al., 2006). Immediately after heat-perturbation (day 2), the heated soils were cooled down to room temperature and moisturized with Millipore water up to their initial water content (60 % (w/w) WHC). Perturbed and reference (uncontaminated and unperturbed) soil microcosms were sampled six times within a two-week period (days 1, 2, 3, 5, 8 and 12). Contaminated and unperturbed soil microcosms were sampled four times (days 1, 4, 9 and 12). The experimental timeline was 12 days, considering that biological functions stabilize after 10 to 15 days (Griffiths et al., 2001; Bécaert et al., 2006). RSSI and RSSIr values were calculated on all samples to examine the influence of creosote and soil types on enzymatic functional stability.

5.3.4 Enzyme assay monitoring

To determine protease activity, soil samples (1 g) were incubated for 2 h at 50°C with a 5 mL casein solution (2 % (w/v)) as substrate and a 5 mL Tris-Buffer (0.05 M, pH 8.1) solution (Ladd and Butler, 1972). During incubation, amino acids were released and proteins were then precipitated following the addition of trichloroacetic acid (0.92 M). The aromatic amino acids reaction with Folin–Ciocalteu’s phenol reagent in an alkaline solution resulted in the formation of a blue complex, which was quantified using a colorimetric assay measured at 700 nm.

To determine urease activity, soil samples (1 g) were incubated for 2 h at 37°C with a 0.5 mL urea solution (720 mM) as substrate and a 4 mL borate buffer (0.1 M, pH 10). Ammonium was then extracted with a 6 mL KCl (2 M) and HCl (1 mM) solution. The extracted content was quantified using a modified Berthelot reaction (Kandeler, 1996) and by colorimetric method at 685 nm.

To determine arylsulfatase activity, soil samples (1 g) were incubated for 2 h at 37°C with a 1 mL potassium p-nitrophenylsulfate solution (20 mM) as substrate and a 4 mL acetate buffer

(0.5 M, pH 5.8) (Strobl and Traunmüller, 1996). The reaction was stopped with the addition of 1 mL CaCl_2 solution (0.5 M) and 10 mL sodium hydroxide (0.5 M). The extracted p-nitrophenol was quantified by colorimetric assay at 420 nm.

All enzyme assays were performed in triplicate and all colorimetric assays were read by a fluorescence detector (Genios Tecan) using 96-well microtiter plates.

5.3.5 PAH and C₁₀-C₅₀ soil extraction and analysis

On day 2, additional samplings in perturbed and unperturbed soils were collected for PAH and C₁₀-C₅₀ characterization.

For PAH extraction, soils (1 g) were dehydrated with anhydride MgSO_4 in cellulose extraction thimbles (Whatman) and spiked with a recovery standard solution of decafluorobiphenyl (Aldrich). The extraction method was adapted from the Soxhlet method (USEPA, 1996) and all extractions were performed using a Soxtec unit (model 1043, Tecator). PAHs were extracted during 16 h with 40 mL of dichloromethane at 110°C. The solvent was then evaporated, replaced by acetonitrile and rinsed for 30 min at 180°C. The PAH-extracts in acetonitrile were then transferred into 50 mL-flasks and analyzed in 2 mL-vials by HPLC according to the USEPA method (1986). HPLC was equipped with 254 nm settled ultraviolet (UV Spectra Focus) and fluorescence (FL3000 Spectra Focus) detectors, a helium degasser, SN4000 controller, P4000 pump, AS3000 auto-sampler, 150 x 4.6mm CSC-A300/PAH chromatography column and 20 x 4mm drop-in cartridges, 20 mm CSC-guard column and a CSC 1/16"SSi filter pre-column. Samples were analyzed for the 16 PAH priority pollutants listed by the USEPA. The calibration solution was the 1647d priority pollutant PAH. Column and pre-column were maintained at 30°C. The mobile phases were acetonitrile and water. Flow rate was 0.8 mL.min⁻¹. Elution conditions for acetonitrile were initially maintained at 50 % (0 to 3.8 min), increased linearly from 50 % to 100 % (3.8 to 35 min) and finally maintained at 100 % (35 to 40 min).

For C₁₀-C₅₀ extraction, soil samples (1 g) were dehydrated with anhydride Na_2SO_4 and transferred into 30 mL extraction bottles according to CEAEQ protocol (2002). After adding hexane (5 mL or 10 mL with high TOC soils), the bottles were placed in an ultrasonic bath for 10 min (20 min for high TOC soils). Hexane was added (10 mL), and the bottles were mechanically shaken for 30 min. C₁₀-C₅₀ extracts in hexane were transferred into SiO_2 columns

(2 mL-vials) and analyzed by GC-FID (Varian CP-3380) according to CEAEQ protocol (2007). The calibration solution was imperial diesel oil (Esso). GC was equipped with a 25 m x 0.32 mm CP-SIL8CB low-bleed/MS capillary column with a 0.15 μm stationary phase, an auto-sampler CP-8200 and a FID detector. The mobile phase was helium, and its flow rate was 30 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The injector was on-column, initially maintained at 69°C, increased by 200°C $\cdot\text{min}^{-1}$ to 300°C and maintained for 5 min. The detector was at 320°C. The initial oven temperature was maintained at 30°C, increased by 10°C $\cdot\text{min}^{-1}$ to 300°C and maintained for 10 min.

All extractions and chemical analyses were performed in duplicate.

5.3.6 Enzymatic stability calculation

The RSSI tool, which compares the potential capacity of the enzymatic transformations of a perturbed and unperturbed soil (Bécaert et al., 2006) is obtained by dividing the value of the area under the enzymatic activity curve (EA) between days 1 and 12 for the perturbed soil by the value of the enzyme activity between days 1 and 12 for the same unperturbed soil (Équation 5-1).

Équation 5-1 :

$$RSSI = \frac{\int_{day\ 1}^{day\ 12} EA_{perturbed\ soil}(t).dt}{\int_{day\ 1}^{day\ 12} EA_{unperturbed\ soil}(t).dt}$$

A modification of this index is proposed to consider the stimulation or inhibition of enzymatic activity potential due to contamination levels: the reference soil is not the unperturbed soil but rather the uncontaminated unperturbed soil. This new index, dubbed the Relative Soil Stability Index using a Reference soil (RSSIr), represents the ratio between the capacity of enzymatic transformations of a perturbed soil and that of a homologous reference (the same uncontaminated unperturbed soil). The RSSIr is obtained by dividing the value of the area under the enzymatic activity curve between days 1 and 12 of the perturbed soil by the value of the enzyme activity between days 1 and 12 of the reference soil (Équation 5-2).

Équation 5-2 :

$$RSSIr = \frac{\int_{day\ 1}^{day\ 12} EA_{perturbed\ soil}(t).dt}{\int_{day\ 1}^{day\ 12} EA_{reference\ soil}(t).dt}$$

RSSIr and RSSI scores were calculated for all samples (3 soil types X 5 concentrations). Values are dimensionless and expressed in percentage. Scores close to 100 % and 0 % reflect good and inadequate soil enzymatic stability, respectively.

5.3.7 Statistical analysis

All statistical analyses were performed using STATISTICA 9.0 (StatSoft©). To compare mean values (RSSI or RSSIr) between treatments, ANOVAS were carried out using LSD tests ($p < 0.05$). Pearson's correlation coefficients ($p < 0.05$) were used to test the degree of relationship between concentrations and RSSIr values. An ANCOVA was carried out to test the influence of soil types, concentrations and their interaction on the RSSIr. Concentration data were transformed using the $\log(1+x)$ function to ensure linearity between concentrations and dependent values. Urease activity data (RSSI and RSSIr scores) were treated in their transformed form using $\log(1+x)$ to respect normality and ensure better variance homogeneity.

5.4 Results and discussion

5.4.1 Soil physicochemical property analysis

A USDA diagram classifies soils as sandy clay loam, clay and sandy loam (Tableau 5-1). The sandy clay loam has the highest TOC and TKN values, 10 times higher than in the other soils. Measured TIC represents low fractions of soil TC, which is essentially composed of TOC. A low alkalinity close to neutrality characterizes the clay, while the other soils show low acidity. Soils show property differences and make it possible to test the tools with different soils.

PAH and C_{10} - C_{50} concentrations are significantly ($p < 0.001$) and highly correlated with theoretical concentrations ($r = 0.97$ for PAHs, $r = 0.97$ for C_{10} - C_{50}) and also one another ($r = 0.94$). PAH concentrations appear lower than theoretical ones (0; 87; 870; 12 432; 31 173 mg PAH total.dry soil kg^{-1}), maybe because only 16 PAHs were analyzed while all PAHs were considered in contamination level calculations, especially for criterias B and C. Also, contaminants show heterogeneity of dispersion in soils (high standard deviations in concentrations). Inversely, C_{10} - C_{50} -concentrations were higher than theoretical ones (0; 17; 174; 2 479; 6 216 mg.dry soil kg^{-1}). Differences in concentrations between soils are also explained by soil composition, which could impact the extraction process.

Tableau 5-1 : Physicochemical properties and theoretical concentrations in the natural soils. Values are represented as mean \pm s.e., n = 3.

USDA classification	Sandy clay loam	Clay	Sandy loam
Sand (% w/w)	53.6	18.2	66.7
Silt (% w/w)	16.9	30.6	13.5
Clay (% w/w)	29.5	51.2	19.8
TC (g.kg ⁻¹ dry soil)	396 \pm 2.	33.0 \pm 0.6	31.0 \pm 0.4
TOC (g.kg ⁻¹ dry soil)	365 \pm 14	26.3 \pm 0.8	24.0 \pm 0.6
TKN (g.kg ⁻¹ dry soil)	12.5 \pm 0.7	1.5 \pm 0.1	1.8 \pm 0.1
WHC (g.H ₂ O kg ⁻¹ dry soil)	2.12 \pm 0.05	0.59 \pm 0.01	0.73 \pm 0.06
pH (1 :2 in Water)	6.60	7.03	6.64
PAH (mg. dry soil kg ⁻¹)			
C ₀	1.9 \pm 3.7	5.9 \pm 2.6	9.4 \pm 0.2
C ₁	13.7 \pm 1.1	26.8 \pm 5.5	31.8 \pm 4.6
C ₂	116 \pm 47	404 \pm 51	369 \pm 68
C ₃	5 251 \pm 1 238	6 733 \pm 1 572	6 930 \pm 1 889
C ₄	15 036 \pm 4 040	21 331 \pm 1 728	20 148 \pm 3 681
C ₁₀ -C ₅₀ (mg.dry soil kg ⁻¹)			
C ₀	182 \pm 37	27 \pm 21	75 \pm 62
C ₁	350 \pm 199	52 \pm 34	173 \pm 103
C ₂	540 \pm 200	434 \pm 170	254 \pm 151
C ₃	3 928 \pm 2 200	9 376 \pm 2 026	6 694 \pm 5 625
C ₄	23 472 \pm 3 886	29 427 \pm 7 623	21 269 \pm 7 277

5.4.2 RSSIr vs. RSSI sensitivity to contamination levels

For a creosote contamination, the RSSIr is more effective than the RSSI in discriminating between low and high concentration effects. According to ANOVA's results, RSSI values are not particularly sensitive to creosote contamination: discrimination between low and high contamination appears difficult (Figure 5-1). Only RSSI values based on protease activity and calculated for clay and sandy loam show discriminations between low (C₀, C₁, C₂) and high contamination levels (C₃, C₄). However, the RSSI tendency is not confirmed in the sandy clay loam: level C₃ is not significantly different from low contamination levels. Inversely RSSIr values based on protease and urease activities differ significantly in all soils when comparing low and high contamination levels (Figure 5-1). RSSIr values are also significantly ($p < 0.001$) and negatively correlated with concentrations (protease: $r = -0.80$ with PAHs and $r = -0.85$ with C₁₀-C₅₀; urease: $r = -0.73$ with PAHs and $r = -0.56$ with C₁₀-C₅₀).

With regards to arylsulfatase, the RSSI and RSSIr scores show no significant difference between contamination levels. Arylsulfatase is not a useful indicator to measure soil quality since it is insensitive to the toxic actions of contaminants.

For protease activity and for less contaminated and uncontaminated soils, RSSI and RSSIr values are close to or higher than 100 %, suggesting high soil enzymatic function stability and the ability of the microbial cells that produce protease to resist heat-stress when in presence of low contamination levels. In C₀ and C₁ clays, RSSI and RSSIr values strongly exceed the 100 % threshold (184 and 197 % for RSSI scores, respectively, and 184 and 160 % for RSSIr scores). This observation points to a stimulation of the enzymatic activity due to the sudden occurrence of amino acids or a protease microbial release after heat-stress.

In literature, protease activities in clean and less contaminated sandy and sandy loamy soils have already demonstrated high recovery after a 60°C-perturbation (Bécaert et al., 2006; Dussault et al., 2008). Dussault and collaborators (2008) noticed a sharp rise in protease potentials after the 60°C-perturbation in clean soils, consequently reflected in RSSI values up to 2.5 times higher than 100 %, and explained it by protease release due to microbial cell lyses during and after heat-stress. In this study, an increase in protease potential was not detected in C₃ and C₄ heat-perturbed soils, resulting in low RSSIr scores. High creosote concentrations have inhibitory effects on protease release or productivity.

With regards to urease activity stabilities, while the RSSI does not allow comparison between creosote levels, the RSSIr does. RSSIr values discriminate significantly between low and high creosote levels. RSSI and RSSIr values do not exceed 52 %, even in low contaminated soils. These results are explained by the inhibition of urease activities by the heat-stress (Figure 5-2). Because no significant differences between PAH and C₁₀-C₅₀ concentrations in perturbed and unperturbed soils just after heat application (day 2) are statistically observed (data not shown), variations in enzyme potentials after heat-stress cannot be due to the loss of contaminants in soils. Bécaert and collaborators (2006) also found similar results for urease activities after applying a heat-stress on 2,4-D low-contaminated sandy soils. No recovery of the enzymatic activity was found within 15 days. The sensitivity of urease to temperature and the long time (months) to recover to initial states has been documented (Ajwa et al., 1999).

Urease activity was also affected by pre-heat stress contamination (Figure 5-2, day 1): urease appears stimulated and inhibited when in presence of respectively low (C₁, C₂) and high (C₃, C₄) creosote concentrations, particularly in sandy clay loam (stimulation of 26 and 28% and inhibition of 47 % and 48 % are registered in C₁, C₂, C₃ and C₄ soils, respectively). Creosote

impacts on urease activity can be compared with studies evaluating the influence of hydrocarbons on enzyme activities in soils: urease seemed impacted by diesel (Labud et al., 2007; Pena et al., 2007) and PAHs (Gianfreda et al., 2005). Mostly enzymatic activity enhancements were generated with low hydrocarbon levels as a carbon source for microorganisms (Margesin et al., 2000). Even if microbial communities are affected by hydrocarbons, the surviving microorganisms adapt their metabolism (Labud et al., 2007) and thus continue extracellular enzymes production.

In industrial hydrocarbon contaminated soil, Griffiths et al. (2001) identified poor resistance to a 40°C-disturbance compared to uncontaminated soil. Protease and urease results confirmed a better functional stability in low than in high creosote-contaminated soils.

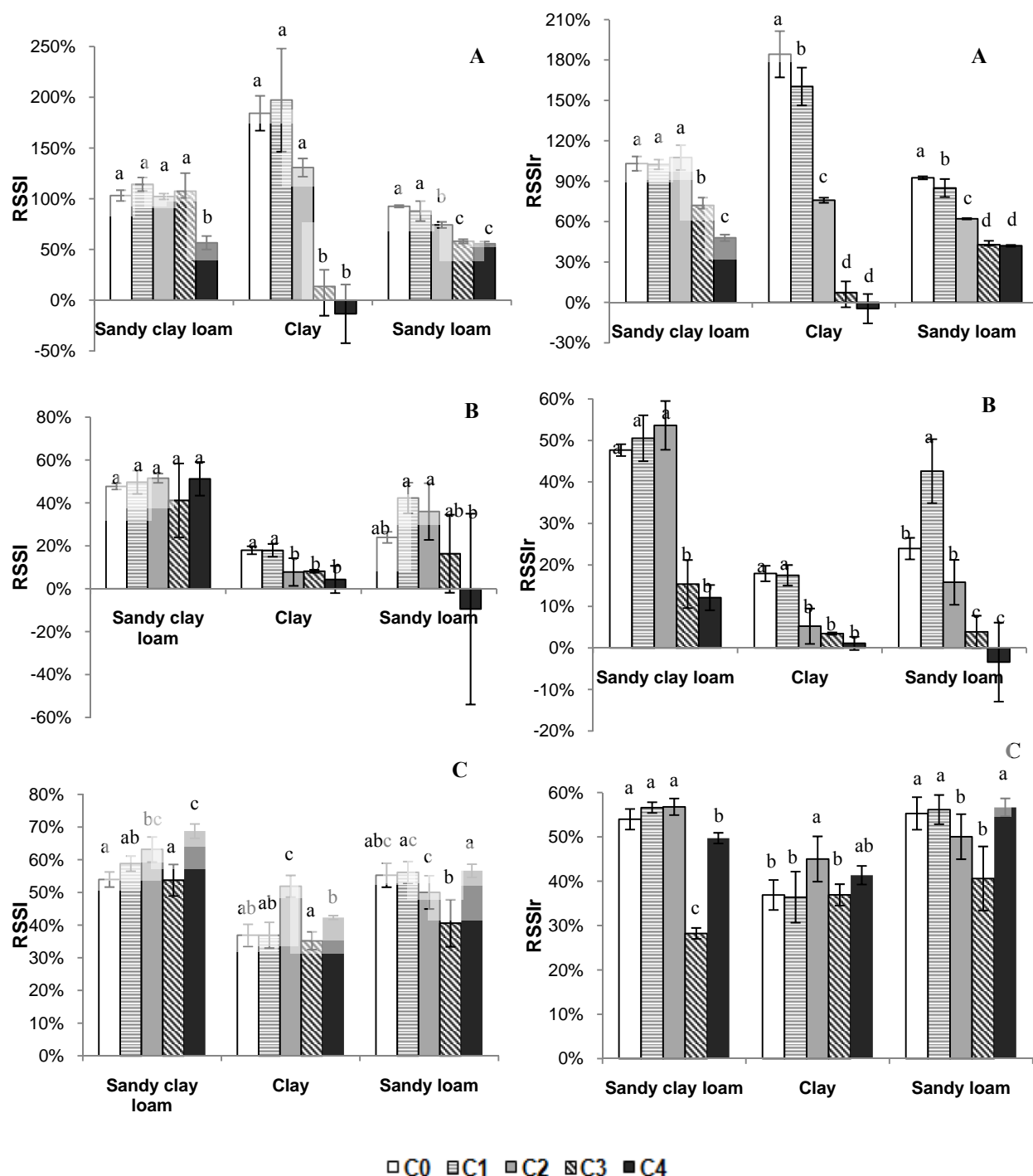


Figure 5-1 : RSSI and RSSIr scores based on protease (A), urease (B) and arylsulfatase (C) activities obtained for each soil type and contamination level. For each enzyme and each soil type, contamination levels not connected by the same letter are significantly different, when using LSD Mean test ($n = 3$; $p < 0.05$). Creosote levels C₀, C₁, C₂, C₃ and C₄ represent respectively 0; 0.17; 1.70; 24 and 60 mL creosote. dry soil kg⁻¹.

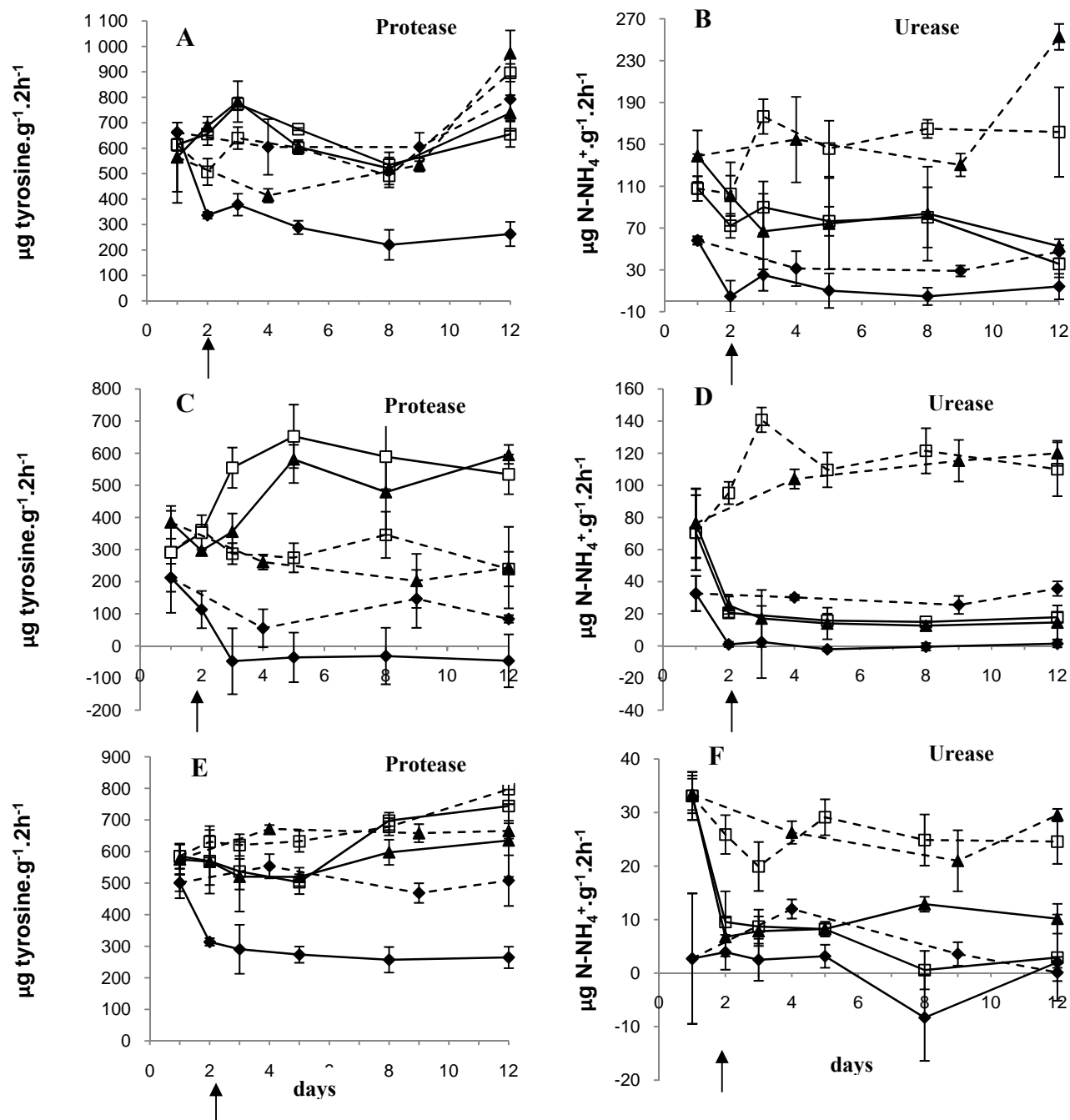


Figure 5-2 : Protease and urease activities of heat-perturbed soils (plain lines) and unperturbed soils (dashed lines), for contaminated soils (black symbols) and clean soils (white squares). Example curves of contaminated soils are presented for levels C_1 (triangles) and C_4 (diamonds) for sandy clay loam (A, B), clay (C, D) and sandy loam (E, F). Arrows indicate the day of heat application (day 2). Values are represented as mean \pm s.e. ($n = 3$).

5.4.3 Influence of soil type on the RSSIr

RSSI_r values are dependent on soil type and show similar variation trends for the sandy clay loam and sandy loam (slopes not significantly different for protease and urease) but different trends for clay (Figure 5-3). Soil type, creosote concentrations and their interactions have a statistical effect on RSSI_r scores based on protease and urease activities (results not shown). Both multiple linear regression models are significant ($p < 0.001$) ($r^2 = 0.95$ with PAHs, $r^2 = 0.96$ with C₁₀-C₅₀ for protease and $r^2 = 0.82$, with PAHs, $r^2 = 0.82$ with C₁₀-C₅₀ for urease). Individual degrees of regression are significant ($p < 0.001$) but higher in protease analysis by soil type (with PAHs $r = -0.87$, $r = -0.99$, $r = -0.98$, with C₁₀-C₅₀ $r = -0.95$, $r = -0.98$, $r = -0.92$ in respectively sandy clay loam, clay and sandy loam) than for urease (with PAHs $r = -0.88$, $r = -0.92$, $r = -0.85$, with C₁₀-C₅₀ $r = -0.91$, $r = -0.90$, $r = -0.82$ in sandy clay loam, clay and sandy loam, respectively).

Regressions confirm that RSSI_r scores decrease when concentrations rise. The measure of functional stability should thus be compared for a given soil type. Similar observations have been made in the literature. Stability values evaluated through enzymatic activity were not unique and highly depended on soil type (Bécaert et al., 2006; Dussault et al., 2008). According to Griffiths and collaborators (2008), resistance and resilience components vary from one soil to another because of soil structure, which is responsible for the microbial community.

PAH ecotoxic effects on soil also depend on soil structure. In a recent study, phenanthrene effect on soil nitrifying bacteria differed significantly from one soil to another (Maliszewska-Kordybach et al., 2007). PAHs are recognized as having high adsorption properties on fine particles such as clay (Krauss and Wilcke, 2002) and organic matter (Yang et al., 2010), which may alter their effects on microorganisms. Therefore, the effect of creosote on microorganisms is modified when soil composition changes—especially organic matter or clay contents. No matter the soil type, the RSSI_r has the advantage of considering the soil as a whole complex system and therefore, detecting the vulnerability of a soil environment and its specific structure when contaminated.

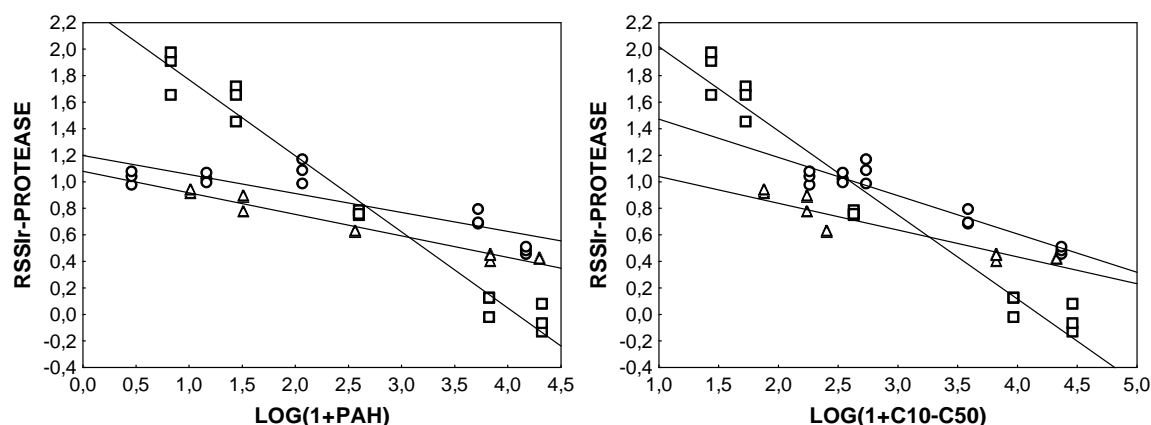


Figure 5-3 : RSSIr scores variation as the function of creosote concentrations for the enzyme protease in sandy clay loam (circles), clay (squares) and sandy loam (triangles); Creosote concentrations are expressed in total PAH mg.dry soil kg⁻¹ and C₁₀-C₅₀ concentrations are expressed in mg C₁₀-C₅₀.dry soil kg⁻¹ (n = 3).

5.5 Conclusion

These results highlight the sensitivity of functional stability measurement when discriminating between low and high creosote contamination levels and its promising use as an ecotoxicological index for remediation. The RSSIr tool assesses the effects of contaminants on soil better than the RSSI, by favouring the comparisons of soils whose contamination levels differ from a given reference soil. Compared to traditional ecotoxicological tests, the RSSIr tool offers several advantages: short analysis time, lower cost, and no species selection. Finally, further studies must be carried out to determine the influence of wider contaminant and soil type ranges.

5.6 Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of the industrial partners in the International Chair in Life Cycle Assessment (a research unit of CIRAIG): ArcelorMittal, Bell Canada, Cascades, Eco Entreprises Québec, RECYC-QUÉBEC, Groupe EDF, Gaz de France, Hydro-Québec, Johnson & Johnson, Mouvement des caisses Desjardins, Rio Tinto Alcan, RONA, SAQ, Total and Veolia Environment.

5.7 References

- Ajwa, H.A., Dell, C.J., Rice, C.W., 1999. Changes in enzyme activities and microbial biomass of tallgrass prairie soil as related to burning and nitrogen fertilization. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 769-777.
- Andreoni, V., Cavalca, L., Rao, M.A., Nocerino, G., Bernasconi, S., Dell'Amico, E., Colombo, M., Gianfreda, L., 2004. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere* 57, 401-412.
- ASTM, 1995. Standard test method for pH of soils D4972-95a. *Annual Book of ASTM Standards*, West Conshohocken, PA, pp. 10-16.
- ASTM, 1996. Standard Test Method for Volume Weights, Water-Holding Capacity, and Air Capacity of Water-Saturated Peat Materials D2980-71 *Annual Book of ASTM Standards*, Philadelphia, PA, pp. 332-333.
- ASTM, 1997a. Standard Test Methods for amount of material in soil finer than No.200 (75µm) sieve D 1140-92 *Annual Book of ASTM Standards*, Section 4, Philadelphia, PA, pp. 102-105.
- ASTM, 1997b. Standard Test Methods for particle size-analysis of soils. D 422-63 . *Annual Book of ASTM Standards*, Philadelphia, PA, pp. 10-17.
- ASTM, 1998. Test method for organic matter content D2974. *Annual Book of ASTM Standards*, Philadelphia, PA.
- Bastida, F., Zsolnay, A., Hernández, T., García, C., 2008. Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma* 147, 159-171.
- Bécaert, V., Deschênes, L., 2006. Using Soil Health to Assess Ecotoxicological Impacts of Pollutants on Soil Microflora. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 127-148.
- Bécaert, V., Samson, R., Deschenes, L., 2006. Effect of 2,4-D contamination on soil functional stability evaluated using the relative soil stability index (RSSI). *Chemosphere* 64, 1713-1721.
- Carlou, C., 2007. Derivation methods of soil screening values in Europe. A review and evaluation of national procedures towards harmonization. in: C, C. (Ed.). *European Commissions, Joint Research Centre, Ispra*, p. 306.
- CEAEQ, 2002. Dosage des hydrocarbures pétroliers C10 à C50 dans les sols et les sédiments, MA. 416 – C10-C50 1.0. Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, p. 15.
- CEAEQ, 2007. Détermination des hydrocarbures pétroliers (C10 à C50) : dosage par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme, MA. 400 – HYD. 1.1. Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, p. 17.
- D'Amours, D., Samson, R., Deschênes, L., 2008. Environmental innocuousness of the activation of a microbial consortium from creosote-contaminated soil in a slurry bioreactor. *Journal Environmental Engineering Science* 7, 581-595.

- Dick, R.P., 1997. Soil Enzyme Activities as Integrative Indicators of Soil Health. in: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R. (Eds.). *Biological Indicators of Soil Health*. Cab international, United Kingdom, pp. 121-156.
- Dussault, M., Becaert, V., Francois, M., Sauve, S., Deschenes, L., 2008. Effect of copper on soil functional stability measured by relative soil stability index (RSSI) based on two enzyme activities. *Chemosphere* 72, 755-762.
- Gianfreda, L., Rao, M.A., Piotrowska, A., Palumbo, G., Colombo, C., 2005. Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: Intensive agricultural practices and organic pollution. *Science of the Total Environment* 341, 265-279.
- Griffiths, B., Hallett, P., Kuan, H., Gregory, A., Watts, C., Whitmore, A., 2008. Functional resilience of soil microbial communities depends on both soil structure and microbial community composition. *Biology and Fertility of Soils* 44, 745-754.
- Griffiths, B.S., Bonkowski, M., Roy, J., Ritz, K., 2001. Functional stability, substrate utilisation and biological indicators of soils following environmental impacts. *Applied Soil Ecology* 16, 49-61.
- Kandeler, E., 1996. Urease Activity by Colorimetric Technique. in: Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., Margesin, R. (Eds.). *Methods in Soil Biology*. Springer, Germany, pp. 171-174.
- Karlen, D.L., Ditzler, C.A., Andrews, S.S., 2003. Soil quality: why and how? *Geoderma* 114, 145-156.
- Krauss, M., Wilcke, W., 2002. Sorption Strength of Persistent Organic Pollutants in Particle-size Fractions of Urban Soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 66, 430-437.
- Labud, V., Garcia, C., Hernandez, T., 2007. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere* 66, 1863-1871.
- Ladd, J.N., Butler, J.H.A., 1972. Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biology and Biochemistry* 4, 19-30.
- Maliszewska-Kordybach, B., Klimkowicz-Pawlas, A., Smreczak, B., Janusauskaite, D., 2007. Ecotoxic Effect of Phenanthrene on Nitrifying Bacteria in Soils of Different Properties. *J Environ Qual* 36, 1635-1645.
- Margesin, R., Zimmerbauer, A., Schinner, F., 2000. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere* 40, 339-346.
- MDDEP, 2002. Protection des sols et réhabilitation des terrains contaminés - Politique ministérielle. Développement durable, Environnement et Parcs, Québec. Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Québec.
- Nannipieri, P., Kandeler, E., Ruggiero, P., 2002. Enzyme Activities and Microbiological and Biochemical Processes in Soil. in: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.). *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications*. Marcel Dekker, Inc., pp. 1-34.
- Orwin, K.H., Wardle, D.A., 2004. New indices for quantifying the resistance and resilience of soil biota to exogenous disturbances. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 1907-1912.

- Pena, W., Trasar-Cepeda, C., Gil-Sotres, F., Leiros, M.C., 2007. Modification of the degradative capacity of a soil artificially contaminated with diesel. *Chemosphere* 67, 1057-1063.
- Pimm, S.L., 1984. The complexity and stability of ecosystems. *Nature* 307, 321-326.
- Plaza, G., Nalecz-Jawecki, G., Ulfig, K., Brigmon, R.L., 2005. The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. *Chemosphere* 59, 289-296.
- Seybold, C.A., Herrick, J.E., Brejda, J.J., 1999. Soil Resilience: A Fundamental Component of Soil Quality. *Soil Science* 164, 224-234.
- Sinsabaugh, R.L., Carreiro, M.M., Alvarez, S., 2002. Enzyme and Microbial Dynamics of Litter Decomposition. in: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.). *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications*. Marcel Dekker, Inc., pp. 249-265.
- Strobl, W., Traunmüller, M., 1996. Arylsulfatase activity. in: Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., Margesin, R. (Eds.). *Methods in Soil Biology*. Springer, Germany, pp. 230-232.
- Trasar-Cepeda, C., Leiros, M.C., Gil-Sotres, F., 2008. Hydrolytic enzyme activities in agricultural and forest soils. Some implications for their use as indicators of soil quality. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 2146-2155.
- U.S. EPA, 1986. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. EPA Method 8310. U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C., p. 13.
- USEPA, 1996. Soxhlet Extraction. EPA Method 3540 C. U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C., p. 8.
- Winding, A., Hund-Rinke, K., Rutgers, M., 2005. The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62, 230-248.
- World Health Organization, 2004. Coal Tar Creosote - Concise International Chemical Assessment Document 62. Concise International Chemical Assessment, Geneva, Switzerland, p. 143.
- Yang, Y., Tao, S., Zhang, N., Zhang, D.Y., Li, X.Q., 2010. The effect of soil organic matter on fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil: A microcosm study. *Environmental Pollution* 158, 1768-1774.
- Zhang, B., Deng, H., Wang, H.-l., Yin, R., Hallett, P.D., Griffiths, B.S., Daniell, T.J., 2010. Does microbial habitat or community structure drive the functional stability of microbes to stresses following re-vegetation of a severely degraded soil? *Soil Biology and Biochemistry* 42, 850-859.

CHAPITRE 6 RÉSULTATS : UTILISATION DE L'OUTIL POUR ÉVALUER LA QUALITÉ DE SOLS EN COURS DE BIOREMÉDIATION

Ce chapitre présente les résultats obtenus pour répondre au second objectif du projet qui est de vérifier l'utilisation de l'outil de stabilité enzymatique dans un contexte de bioremédiation. Les principaux résultats relèvent d'une étude de cas spécifique : la bioremédiation de sols de terrains contaminés avec des hydrocarbures et en particulier des HAP. Il est à noter que certains résultats sont similaires à ceux exposés dans les Chapitres 4 et 5. Les résultats de l'ensemble des deux études sont comparés et discutés par la suite dans le Chapitre 7. Les sols utilisés dans cette étude ont été soigneusement fournis par une entreprise qui possède un site anciennement contaminé par différents produits pétroliers.

6.1 Caractérisation des sols étudiés

Les sols fournis sont de texture crayeuse. Cette texture est typique des sols du Nord-Pas-de-Calais, où les sous-sols sont fréquemment constitués de craie, donnant ainsi des propriétés calcaires aux sols (Direction Régionale de l'environnement Nord-Pas-de-Calais, 2008).

6.1.1 Composition des sols

La distribution granulométrique des sols a été réalisée et leur classification déterminée par celle établie par l'USDA (Natural Resources Conservation Service, 2009). Le Tableau 6-1 répertorie la composition des sols, leur CRC et le pH.

Tableau 6-1 : Caractérisation physique (texture, composition, CRC) et pH des sols de la Compagnie

Étape de Traitement	Texture (USDA)	Sable (%)	Limon (%)	Argile (%)	CRC (g eau/g sol sec)*	pH (1 :2 Eau)
Avant traitement	Loam	45,6	41,5	12,9	0,51 ± 0.01	7,14
Après co-compostage	Loam	30,6	45,5	23,9	0,60 ± 0.00	7,34
Phytoremédiation	Loam sableux	66,6	22,0	11,4	0,83 ± 0.04	7,55
Témoin	Loam limoneux	34,7	51,7	13,6	0,46 ± 0.00	7,97

*n = 3

Les sols au stade avant traitement et après traitement par co-compostage sont de même texture (loam) avec des valeurs de proportion en limon très proches (respectivement 41,5 % et 45,5 %). En revanche, bien qu'étant des sols loameux aussi, les sols pendant traitement par phytoremédiation et témoin n'ont pas la même texture; comparés aux deux autres sols, ils possèdent respectivement une plus grande fraction de sable (66,6 %) et de limon (51,7 %). Toutefois, d'après le diagramme de classification des sols de l'USDA, le sol témoin se situe à la limite d'être classé comme un loam. Par ailleurs, il est à noter que les sols avant traitement, pendant traitement par phytoremédiation et témoin ont des valeurs de contenu en argile similaire (respectivement de 12,9 %, 11,4 % et 13,6 %). La différence observée entre les textures des sols n'est pas surprenante, étant donné que les traitements induisent des amendements divers, comme des copeaux de bois et compost. Entre le sol témoin et le sol avant traitement, la différence résulte du fait que les sols contaminés sont constitués de boues contaminées épandues et mélangées au sol témoin. Des différences dans la composition physique des sols risquent de poser quelques problèmes quant à l'utilisation du sol témoin comme sol de référence. La granulométrie du sol joue un rôle essentiel dans la distribution de la contamination dans les sols : les composés organiques tels les HAP, s'adsorbent facilement sur les particules minérales les plus fines (argile et limon) (Krauss et Wilcke, 2002; Wilcke *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2010). Ainsi un changement dans la composition physique des sols pourrait avoir un impact dans la comparaison des sols entre eux via les potentiels d'activité enzymatique et/ou les mesures de stabilité enzymatique dans les sols.

Des textures de sols différentes impliquent des capacités de rétention d'eau différentes, dans chacun des sols. Ceci explique ainsi les valeurs de CRC qui diffèrent d'un sol à l'autre.

Autrement dit, l'humidité appliquée dans les sols pour mesurer les potentiels d'activités enzymatiques dans des conditions optimales (60 % de la CRC) sera différente d'un sol à l'autre.

Quant au pH de ces quatre sols, il est compris entre 7 et 8. Le sol avant traitement possède un pH près de la neutralité (7,15) tandis que le sol témoin présente un pH de type alcalin (7,97). Les deux autres sols, après traitement par co-compostage et pendant traitement par phytoremédiation, ont des pH légèrement alcalins avec des valeurs respectives de 7,34 et 7,55. Toutefois, ces valeurs de pH sont plutôt favorables pour l'activité de la protéase. En effet, dans des conditions optimales, le potentiel d'activité de la protéase se détermine à un pH de 8,0 (Ladd et Butler, 1972), contrairement aux deux autres enzymes (uréase et arylsulfatase) pour lesquelles leurs activités sont favorisées à des pH de 10 et 5,8 respectivement (Kandeler, 1996; Strobl et Traunmüller, 1996). Outre cela, les valeurs de pH des sols étudiés sont proches des valeurs où la dégradation dans les sols est optimale. Selon Dibble et Bartha (1979), une valeur de pH comprise entre 7,5 et 7,8 est un des critères d'optimisation de la biodégradation de boues d'hydrocarbures par la communauté microbienne. Ce pH est quasiment atteint dans les sols en cours de bioremédiation (notamment celui en cours de phytoremédiation). Ainsi le pH du sol semble satisfaisant pour l'activité microbienne, et par conséquent pour une meilleure dégradation des composés organiques.

6.1.2 Composantes chimiques

Les contenus en carbone et azote des sols sont présentés dans le Tableau 6-2. Des analyses de variance (ANOVA) et de corrélations ont été réalisées afin de détecter les effets de la composition des sols et des traitements sur les composantes chimiques du sol.

Tableau 6-2 : Composantes chimiques (CT, COT, CIT, NTK) des sols de la Compagnie

Étape de traitement	CT (g/kg sol sec)	COT (g/kg sol sec)	CIT (g/kg sol sec)	NTK (g/kg sol sec)
Avant traitement	212,33 ±13,01 a*	156,00 ±7,21 a	56,33 ±18,58 ab	1,85 ±0,13 a
Après co-compostage	134,00 ±11,00 b	62,40 ±0,20 c	71,60 ±11,10 a	1,13 ±0,07 b
Phytoremédiation	180,67 ±14,19 a	134,33 ±10,26 b	46,33 ±6,11 b	1,09 ±0,02 b
Témoin	53,03 ±0,32 c	1,75 ±0,15 d	51,28 ±0,17 ab	0,38 ±0,03 c

* Pour les étapes de traitements les valeurs non connectées avec la même lettre sont significativement différentes, en utilisant le test LSD sur les moyennes (n = 3; p < 0,05).

Le sol témoin (sol dépourvu de contamination anthropogénique) possède des contenus en COT et en azote faibles en comparaison avec ceux des trois autres sols. Il est possible de constater que le contenu en CT présent dans le sol est essentiellement constitué de CIT. La présence de CIT est justifiée par le contenu abondant en calcaire dans le sol, le calcaire étant essentiellement constitué de carbonates de calcium et de magnésium. Il est à noter que la teneur en CIT dans chaque sol est quasi non significativement différente entre chaque traitement, ce qui indique que le contenu en carbonates est quasi le même dans les quatre sols. Par ailleurs, le contenu en CIT ne présente aucune corrélation avec les autres composantes : sa valeur est donc indépendante de la contamination et des différents traitements.

La valeur du contenu en COT élevée dans le sol contaminé est principalement due à la présence de contaminants organiques, étant donné la presque inexistence de MO, selon la valeur de COT du sol témoin. Plusieurs études ont constaté de fortes valeurs de contenu en COT et par conséquent de MO, dans des sols contaminés aux hydrocarbures, dues à la présence de contaminants organiques (Andreoni *et al.*, 2004; Gianfreda *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2010). Tang et collaborateurs (2005) ont également montré que les valeurs du contenu en COT dans les sols pouvaient être significativement corrélées et de manière exponentielle ($r^2 = 0,94$) avec les concentrations en HAP, tandis que Li et collaborateurs (2010) concluent plutôt à une relation linéaire positive ($r^2 = 0,72$) entre les deux variables. Dans les sols après traitement par co-compostage et pendant traitement par phytoremédiation, l'ajout d'amendements contribue également à l'augmentation du contenu en MO par rapport au sol témoin, se traduisant par une augmentation de leur contenu en COT (Bandick et Dick, 1999; Tejada *et al.*, 2006; Fujino *et al.*, 2008).

Aussi, des fortes corrélations significatives, présentées dans le Tableau 6-3, ont été détectées entre les paramètres CT, COT, NTK et pH.

Tableau 6-3 : Analyse de corrélation entre les composantes chimiques des sols

	CT	COT	NTK
COT	$r = 0,98, p < 0,001$		
NTK	$r = 0,92, p < 0,001$	$r = 0,87, p < 0,001$	
pH	$r = -0,85, p < 0,001$	$r = -0,78, p = 0,003$	$r = -0,95, p < 0,001$

De fortes corrélations entre le contenu en CT (ou en COT) et le contenu en NTK ont également été trouvées dans les sols naturels non contaminés, mais ayant subi des transformations dues à la déforestation ou l'agriculture ($r = 0,95, p < 0,001$ entre le contenu en COT et celui en NTK) (de la Paz Jimenez *et al.*, 2002) ou encore dans des sols qui ont été brûlés ($r = 0,95, p < 0,001$ entre la MO et le NTK) (Zhang *et al.*, 2005). Ces corrélations entre certaines propriétés des sols démontrent l'association étroite entre certaines composantes des sols et suggèrent que cette association soit sensible aux changements imposés par la gestion des sols. Ainsi, dans le cadre de traitements biologiques, les amendements appliqués tendent généralement à augmenter les taux d'éléments (carbone, azote, ...) dans les sols en vue de favoriser l'activité biologique par l'apport de source de nutriments. Le manque de disponibilité des nutriments pour la communauté microbienne représente, en effet, une entrave à la biodégradation des composés hydrocarbonés dans les sols; par exemple des amendements procurant de l'azote disponible au sol permettent une meilleure dégradation des composés (Aislabie *et al.*, 1998).

Aussi l'apport de résidus organiques au sol se traduit par une augmentation des potentiels d'activités enzymatiques mesurés dans les sols dépourvus de contaminants (Bandick et Dick, 1999; Tejada *et al.*, 2006) ou dans les sols contaminés (Tejada *et al.*, 2008), ainsi qu'une meilleure dégradation des contaminants organiques dans des sols contaminés aux hydrocarbures (Tejada *et al.*, 2008). Dans le cadre de l'étude, les agents structurants biologiques (branches d'arbres déchiquetées, rebuts de compost...) offrent un supplément en MO et par conséquent en COT dans le sol en début de traitement par co-compostage. Toutefois ces agents organiques ne semblent pas être les principaux responsables de la valeur mesurée pour le contenu en NTK dans les sols. En effet, le sol contaminé possède le contenu en NTK le plus élevé parmi les quatre sols,

ce qui indique que l'apport de NTK soit essentiellement dû à la présence de contaminants organiques dans le sol plutôt qu'aux amendements provenant des différents traitements. La perte d'azote observée dans les sols lors d'un traitement à l'autre peut aussi s'expliquer par le facteur de dilution induit par l'ajout d'amendements dans les sols.

6.1.3 Caractérisation de la contamination présente sur le site

La Figure 6-1 présente la quantification des contenus en HAP et C₁₀-C₅₀, des sols en provenance de l'ancienne usine de goudron de houille.

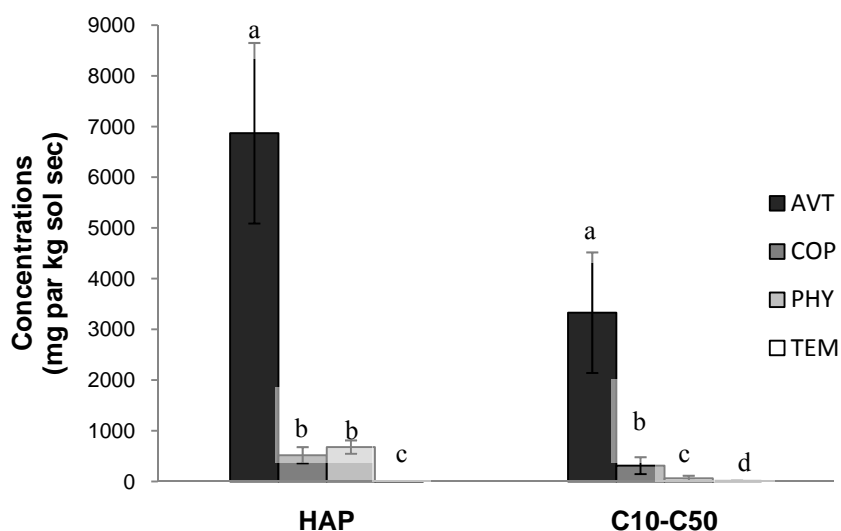


Figure 6-1 : Concentrations en HAP et en C₁₀-C₅₀ dans les sols contaminés avant traitement (AVT), après co-compostage (COP), pendant phytoremédiation (PHY) et dans le sol témoin (TEM); les valeurs non connectées avec la même lettre étant significativement différentes, d'après le test LSD sur les moyennes ($n = 3$; $p < 0.05$); les données étant transformées en $\log(x)$ pour l'analyse

La caractérisation de la contamination montre que le sol avant traitement par co-compostage possède des concentrations en HAP et C₁₀-C₅₀ significativement plus élevées que dans les sols qui ont subi des traitements biologiques. Les concentrations en HAP et C₁₀-C₅₀ sont significativement corrélées entre elles ($r = 0.79$, $p = 0.002$). La technique de co-compostage a aussi permis de diminuer fortement la contamination en HAP de $91 \pm 4\%$ et en C₁₀-C₅₀ de $93 \pm 3\%$. Des études ont montré que l'ajout de compost dans des sols contaminés par des HAP contribuait à activer la dégradation de ces composés dans les sols. Ainsi, Hamdi et collaborateurs

(2007) ont enregistré une diminution des concentrations en HAP supérieure à 50 %, au bout de 4 mois, dans des sols contaminés ($3\,000\text{ mg HAP}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ sol sec}$; anthracène, pyrène, benzo(a)pyrène) à la suite d'ajout de différents amendements (compost de boues, pourriture de paille, etc.). Une autre étude a également montré une diminution des concentrations en hydrocarbures pétroliers de 72 % à 79 % et en HAP de 83 % à 87 %, au bout de 48 jours, dans des sols contaminés fortement à la créosote ($8\,000\text{ mg d'hydrocarbures pétroliers et }2\,700\text{ mg HAP}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ sol sec}$), suite à l'ajout de nutriments et/ou de surfactant dans des sols aérés et humidifiés régulièrement (Vinas *et al.*, 2005).

Une diminution des hydrocarbures C_{10} - C_{50} de $89 \pm 3\%$ dans les sols entre le traitement par co-compostage et celui pendant la phytoremédiation a été observée. Cependant, aucune différence significative entre les concentrations en HAP des sols après traitement par co-compostage ou pendant traitement par phytoremédiation n'a été observée. Cette observation s'explique par le fait que les HAP sont des composés plus difficilement dégradables que les C_{10} - C_{50} . La phytoremédiation repose sur une technique d'atténuation naturelle (remédiation passive) dont la vitesse de biodégradation des HAP dépend de l'acclimatation d'une flore de dégradeurs de HAP. Ainsi, au moment de l'échantillonnage de ces sols, le traitement par phytoremédiation était probablement à un stade primaire du processus de dégradation, bien que ces traitements aient montré des résultats prometteurs dans la littérature, dont la diminution de leurs concentrations au bout de plusieurs semaines (Haritash et Kaushik, 2009). La différence non significative entre les concentrations en HAP des sols après traitement par co-compostage et pendant traitement par phytoremédiation pouvait-être parce que les sols ont été échantillonnés en même temps et donc ne proviennent pas tout à fait de la même chaîne successive du traitement d'un sol contaminé unique.

Il n'est pas à tort de constater que les écarts-types sont particulièrement élevés (Figure 6-1) et sont potentiellement explicables par :

- ✓ L'hétérogénéité du sol, qui est augmentée par la présence de calcaire, mais aussi par les amendements lors des traitements;
- ✓ L'hétérogénéité dans la répartition des contaminants dans la matrice hétérogène du sol, en raison de la complexité du mélange et de l'affinité des contaminants en fonction des composantes du sol;

- ✓ Un nombre d'échantillons restreints utilisés pour les analyses.

6.2 Sensibilité de l'activité enzymatique à la contamination et aux traitements biologiques

Les potentiels d'activité enzymatique mesurés dans chaque sol au jour 1 du suivi enzymatique sont présentés à la Figure 6-2 pour les trois enzymes.

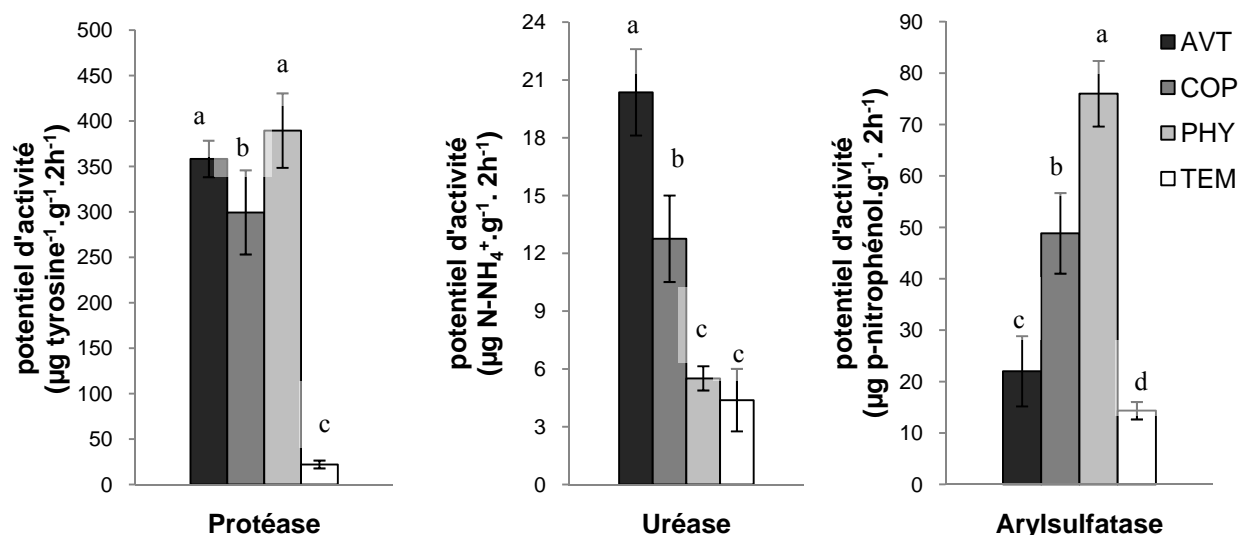


Figure 6-2 : Potentiels d'activité enzymatique ponctuels de la protéase, l'uréase et l'arylsulfatase dans les sols contaminés avant traitement (AVT), après co-compostage (COP), pendant phytoremédiation (PHY) et le sol témoin (TEM); les valeurs non connectées avec la même lettre étant significativement différentes, d'après le test LSD sur les moyennes ($n = 6$; $p < 0,05$)

Les valeurs les plus faibles des potentiels d'activités des trois enzymes ont été mesurées dans le sol témoin. L'activité biologique dans ce sol est sûrement moins favorable, en raison de la texture crayeuse du sol et aux faibles contenus en NTK et COT en comparaison avec les trois autres sols.

6.2.1 Les potentiels d'activité enzymatique dans les sols contaminés et en cours de bioremédiation

Les résultats montrent qu'il n'y a pas vraiment de lien entre la valeur du potentiel de l'activité de la protéase et la contamination et/ou traitements : aucune différence significative entre les

valeurs pour le sol contaminé avant traitement et le sol pendant traitement par phytoremédiation n'a été détectée. La protéase ne permet donc pas de différencier les sols contaminés et/ou en cours de traitement avec un sol non contaminé. Son potentiel d'activité était plus ou moins élevé selon le stade et l'étape de traitement. Même avec d'autres contaminations aux hydrocarbures, le potentiel d'activité de la protéase ne permettait pas de mettre en évidence des différences entre des sols contaminés et ceux non contaminés : il était inhibé, stimulé ou non significativement différent quel que soit la texture du sol (Labud *et al.*, 2007).

Quant au potentiel d'activité de l'uréase, il diminue de manière significative en fonction de l'avancée dans la chaîne des traitements biologiques. Dans la littérature, quelques auteurs rapportent une insensibilité de l'enzyme suite à l'application de traitements (Margesin *et al.*, 2000b; Andreoni *et al.*, 2004). Le potentiel d'activité de l'uréase n'était, en effet, pas significativement influencé par l'ajout de nutriments et/ou fertilisants dans des sols contaminés au diesel (5 000 mg. kg⁻¹ sol sec) (Margesin *et al.*, 2000b) et suite à un traitement biologique en bioréacteurs dans des sols industriels contaminés aux HAP (Andreoni *et al.*, 2004). Une autre étude plus récente a plutôt montré une stimulation de l'uréase avec l'application de traitements biologiques : bien que la présence de gazoline (à teneur de 500 ou 1 000. mg⁻¹ par kg sol sec) ait fortement diminué le potentiel d'activité de l'uréase, l'ajout de compost (de coton écrasé) a provoqué une augmentation de son potentiel dans les sols contaminés supérieure à 80 % (Tejada *et al.*, 2008).

Concernant le potentiel d'activité de l'arylsulfatase, il est significativement augmenté, à chaque stade de traitement. Cette stimulation de l'arylsulfatase due à des traitements biologiques a déjà été observée dans la littérature avec des sols industriels contaminés aux HAP (Andreoni *et al.*, 2004; Tejada *et al.*, 2008). Seulement, cette stimulation peut-être aussi bien causée par la présence d'amendements, comme à la diminution des contaminants ou à la combinaison de ces deux paramètres.

6.2.2 Influence des contaminants en présence sur les potentiels d'activité enzymatique

En considérant les quatre sols dans l'analyse statistique des données, seule l'uréase était conforme à l'analyse de corrélation (normalité et linéarité). Le potentiel d'activité enzymatique

de cette enzyme est positivement corrélé, et de manière significative, avec les concentrations en contaminants ($r = 0.79$, $p < 0.001$ avec les HAP et $r = 0.92$, $p < 0.001$ avec les C_{10} - C_{50}). Pourtant, ce résultat est contredit par la littérature : une étude a montré des relations négatives et significatives ($r = -0.52$, $p < 0.05$) avec des concentrations en HAP dans des sols contaminés à moyen et à long terme (Gianfreda *et al.*, 2005).

Pour étudier principalement les effets des contaminants, des corrélations ont été testées entre les concentrations des trois sols (avant traitement, après traitement par co-compostage et pendant traitement par phytoremédiation) et leurs potentiels d'activités enzymatiques. Ces analyses sont présentées dans le Tableau 6-4.

Tableau 6-4 : Analyse de corrélation entre les potentiels d'activités enzymatiques et les concentrations des sols (avant traitement, après traitement par co-compostage, pendant traitement par phytoremédiation)

	Protéase	Uréase	Arylsulfatase
HAP	$r = 0.19$, $p = 0.44$	$r = 0.74$, $p = 0.001$	$r = -0.86$, $p < 0.001$
C_{10}-C_{50}	$r = -0.15$, $p = 0.54$	$r = 0.94$, $p < 0.001$	$r = -0.93$, $p < 0.001$

L'analyse de corrélation avec la protéase confirme que les valeurs de ces potentiels d'activité ne sont pas liées aux concentrations. Quant aux potentiels d'activité de l'uréase et de l'arylsulfatase, ils sont significativement corrélés avec les concentrations, mais respectivement de manières positive et négative. La stimulation du potentiel d'activité de l'arylsulfatase semble étroitement liée à la diminution des concentrations, alors que l'effet inverse est observé avec l'uréase.

Dans la littérature, le potentiel d'activité de l'uréase était souvent diminué par la présence d'hydrocarbures (Gianfreda *et al.*, 2005; Labud *et al.*, 2007; Pena *et al.*, 2007; Serrano *et al.*, 2009). Étant donné que les propriétés des sols sont modifiées par l'apport de boue contaminée ou d'amendement de copeaux de bois ou de plantes (Section 6.1), ces ajouts pourraient être responsables de l'inhibition de l'uréase. En effet, il est possible que les amendements n'apportent pas suffisamment de nutriments azotés et qu'ils participent à la dilution du contenu en azote dans le sol. Seulement, ce constat contredit les observations faites dans la littérature. Les amendements

de MO dans les sols stimulent, en général, l'activité des enzymes hydrolases (Bandick et Dick, 1999; Tejada *et al.*, 2006) puisqu'ils peuvent apporter de nouvelles enzymes et de nouveaux microorganismes responsables de la production de ces enzymes (Tejada *et al.*, 2006). Pourtant, dans cette étude les valeurs de NTK diminuent au fur et à mesure des traitements et le potentiel d'activité de l'uréase est significativement et positivement corrélé avec le contenu en NTK ($r = 0,86$, $p < 0,001$, en considérant les valeurs dans les quatre sols). Bien que l'uréase soit responsable de la transformation de l'urée en azote ammoniacal (azote inorganique), la diminution du contenu en azote permettrait d'expliquer la diminution du potentiel d'activité dans les sols. Ainsi ces résultats indiquent que le contenu en azote est un facteur limitant pour l'activité enzymatique de l'uréase dans les sols. La protéase, autre enzyme impliquée dans le cycle de l'azote, ne semble pas vraiment affectée par les changements dans la structure du sol.

6.2.3 Conclusion sur l'utilisation des potentiels d'activité enzymatique

Certains auteurs considèrent que les potentiels d'activité enzymatique dans les sols contaminés ont des limites en tant qu'indicateurs de pollution et ne permettent pas suffisamment de mettre en évidence l'impact d'une contamination puisqu'il peut y avoir aussi bien inhibition que stimulation de l'enzyme par la contamination (Dick, 1997; Trasar-Cepeda *et al.*, 2000; Bécaert et Deschênes, 2006). Néanmoins dans cette étude et malgré la présence d'amendements biologiques supplémentaires, seul le potentiel d'activité de l'arylsulfatase semblait présenter un intérêt pour évaluer l'impact des niveaux de contamination et des traitements.

6.3 Effet de l'application d'une perturbation thermique sur le potentiel de l'activité enzymatique mesuré dans les sols

Dans cette section, l'effet de la perturbation thermique ponctuelle (60° C pendant 24 heures), sur les potentiels d'activité enzymatique est présenté et analysé. Le suivi des potentiels d'activité de la protéase, de l'uréase et de l'arylsulfatase des quatre sols a été réalisé sur une période de 12 jours. La perturbation thermique a été appliquée au jour 2 du suivi. La Figure 6-3 présente le suivi du potentiel d'activité de ces trois enzymes dans le temps.

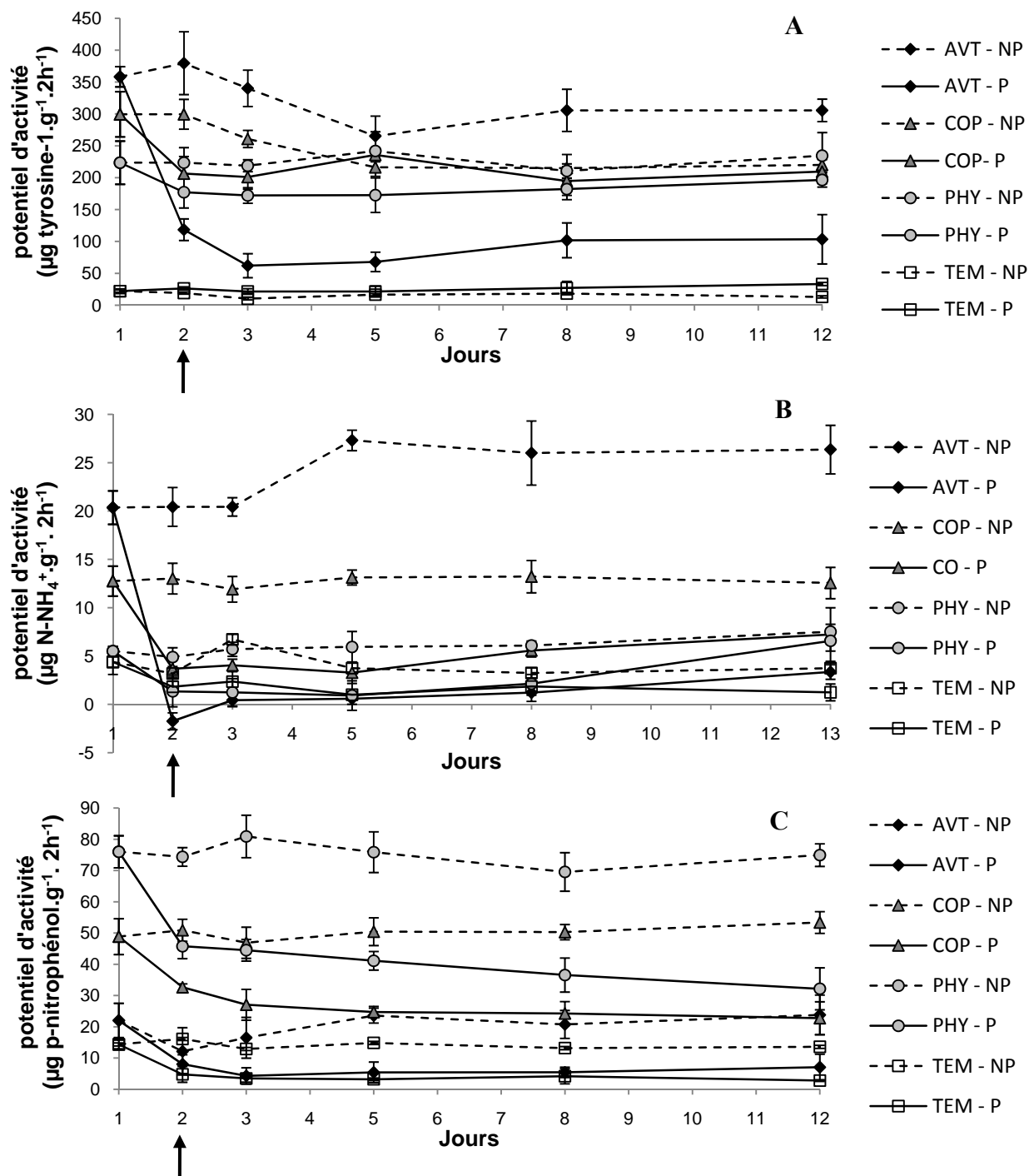


Figure 6-3 : Suivi des potentiels d'activité de la protéase (A), de l'uréase (B) et de l'arylsulfatase (C) dans des sols ayant subi une perturbation thermique (P) représentés par des lignes continues et dans les mêmes sols non perturbés (NP) représentés par des lignes discontinues à différentes étapes de restauration avant traitement (AVT), après co-compostage (COP), pendant phytoremédiation (PHY) et témoin (TEM)

D'après la Figure 6-3, la manière dont les potentiels d'activité répondent suite à la perturbation thermique de 60°C semble dépendre de la nature de l'enzyme et du sol. Concernant la protéase, elle est complètement inhibée dans le sol contaminé avant traitement et aucune récupération n'est observée. Par contre, dans les sols après co-compostage et pendant phytoremédiation, ses potentiels d'activité diminuent après application de la perturbation thermique, mais augmentent ensuite vers leur valeur initiale. Quant au sol témoin, bien que son potentiel d'activité soit très faible, il est possible d'observer une stimulation de l'enzyme, suite à la perturbation thermique. La protéase semble montrer aucune résistance à la perturbation thermique dans ce sol. Dussault et collaborateurs (2008) expliquent ce phénomène par la libération de protéase lors de la lyse de cellules microbiennes induite par la perturbation thermique.

Quant à l'uréase, elle est complètement inhibée par la perturbation thermique (inhibition de 109 ± 6 , 71 ± 10 , 88 ± 22 et 56 ± 16 % respectivement dans les sols avant traitement, après traitement par co-compostage, pendant traitement par phytoremédiation et témoin) et aucune récupération de cette enzyme n'est observée, à l'exception du sol phytoremédié où cette enzyme semble avoir récupéré au bout de 12 jours à sa valeur de potentiel avant perturbation. Tout comme pour l'uréase, l'arylsulfatase est inhibée par la perturbation (inhibition de 61 ± 19 , 35 ± 9 , 39 ± 5 et 73 ± 20 % respectivement dans les sols avant traitement, après traitement par co-compostage, pendant traitement par phytoremédiation et témoin) et ne semble pas récupérer, même après 12 jours. La chaleur semble être responsable de la désactivation de ces deux enzymes. La désactivation de l'uréase par la chaleur est répertoriée dans la littérature : une inhibition suite à une perturbation thermique de 60°C (Bécaert *et al.*, 2006), ou une inhibition et récupération à son état d'origine au bout d'un mois suite à l'application d'un feu dans les sols (Ajwa *et al.*, 1999). Quant à l'arylsulfatase, une récupération suite à une perturbation thermique de 60°C a été observée dans des sols non ou peu contaminés (36 mg 2,4-D par kg sol sec) au bout de quelques jours (Bécaert *et al.*, 2006). Malgré ce constat, la désactivation de l'arylsulfatase a déjà été observée dans la littérature : suite au brûlage de sols (Ajwa *et al.*, 1999). Ainsi, en comparant ces deux enzymes, l'uréase et l'arylsulfatase, l'inhibition mesurée suite à l'application de la perturbation était plus marquée avec l'uréase dans l'ensemble des sols.

Afin de vérifier l'impact de la perturbation thermique sur la volatilisation des hydrocarbures, une analyse de corrélation entre les concentrations mesurées dans les sols perturbés et non

perturbés a été réalisée. Les résultats d'analyse des contaminants organiques HAP et C₁₀-C₅₀ dans les sols au jour suivant la perturbation (jour 2) montrent de fortes corrélations significatives entre les concentrations des sols perturbés et non perturbés ($r = 0.97$, $p < 0.001$ pour les HAP et $r = 0.95$ et $p < 0.001$). La diminution ou augmentation des potentiels d'activité enzymatique, suite à l'application de la perturbation thermique, n'est donc pas due à la volatilisation de ces composés.

Finalement, l'uréase et l'arylsulfatase montrent une faible résistance face à une perturbation thermique et très peu de capacités à récupérer dans l'ensemble des sols. Quant à la protéase, cette enzyme présente un intérêt, en tant qu'indicateur biologique, puisqu'il est possible d'observer visuellement à la fois des résistances et récupérations différentes selon les niveaux de contamination. Ainsi, l'évaluation de la stabilité fonctionnelle d'un sol peut se faire de manière qualitative en observant l'effet de l'application d'une perturbation thermique sur les potentiels d'activités enzymatiques de sols en cours de remédiation. Des trois enzymes testées, c'est la protéase qui est la plus appropriée pour observer des différences visuelles entre les différents niveaux de contamination. Toutefois, cette affirmation n'en demeure pas moins qu'une observation qualitative et une évaluation quantitative et facilement interprétable de ces données sont proposées par l'évaluation de la stabilité enzymatique dans les sols.

6.4 Effet de la contamination et des traitements de bioremédiation sur la mesure de la stabilité enzymatique dans les sols

La stabilité de l'activité enzymatique dans les sols contaminés a été quantifiée avec l'outil de la stabilité fonctionnelle : le RSSIr. Étant donné que les sols contaminés et en cours de restauration étaient de textures différentes de celle du sol témoin, la stabilité de l'activité enzymatique a également été mesurée via un autre outil de mesure de stabilité enzymatique : le RSSI. Les performances dans l'utilisation de ces deux outils ont par la suite été discutées.

6.4.1 La stabilité fonctionnelle des sols mesurée via l'outil RSSIr

Le RSSIr est un indice permettant de mesurer et comparer la stabilité enzymatique dans des sols, selon une même référence (sol non contaminé et non perturbé). Les valeurs obtenues pour les trois enzymes étudiées sont présentées à la Figure 6-4.

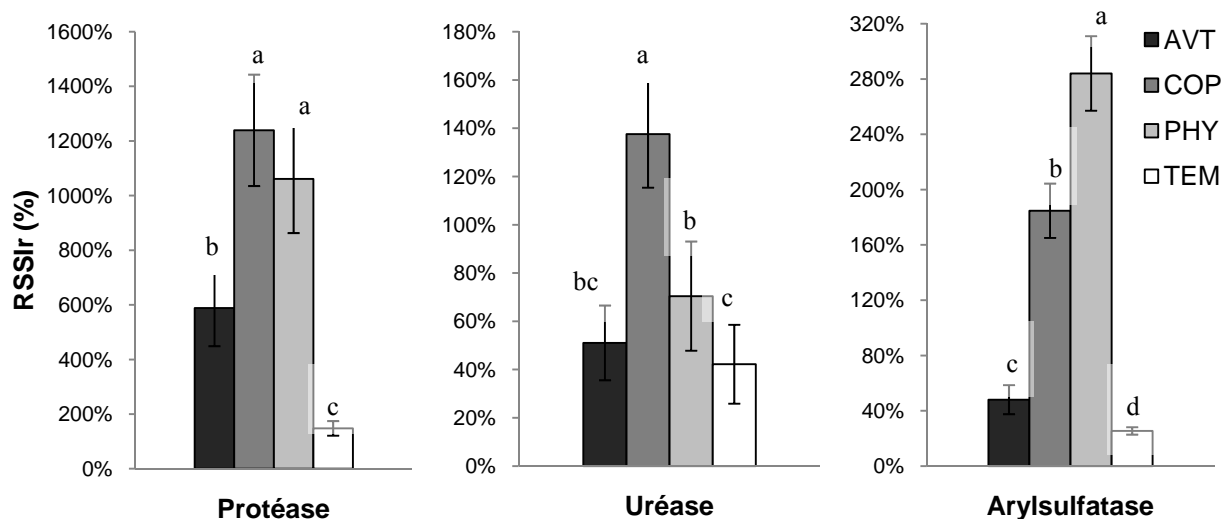


Figure 6-4 : RSSIr obtenus pour la protéase, l'uréase et l'arylsulfatase dans les sols contaminés avant traitement (AVT), après co-compostage (COP), pendant phytoremédiation (PHY) et sol témoin (TEM); les valeurs non connectées avec la même lettre étant significativement différentes, d'après le test LSD sur les moyennes ($n = 6$; $p < 0,05$)

6.4.1.1 Effet de la contamination et des traitements sur le RSSIr calculé avec le potentiel enzymatique de la protéase

Les résultats de la protéase montrent des valeurs de RSSIr supérieures à 100 %; ce qui se traduit par une très bonne stabilité dans l'ensemble des sols. Cependant, au vue de l'évolution des courbes de potentiels d'activité de la protéase (voir Figure 6-3 – A), ces valeurs largement supérieures à 100 % sont dues au faible potentiel d'activité enzymatique mesuré dans le sol de référence (sol témoin), et non pas liées à une bonne résistance et récupération suite à la perturbation. Seul le RSSIr du sol de référence est interprétable de cette manière : ce sol semble avoir une bonne stabilité. En effet, la valeur de RSSIr étant supérieure à 100 %, cela indique, comme le montre la Figure 6-3-A, que ce sol a une bonne résistance et résilience face à une perturbation thermique ponctuelle. En ce qui concerne les trois autres sols, la comparaison de la stabilité de ces sols à différentes étapes de traitement est possible étant donné que la valeur de référence dans le calcul du RSSIr est la même. Ainsi, la valeur de RSSIr du sol avant traitement est significativement plus faible que celles des sols après traitement par co-compostage et pendant traitement par phytoremédiation, ce qui suggère une amélioration de la stabilité de la protéase avec les traitements. Par ailleurs, les valeurs de RSSIr sont significativement corrélées

avec la diminution des concentrations ($r = -0,83$, $p < 0,001$ avec les HAP et $r = -0,65$, $p < 0,001$ avec les C_{10} - C_{50}).

6.4.1.2 Effet de la contamination et des traitements sur le RSSIr calculé avec le potentiel enzymatique de l'uréase.

Les résultats obtenus des valeurs RSSIr de l'uréase sont mitigés. Il y a une nette augmentation de la stabilité de l'uréase dans le sol après le traitement par co-compostage, mais celle-ci diminue dans le sol pendant traitement par phytoremédiation. Pourtant, c'est le seul sol pour lequel une récupération du potentiel enzymatique vers son potentiel avant perturbation est observée; la valeur de RSSIr associée ne reflète donc pas cette récupération. Le RSSIr du sol avant traitement n'est pas significativement différent avec celui du sol témoin. Par ailleurs, aucune corrélation avec les concentrations ne peut être établie.

6.4.1.3 Effet de la contamination et des traitements sur le RSSIr calculé avec le potentiel enzymatique de l'arylsulfatase

Les valeurs de RSSIr obtenues augmentent de manière significative au fur et à mesure des traitements. Les traitements de bioremédiation ont donc un effet positif sur la stabilité enzymatique dans les sols. Les RSSIr sont aussi significativement et fortement corrélés avec les concentrations dans les sols ($r = -0,88$, $p < 0,001$ pour les HAP et $r = -0,98$, $p < 0,001$ pour les C_{10} - C_{50}).

6.4.1.4 Conclusion sur le RSSIr

Sans comparer avec la valeur mesurée dans le sol témoin, les enzymes sensibles aux traitements de bioremédiation dans les sols et ayant montré des effets positifs aux différents traitements biologiques sur la stabilité du sol sont la protéase et l'arylsulfatase.

D'une part, l'outil RSSIr se voit attribuer quelques lacunes. Les valeurs de RSSIr calculées ont, en effet, mises en évidence un problème lié au choix du sol témoin. Par conséquent, l'état de ce sol était difficilement comparable avec celui des autres. Cependant, la comparaison des valeurs RSSIr du sol témoin (équivalentes à des RSSI, le sol perturbé étant le même que celui de la référence) entre les trois enzymes indique que la protéase montre la meilleure stabilité par sa valeur dépassant les 100 %, devant l'uréase et l'arylsulfatase.

D'autre part, la comparaison des trois autres sols entre eux n'en demeure pas moins impossible, étant donné qu'ils sont tous les trois comparés selon une même base (même dénominateur pris en compte dans le calcul du RSSIr). Le traitement par co-compostage apparaît comme le plus performant, en termes de rendement.

6.4.2 La stabilité fonctionnelle des sols mesurée via l'outil RSSI

Suite aux lacunes détectées pour le RSSIr, la stabilité fonctionnelle a aussi été évaluée via l'outil RSSI. Face à un sol témoin problématique, le RSSI a l'avantage d'évaluer la stabilité fonctionnelle au sein d'un même sol.. Le calcul du RSSI s'appuie sur le rapport du sol perturbé sur le sol homologue non perturbé au lieu d'un sol de référence supplémentaire. Les valeurs RSSI obtenues sont présentées à la Figure 6-5.

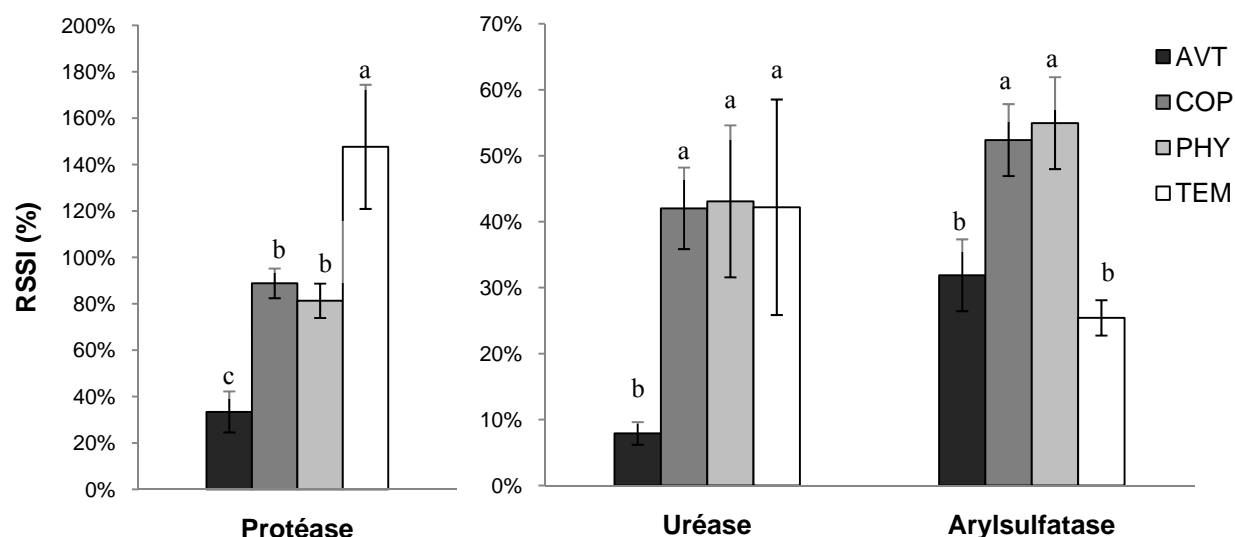


Figure 6-5 : RSSI obtenus pour la protéase, l'uréase et l'arylsulfatase dans les sols contaminés avant traitement (AVT), après co-compostage (COP), pendant phytoremédiation (PHY) et sol témoin (TEM); les valeurs non connectées avec la même lettre étant significativement différentes, d'après le test LSD sur les moyennes ($n = 6$; $p < 0,05$)

Les valeurs RSSI des trois enzymes montrent que celles-ci augmentent significativement après les traitements biologiques. Par conséquent, ces résultats suggèrent que la stabilité fonctionnelle à l'intérieur d'un même sol serait améliorée après le recours à des traitements biologiques. Aucune différence significative n'a été détectée entre les traitements dans le sol après co-compostage et phytoremédiation. La récupération de la stabilité fonctionnelle dans chaque sol se fait

principalement grâce au traitement par co-compostage, traitement pour lequel la diminution des concentrations du sol contaminé a été la plus marquée.

6.4.2.1 Effet de la contamination et des traitements sur le RSSI calculé avec le potentiel enzymatique de la protéase

Au vue des valeurs obtenues, c'est l'enzyme la plus stable. Comme expliqué précédemment (Section 6.4.1.1), cette enzyme a la capacité de résister et récupérer dans le sol témoin et les sols après traitement de co-compostage et pendant traitement par phytoremédiation, et a une capacité de résistance et récupération limitée dans le sol contaminé avant traitement. Les valeurs de RSSI reflètent le phénomène que la stabilité fonctionnelle du sol se voit affectée par la contamination et est améliorée par les traitements de bioremédiation. Dans le sol témoin, correspondant au sol non contaminé), la valeur de RSSI dépasse largement le seuil des 100 %, due au fait que le potentiel de la protéase a été augmenté par la perturbation thermique de 60°C. Des valeurs de RSSI jusque 2,5 fois supérieures à 100 % avaient déjà été enregistrées dans des sols sableux non contaminés avec des proportions en MO et des pH différents (Dussault *et al.*, 2008). Cette stimulation de la protéase n'est pas observée dans les sols contaminés par des hydrocarbures, donc la présence d'hydrocarbures dans le sol interfère avec le fonctionnement de la protéase dans le sol. Par ailleurs, les valeurs de RSSI sont significativement corrélées avec la diminution des concentrations en hydrocarbures ($r = -0,94$, $p < 0,001$ avec les HAP et $r = -0,83$, $p < 0,001$ avec les C₁₀-C₅₀, le sol témoin a été inclus dans l'analyse et l'hypothèse de distribution normale des RSSI (test de Shapiro-Wilk : $p = 0,044$) a été supposée comme vraie ($p > 0,05$)).

6.4.2.2 Effet de la contamination et des traitements sur le RSSI calculé avec le potentiel enzymatique de l'uréase

Les valeurs RSSI obtenues pour cette enzyme montrent une amélioration de la stabilité fonctionnelle dans le sol après traitement par co-compostage. Il n'y a aussi aucune différence significative entre les valeurs des sols ayant subi des traitements biologiques (co-compostage et phytoremédiation) et celui du sol témoin : cela suggère ainsi une récupération parfaite de la stabilité fonctionnelle des sols bioremédiés à son état avant contamination. Les valeurs RSSI sont aussi modérément et négativement corrélées avec les concentrations en contaminants ($r = -0,55$, $p = 0,005$ avec les HAP et $r = -0,74$, $p < 0,001$ avec les C₁₀-C₅₀, le sol témoin ayant été inclus dans l'analyse).

6.4.2.3 Effet de la contamination et des traitements sur le RSSI calculé avec le potentiel enzymatique de l'arylsulfatase

Tout comme remarqué avec les RSSIr, les valeurs RSSI obtenues augmentent de manière significative au fur et à mesure de l'avancée des traitements. Les traitements de bioremédiation ont donc un effet positif sur la stabilité enzymatique dans les sols. Par ailleurs, de fortes corrélations significatives et négatives entre ces valeurs et les concentrations ont été établies ($r = -0,88$, $p < 0,001$ pour les HAP et $r = -0,83$, $p < 0,001$ pour les C_{10} - C_{50}). Le sol témoin, quant à lui, montre une stabilité équivalente à celui du sol contaminé. Ces résultats sont en accord avec les faibles concentrations mesurées en COT et en azote dans le sol témoin indiquant un sol peu fertile.

6.4.2.4 Conclusion sur l'utilisation du RSSI

En mesurant la stabilité enzymatique des sols via l'outil RSSI, les trois enzymes sont sensibles aux traitements de bioremédiation dans les sols et montrent les contributions positives des traitements biologiques. En outre, la protéase est l'enzyme qui fait preuve de la meilleure stabilité.

En ce qui concerne le sol témoin, sa stabilité évaluée par la protéase et l'uréase montre que la mesure de stabilité est soit encore supérieure à celles des sols ayant subi des traitements, soit équivalente. En revanche, la stabilité du témoin évaluée par le biais de l'arylsulfatase est comparable à celle du sol contaminé.

6.4.3 Discussion sur les deux méthodes d'évaluation de la stabilité fonctionnelle

Le RSSIr et le RSSI sont des outils d'évaluation de la stabilité enzymatique d'un sol auquel une perturbation ponctuelle est appliquée. La différence entre ces deux indicateurs réside dans le choix du sol de référence (sol non contaminé, non perturbé pour le RSSIr et sol homologue pour le RSSI) par rapport auquel ils sont évalués; le dénominateur de leur équation étant différent (voir Équation 1-2 et Équation 3-1). Dans l'application du RSSIr, les sols sont comparés selon la même base (même référence); ce qui est loin d'être le cas avec le RSSI.

Les résultats obtenus dans cette étude se valent. En effet, les deux méthodes permettent d'obtenir des résultats similaires dans les comparaisons de leurs valeurs entre sols, à une exception près. Ainsi, la stabilité des sols est largement améliorée à la suite du traitement de co-compostage, et ce pour deux enzymes (protéase et arylsulfatase). Pour l'arylsulfatase, par exemple, les valeurs de RSSI et RSSIr des trois sols contaminés (avant traitement, après traitement par co-compostage et pendant traitement par phytoremédiation) sont hautement corrélées et de manière significative ($r = 0,87$, $p < 0,001$), les deux méthodes présentent donc chacune un certain intérêt.

L'avantage de l'usage du RSSIr est que la stabilité de l'ensemble des sols est mesurée selon une même référence, et par conséquent cela permet la comparaison facile entre sols. L'usage du RSSIr présente des limites lorsque les propriétés physico-chimiques du sol témoin ne correspondent pas à celles des sols contaminés. Les valeurs RSSIr n'entrent alors pas dans la plage prévue entre 0 % à 100 %. Quant à l'usage du RSSI, il permet d'évaluer la stabilité au sein d'un sol, comme le préconise plusieurs auteurs (Kaufman, 1982; Herrick et Wander, 1998; Seybold *et al.*, 1999; Griffiths *et al.*, 2001; Orwin et Wardle, 2004; Tugel *et al.*, 2005; Bécaert *et al.*, 2006; Kuan *et al.*, 2006; Dussault *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010), c'est-à-dire comparer une fonction dans un sol perturbé avec celle du même sol non perturbé. Mais la validité de l'indice, quant à comparer différents sols de texture différente, est limitée. En effet, les valeurs RSSI de sols non contaminés de textures différentes ont montré des résultats différents (l'arylsulfatase: 87 ± 2 % pour le sol sableux, 91 ± 4 % pour un sol organique, 81 ± 3 % pour un loam sableux et 59 ± 2 % pour un loam) (Bécaert *et al.*, 2006). De plus, une autre étude a mis en évidence que l'ajout de MO dans des sols sableux non contaminés peuvent présenter des valeurs différentes de RSSI évaluées avec des enzymes comme la protéase ou la β -glucosidase (Dussault *et al.*, 2008). Ainsi, il est possible de se demander si la comparaison de valeurs RSSI entre elles est justifiée, lorsque la texture des sols est différente.

6.5 Conclusion et recommandations

6.5.1 L'impact de la contamination dans les sols et l'efficacité des traitements biologiques appliqués

En fonction des résultats obtenus et malgré les points critiques, il est tout de même possible de conclure quant à l'efficacité des traitements. Les cycles de l'azote et du soufre sont affectés négativement par la contamination et positivement par les traitements de bioremédiation appliqués. Par conséquent, en associant la stabilité fonctionnelle des sols à leur qualité, celle-ci s'avère être améliorée par les traitements biologiques.

En effet, en comparant les valeurs de RSSI ou RSSIr de plusieurs sols, une bonne stabilité enzymatique dans un sol indique que la contamination a peu d'effets néfastes sur les fonctions enzymatiques du sol, et, par conséquent que la contamination en présence serait moins toxique pour les microorganismes. Afin de vérifier et d'établir des liens des mesures de stabilité enzymatique avec l'effet toxique des contaminants dans les sols, il serait intéressant de procéder sur ces mêmes sols à des études impliquant des bioessais (sur les vers de terre, plantes, ...).

6.5.2 Les possibilités de mesures de stabilité enzymatique

Dans le contexte de cette étude, l'évaluation de la stabilité fonctionnelle à partir des deux méthodes n'a pas réellement montré de différences quant au meilleur choix entre les deux indices. Dans une situation comme celle-ci où le sol témoin était problématique, les deux outils ont tout de même présenté des résultats prometteurs. Aussi, ces deux méthodes peuvent avancer la même affirmation concernant la protéase qui est l'enzyme la plus stable, c'est-à-dire pour laquelle les deux composantes « résistance » et « récupération » sont observées.

Suite aux constatations faites concernant le sol témoin, il serait justifié et judicieux de compléter l'étude en testant à nouveau les performances des deux outils et en utilisant de nouveaux sols témoins spécifiques. Une étude complète évaluerait l'effet de la concentration et l'effet des traitements de manière individuelle et l'effet de la combinaison des deux paramètres (concentrations et traitements). Ceci se justifie par le fait que la contamination peut ne pas être le seul paramètre responsable de la dégradation ou de l'amélioration de la stabilité dans les sols. Kuan et collaborateurs (2006) ont étudié l'effet de différents traitements appliqués à un sol (ajout

de biocide, chaux et azote, re-germination, boues d'effluents) sur la stabilité fonctionnelle dans un sol : les sols amendés étaient moins résistants après une exposition à la chaleur (40°C) pendant 18 heures que le sol non amendé et récupéraient seulement au bout de 28 jours. L'apport d'amendements à un sol peut donc affecter de manière négative sa stabilité fonctionnelle et il est fort possible que ces effets sur la stabilité soient dus au changement dans les propriétés du sol, comme la structure physique des sols, le pH, le COT...(Kuan *et al.*, 2006).

La présente étude n'évalue que l'effet de la combinaison entre la contamination et les traitements. Ainsi, il faudrait que le sol témoin choisi soit également modifié à l'image du sol contaminé et en cours de biorestauration. Les divers amendements étant principalement responsables de la modification de la classe texturale des sols, il faudrait faire subir le même sort au sol témoin que les sols en cours de bioremédiation (ajout de compost et traitement de phytoremédiation dans des conditions similaires à celles des sols contaminés). Finalement, l'effet de la contamination sur la stabilité fonctionnelle s'évaluerait en utilisant le sol contaminé et comme référence le sol témoin ayant subi les mêmes traitements biologiques. Quant à l'effet des traitements, il s'évaluerait en utilisant un sol témoin ayant subi la chaîne de traitements biologiques.

CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce chapitre vise à discuter de l'ensemble des résultats établis aux Chapitres 4, 5 et 6. Ainsi, dans ce chapitre, sont présentées une comparaison des deux objectifs, les forces et les faiblesses des deux outils d'évaluation de la stabilité enzymatique, l'importance dans le choix du sol témoin, et les perspectives de l'outil RSSIr en tant qu'indice écotoxicologique.

7.1 Comparaison et discussion des résultats des deux études

Les deux études comportent des points similaires, mais également quelques différences. La première consiste en une expérience simulée en laboratoire (contamination artificielle des sols), alors que la seconde utilise des sols de terrain historiquement contaminés en stade de bioremédiation. Le Tableau 7-1 résume les contextes et principaux résultats des deux études.

7.1.1 Le contexte des études

La première étude reposait sur un plus large échantillonnage de sols (quinze au total), la seconde sur un choix plus restreint (quatre en tout). Quelques ressemblances dans les niveaux de contamination des sols peuvent être remarquées : les sols fortement contaminés (niveau C₃ et avant traitement) et les sols atteignant le critère C du MDDEP (niveau C₂ et après le premier traitement biologique). Ainsi le choix des concentrations pour la première étude reflète bien un cas concret.

Toutefois, une voie n'a pas été exploitée dans ce mémoire : il s'agit de l'âge de la contamination (récente dans la première étude et âgée dans la seconde). L'âge de la contamination est pourtant un facteur important dans le cadre d'une contamination aux HAP : séquestration dans le sol, dégradation naturelle, baisse de la biodisponibilité des contaminants... (Alexander, 2000; Wilcke, 2000). Le paramètre de vieillissement dans les sols pourrait avoir un impact sur les résultats obtenus. L'âge de la contamination serait une voie à exploiter dans de futurs travaux. Outre ces phénomènes, dans les sols contaminés artificiellement aux HAP, après deux semaines de vieillissement, la flore microbienne semblait déjà adaptée à la contamination dans le sol : l'activité enzymatique y était, en effet, stable.

Tableau 7-1 : Comparaison du contexte des deux études réalisées et récapitulatif des résultats importants

Objectif	CONTEXTE DES ÉTUDES			PRINCIPAUX RÉSULTATS			
	Sols	Particularités	Similarités	Potentiels d'activités enzymatiques	Effet de la chaleur sur les enzymes	RSSIr	Enzyme intéressante
1^{ER} OBJECTIF CHAPITRES 4 ET 5	<u>15 sols</u> : 3 textures (loam argilo-sableux, argile, loam sableux); 5 niveaux de contamination (C ₀ , C ₁ , C ₂ , C ₃ et C ₄)	Contamination artificielle de créosote	<u>Différences non significatives* détectées entre les concentrations expérimentales :</u> 1) des sols C ₃ (objectif 1) et du sol contaminé avant traitement (objectif 2) pour les HAP et C ₁₀ -C ₅₀ ;	<u>Sensibilité aux niveaux de contamination :</u> Uréase	- Stimulation du potentiel de la protéase dans les sols peu et non contaminés	<u>Outil sensible aux niveaux de contamination :</u> Protéase Uréase	Protéase, enzyme montrant la meilleure stabilité dans les sols peu ou non contaminés
2^D OBJECTIF CHAPITRE 6	<u>4 sols de terrain</u> : contaminé; après co-compostage, pendant phytoremédiation et témoin	Contamination âgée, majoritairement des HAP Bioremédiation Sols de texture différente	2) des sols C ₂ (objectif 1) et du sol après co-compostage (objectif 2) pour les C ₁₀ -C ₅₀ ; 3) des sols C ₀ (objectif 1) et témoin (objectif 2) pour les HAP.	<u>Sensibilité aux niveaux de contamination :</u> Arylsulfatase	- Inhibition et désactivation de l'uréase et de l'arylsulfatase	<u>Outil sensible aux niveaux de contamination :</u> Protéase Arylsulfatase	(à une exception près pas de visualisation de la composante récupération par le biais de l'arylsulfatase ou de l'uréase)

* Test LSD sur les moyennes (p < 0.05)

7.1.2 Les principaux résultats

7.1.2.1 Les potentiels d'activités enzymatiques face à la contamination aux HAP

Dans chaque étude, le potentiel d'activité d'une enzyme s'est démarqué et a montré la possibilité de mettre en évidence l'impact des niveaux de contaminations aux HAP. Seulement, les enzymes dont les potentiels d'activité ont montré le plus de sensibilité n'étaient pas les mêmes dans les deux études : uréase (1^{er} objectif) et arylsulfatase (2^d objectif). Quant à la protéase, son potentiel d'activité n'était en général pas significativement différent entre les sols de même texture et les niveaux de contamination. Ainsi, ces résultats reflètent les limites confirmées par certains auteurs dans l'utilisation d'une seule mesure de potentiel enzymatique pour comparer des contaminations, l'enzyme pouvant être soit inhibée, soit activée suite à la contamination (Dick, 1997; Trasar-Cepeda *et al.*, 2000; Bécaert *et al.*, 2006; Dussault *et al.*, 2008). Les valeurs des potentiels d'activité des enzymes ne sont pas facilement exploitables, également parce que dans un sol naturel la valeur du potentiel est modifiée selon la composition physico-chimique du sol (Acosta-Martínez *et al.*, 2007). Ce point critique est par ailleurs commun dans l'utilisation des propriétés des sols : il manque des valeurs de référence pour permettre une interprétation (Gil-Sotres *et al.*, 2005). D'un type de sol à l'autre, les valeurs de référence risquent d'être différentes.

7.1.2.2 La stabilité des fonctions enzymatiques suite à la perturbation thermique

Suite à l'application de la perturbation thermique, le potentiel d'activité de la protéase s'est démarqué en démontrant une meilleure stabilité (résistance et récupération), autant d'un point de vue qualitatif que d'un point de vue quantitatif dans les sols peu ou faiblement contaminés à un mélange complexe d'hydrocarbures et également dans les sols ayant subi des traitements biologiques. La protéase est pourtant une enzyme peu utilisée dans la littérature. En ce qui concerne les deux autres enzymes (uréase et arylsulfatase), elles sont potentiellement utilisables en tant qu'indicateurs.

7.1.2.3 Les cycles biogéochimiques affectés par la contamination aux HAP

Les deux études ont montré que les mélanges complexes d'hydrocarbures dans les sols affectent de manière négative les cycles de l'azote et du soufre. Dans le cadre du cycle de l'azote,

d'autres études de la littérature, autres que celles relatives aux potentiels d'activités enzymatique ont suggéré que son cycle biogéochimique serait affecté par la présence d'hydrocarbures, en raison de l'inhibition de processus de nitrification mesurée dans des sols contaminés aux hydrocarbures, tels que diesel, HAP et hétérocycles (Deni et Penninckx, 1999; Sverdrup *et al.*, 2002), de processus de minéralisation de l'azote mesuré dans des sols contaminés par des hydrocarbures pétroliers (Lindstrom *et al.*, 1999). Quant à l'arylsulfatase, une étude récente a montré son inhibition par des contaminations aux HAP dans les sols (Gianfreda *et al.*, 2005).

7.1.3 Les interférences rencontrées lors des mesures enzymatiques

En prenant en compte l'écart-type et pas uniquement les valeurs moyennes, des valeurs de RSSI et RSSIr négatives sont observées avec la protéase dans les sols argileux C₃ et C₄ et avec l'uréase dans le loam sableux et l'argile C₃ et C₄. Dans ces sols, des potentiels d'activités enzymatiques mesurés affichent des valeurs négatives (les échantillons contrôles contiennent des quantités plus élevées de produit issu de la réaction enzymatique), et par conséquent, le calcul produit des valeurs négatives de RSSI ou RSSIr. Ces valeurs négatives ont également été mesurées dans les sols ayant subi la perturbation thermique (chaleur de 60 °C pendant 24 h) et présentant des niveaux élevés de contamination (C₃ et C₄).

Pour la mesure du potentiel d'activité de la protéase, les interférences peuvent s'expliquer selon les deux hypothèses suivantes :

- Soit au niveau de la réaction d'hydrolyse de la caséine lors de l'incubation :

La perturbation appliquée à ces sols de niveaux élevés de contamination (C₃ et C₄) a vraisemblablement un effet non négligeable sur les HAP présents dans le sol, de telle sorte que ceux-ci provoquent une interférence avec la tyrosine (produit de la réaction d'hydrolyse de la protéase). La tyrosine, acide aminé aromatique, possède un point commun important avec les HAP : au moins un noyau aromatique. Une fois produite, dans les sols perturbés, la tyrosine s'adsorbe éventuellement, comme les HAP sur les particules argileuses, ou réagit avec les composés HAP. Cette adsorption empêcherait alors la tyrosine d'être quantifiée.

- Soit au niveau des échantillons-contrôles :

Après l'incubation, l'acide trichloracétique (TCA) ajouté pour arrêter la réaction d'hydrolyse oxyde le substrat qui est également ajouté dans les contrôles. Cette oxydation de la caséine peut

créer une interférence, biaiser la lecture d'absorbance dans les échantillons-contrôles et par conséquent la mesure du potentiel d'activité de la protéase. Cette interférence mesurée est potentiellement renforcée avec la présence de HAP dans les sols avec des propriétés caractéristiques de sols argileux et affectés par la perturbation thermique.

Les valeurs de potentiels d'activités de l'uréase sont plutôt faibles. L'uréase est une enzyme inhibée par la contamination en HAP et en particulier avec la présence de niveaux de contamination élevés. A la suite de la perturbation, l'inhibition de cette enzyme est renforcée. Toutefois, bien que les valeurs des potentiels d'activité de l'uréase dans les sols perturbés C₃ et C₄ soient négatives, celles-ci sont faibles et pourraient donc s'apparenter à des valeurs proches du seuil « zéro » (absence d'activité enzymatique).

7.2 Forces et faiblesses des outils de mesure de stabilité enzymatique (RSSI versus RSSIr) en tant qu'indices de qualité

Bien que l'outil de mesure de la stabilité fonctionnelle, le RSSI ait été testé et validé sur des contaminations organique (2,4-D) (Bécaert *et al.*, 2006) et inorganique (Cu) (Dussault *et al.*, 2008) en faibles concentrations, les travaux présentés dans ce manuscrit proposent une amélioration de l'outil afin de pallier certains phénomènes, comme l'intégration dans l'indice de stabilité fonctionnelle des éventuelles inhibitions ou stimulations des enzymes par la présence de contaminants : le RSSIr. La différence entre les outils RSSI et RSSIr réside essentiellement dans le choix de la référence.

7.2.1 Deux indices de stabilité enzymatique : le RSSIr versus le RSSI

Dans le Chapitre 6, le sol de référence utilisé (sol témoin) a été critiqué. Malgré le fait que le cas à l'étude peut-être isolé et ne pas représenter l'ensemble des cas, l'utilisation du RSSI dans ce cas d'étude a montré des résultats encourageants. Les forces et faiblesses dans l'utilisation de ces deux indices ont été analysées dans le Tableau 7-2, où les deux études ont été présentées de manière individuelle, étant donné que les amendements dus à la bioremédiation peuvent influencer sur les résultats.

Tableau 7-2 : Forces et faiblesses des outils mesurant la stabilité fonctionnelle enzymatique; les signes « + » représentant la force de l'indice; les signes « - » une faiblesse

Outil de stabilité fonctionnelle* Objectif (Chapitre correspondant)	RSSI		RSSIr	
	1	2	1	2
	(5)	(6)	(5)	(6)
Considération de la composante « résistance »	+	+	+	+
Considération de la composante « résilience »	+	+	+	+
Considération de l'éventuelle inhibition ou stimulation du potentiel enzymatique due à la contamination	-	-	+	+
Sensibilité aux niveaux (faibles versus élevés) de contaminations aux HAP	-	+	+	+
Indépendance de l'outil au type de sol	-	-	-	-
Valeur interprétable facilement (sans nécessité de comparaison avec d'autres sols)	-	+	+	-
Classement sur une échelle de valeurs (par exemple, de 0 → 100%**)	+	+	+	-

* Un signe « + » a été attribué, lorsque l'outil répondait au critère énoncé et inversement un signe « - ».

** Une valeur proche de 0% indique une mauvaise stabilité du sol et donc un effet des contaminants sur les microorganismes; alors qu'une valeur proche de 100% indique une bonne stabilité des microorganismes dans le sol.

7.2.1.1 Deux outils de mesure de stabilité enzymatique

Le RSSIr a été élaboré de sorte qu'il quantifie également l'éventuelle inhibition ou stimulation du potentiel d'activité enzymatique due à la contamination. Cela évite en effet, par exemple, d'obtenir des scores proches de 100 %, dans des situations particulières. Par contre, l'évaluation de la qualité des sols via le RSSI compare le sol perturbé et celui non perturbé et se rapproche ainsi de la définition du concept de stabilité fonctionnelle recommandé par plusieurs auteurs dans la littérature (Orwin et Wardle, 2004; Griffiths *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010). Le RSSIr permet en quelque sortes de pallier les problèmes du manque de valeurs de références et de garantir des résultats interprétables.

7.2.1.2 Sensibilité des outils de la stabilité enzymatique à la contamination aux HAP

Le RSSI a déjà montré son aptitude à différencier des sols contaminés par des niveaux de contamination faibles (Bécaert *et al.*, 2006; Dussault *et al.*, 2008). Par contre, il n'est pas validé dans le cadre de contaminations complexes et fortes. Dans le cadre d'une restauration de sols contaminés, l'important est de mettre en évidence l'impact d'une contamination sur la qualité des niveaux faibles et élevés, et de vérifier également que la qualité du sol, après restauration retrouve celle d'origine. Pour de futurs travaux, les recommandations effectuées au Chapitre 6 devraient être exploitées.

7.2.1.3 Des indices à valeurs uniques

Un des points négatifs de ces deux outils est que les valeurs de RSSI ou RSSIr obtenues sont différentes d'un sol à l'autre : la valeur de mesure de stabilité obtenue n'est en effet pas unique. Cela a été constaté dans les deux études de ce projet mais aussi dans la littérature (Bécaert *et al.*, 2006; Dussault *et al.*, 2008). Une autre étude a montré que les valeurs de composantes résistance et résilience calculées individuellement à partir du suivi dans le temps de la décomposition d'orges et suite à l'application d'une perturbation thermique de 40°C variaient significativement entre un sol sableux et un loam argileux et suggérait ainsi que la résistance et la résilience dépendaient essentiellement de la structure physico-chimique du sol (Griffiths *et al.*, 2008); celle-ci étant également responsable de la détermination de la composition de la communauté microbienne. Ainsi pour vérifier que la présence de contaminants dans le sol affecte la qualité du sol, il est nécessaire de comparer ce sol avec la valeur de référence qui exprime la mesure de la qualité du sol homologue non contaminé.

7.2.1.4 Interprétation des valeurs

En ce qui concerne les valeurs rendues par le RSSI ou RSSIr, des valeurs proches de 100 % auraient tendance à indiquer que la fonction enzymatique du sol est stable et donc de qualité, alors que des valeurs proches de 0 % indiqueraient que la fonction enzymatique du sol possède une mauvaise stabilité et donc que la qualité du sol est diminuée. Le fait de pouvoir classer ces sols selon une échelle a un côté pratique. Cependant, ce n'est pas toujours possible dans toutes les situations, par exemple, lorsqu'une enzyme, comme l'uréase ou l'arylsulfatase, est désactivée partiellement ou totalement par la chaleur, et ce, même dans le sol non contaminé (voir Chapitres 4 et 6) ou lorsque le sol de référence (ou témoin) n'est pas adapté à la situation (voir Chapitre 6). Dans ces cas-ci, il est conseillé de comparer les valeurs de RSSI ou RSSIr entre elles et de ne pas prêter attention aux valeurs obtenues.

7.2.2 Le RSSIr est-il un bon indice de qualité?

Le RSSIr répond à certains critères énoncés par Doran et Zeiss (2000) pour définir un bon indice ou indicateur de qualité. Le Tableau 7-3 justifie chacun de ces critères.

Tableau 7-3 : Réponse aux critères d'un bon indice de qualité énoncés par Doran et Zeiss (2000)

Critère	Applicable au RSSIr	Commentaires
1. Sensible aux changements	Oui	Il est sensible à la présence de contaminants en faibles ou fortes quantités, mais aussi aux amendements apportés pour les traitements biologiques.
2. Impliqué dans les processus des écosystèmes	Oui	Les enzymes hydrolases sont produites et libérées principalement par les microorganismes, mais aussi par les plantes et les animaux.
3. Interprétable et utile pour les utilisateurs	Oui	Le RSSIr est, parfois, interprétable sur une échelle de valeurs entre 0 et 100%, et permet alors une comparaison facile de la qualité de différents sols.
4. Facile et peu coûteux à mesurer	Oui	Aucune préparation particulière n'est requise ou demandée, à l'exception de l'ajustement de l'humidité du sol quelques jours avant le début du suivi. Par ailleurs, le coût du suivi des potentiels enzymatiques est moindre par rapport à ceux engendrés lors des tests standardisés concernant le taux de survie des vers de terre ou de la germination de graines ou croissance de plantes.
5. Corrélé avec les fonctions du sol	Non	L'indice RSSIr se base sur les fonctions enzymatiques du sol, mais il n'est pas corrélé avec le potentiel enzymatique. Plus d'investigations doivent cependant, être effectuées pour conclure sur sa corrélation avec d'autres fonctions du sol.

Seul un critère de la liste n'est pas respecté. Toutefois, l'outil semble être prometteur en tant qu'indice permettant la mise en évidence d'un impact du à la contamination

7.3 Importance dans le choix du sol de référence : le sol témoin

Dans le Chapitre 6, le sol de référence utilisé dans le calcul du RSSIr a été critiqué. Il a été vu dans le Chapitre 5, que la texture du sol avait un impact sur les valeurs de l'indice RSSIr calculées. Ainsi une grande attention au sol de référence doit être accordée,

Le sol de référence doit de préférence être le sol homologue, mais non contaminé, comme ce qui a été fait dans l'étude présentée au Chapitre 5. Le fait de ramener le calcul de la stabilité dans les sols selon une même base permet de comparer plus facilement les sols de niveaux de contamination différents entre eux et aussi d'évaluer l'effet de la contamination sur la stabilité fonctionnelle du sol. Par ailleurs, les sols dont les valeurs RSSIr associées étaient assimilables ou supérieures à celle du sol de référence pouvaient être qualifiés par une stabilité fonctionnelle supérieure ou semblable à celle du sol non contaminé et donc définis de bonne qualité. Alors que

les sols dont les valeurs de RSSIr étaient significativement inférieures à celles du sol de référence faisaient preuve d'une stabilité fonctionnelle diminuée par la contamination, et donc leurs qualités étaient considérées affectées par la toxicité des contaminants dans le sol.

Dans le cadre d'une bioremédiation, l'utilisation du sol témoin peut s'avérer problématique. Comme constaté au Chapitre 6, l'apport d'amendements modifie la texture du sol. Ainsi, le sol témoin (non contaminé, n'ayant subi aucun traitement) peut ne pas avoir exactement les mêmes propriétés que le sol en cours de traitement et peut alors avoir une influence sur les résultats, qui ne sont pas uniquement dus à la contamination. Ainsi de sorte à quantifier uniquement l'effet de la contamination dans un sol en cours de restauration, il faudrait utiliser comme sol de référence le sol non contaminé mais à qui les mêmes traitements ont été appliqués. Pour vérifier que les traitements biologiques n'ont pas d'effet néfaste sur la qualité des sols, il faudrait également mesurer la stabilité fonctionnelle dans le sol non contaminé et en cours de bioremédiation en utilisant cette fois-ci le sol non contaminé (sol témoin), comme référence. Finalement, la comparaison des sols contaminés en cours de bioremédiation avec le sol témoin non contaminé et n'ayant reçu aucun traitement revient à évaluer l'effet de l'interaction contamination-traitement biologique sur le sol.

7.4 Les perspectives de l'outil RSSIr en tant qu'outil écotoxicologique

Les outils de stabilité enzymatique tels le RSSIr ont été conçus dans le but de développer un outil écotoxicologique pour les microorganismes, sur le modèle de courbes dose-réponse déjà établies pour d'autres niveaux trophiques (vers de terre, plantes), par exemple, le suivi de l'inhibition de la croissance des vers de terre ou de la germination des plantes. Dans le cadre de l'établissement de courbes dose-réponse, l'inhibition de la stabilité enzymatique par rapport au sol non contaminé a été calculée. Les courbes dose-réponse obtenues à partir des RSSIr établis avec la protéase et le calcul associé à l'inhibition de la stabilité sont présentées à l'Annexe 4. Elles suggèrent que le RSSIr peut être converti de sorte à calculer l'effet de la concentration en contaminants dans le sol sur l'inhibition de la stabilité enzymatique. Une courbe dose-réponse se délimite en général par deux seuils : un correspondant au plateau pour lequel il n'y a presque pas d'inhibition (correspondant à des niveaux de contaminations faibles par exemple) et un autre

atteint lorsque l'inhibition la plus élevée stagne et n'augmente plus (l'effet d'inhibition maximal est atteint à partir d'un certain niveau de concentration).

Selon les courbes établies en Annexe, l'inhibition maximale de la stabilité semble atteinte pour deux sols : le sol argileux et le loam sableux. Cependant, ces résultats sont à nuancer puisqu'ils manqueraient des points sur les courbes pour confirmer ces propos. Outre cela, les résultats suggèrent que les contaminants de la créosote ont supposément un effet plus toxique sur la stabilité du potentiel de la protéase dans le sol argileux que dans les loams argilo-sableux et sableux. Pourtant, en comparaison avec des bioessais classiques (germination de graine de plantes, par exemple), un sol sableux contaminé par des hydrocarbures montre une phytotoxicité plus élevée que dans un sol argileux (Labud *et al.*, 2007). En effet, les hydrocarbures étant faiblement adsorbés sur les colloïdes dans le sol sableux, ils opèrent une action plus toxique sur les écosystèmes de par leur plus forte biodisponibilité. Quant aux résultats obtenus par la mesure de l'inhibition de la stabilité de la protéase, ils pourraient s'expliquer par le fait que dans le sol avec le contenu en argile le plus élevé, les HAP sont plus facilement adsorbés sur les particules d'argile (Ortega-Calvo *et al.*, 1997) et immobilisent alors les enzymes, telles les protéases, adsorbées également sur ces mêmes particules. L'inhibition forte de la protéase dans le sol le plus argileux pourrait être due en partie à la probable séquestration des enzymes dans le sol. Ces résultats reflèteraient malgré tout la problématique de séquestration des contaminants dans le sol, considérée comme un obstacle pour la remédiation des sols.

L'évaluation de l'inhibition de la stabilité via l'outil RSSIr, représente, finalement une indication de l'effet écotoxique des contaminants sur les microorganismes. Avec un test traditionnel n'ayant recours qu'à une seule espèce (ver de terre, plante, etc.), le type de sol peut ne pas être adapté pour l'espèce choisie. À l'inverse la communauté microbienne présente l'avantage de faire partie intégrante du sol et voit son activité régir le fonctionnement du sol (Winding *et al.*, 2005). Elle apparaît ainsi comme un écosystème incontournable dans la définition d'un outil écotoxique. Les contaminants n'ayant pas tous les mêmes effets dans les sols (Bécaert et Deschênes, 2006), via le RSSIr l'effet des contaminants est testé sur une fonction accomplie par la communauté microbienne déjà active dans le sol. Toutefois, que l'outil de la stabilité enzymatique renvoie des résultats sous la forme de valeurs RSSIr ou de valeurs d'inhibition de RSSIr, il apparaît comme un outil écotoxicologique permettant de classer les effets de différents niveaux de contamination dans un même sol.

CONCLUSION

Cette section présente un résumé des principales contributions résultant de ce projet et des recommandations et perspectives pour la suite de la recherche dans le domaine.

1. Contributions du projet

Ce projet de recherche repose sur deux objectifs spécifiques : 1) tester l'outil de mesure de la stabilité enzymatique pour évaluer la qualité de sols contaminés par un mélange complexe de composés organiques et à différents niveaux et 2) vérifier l'applicabilité de l'outil pour évaluer la qualité de sols en cours de bioremédiation. Les résultats pour ces deux objectifs ont été établis dans le cadre d'une application de l'outil sur des sols contaminés par un mélange complexe d'hydrocarbures et les principaux sont listés ci-dessous.

- ❖ L'impact d'une contamination complexe en HAP dans des sols peut être évalué en mesurant la stabilité fonctionnelle. Les résultats ont permis de montrer que la stabilité fonctionnelle dans les sols peu ou non contaminés est meilleure que dans les sols fortement contaminés, où elle est affectée de manière négative.
- ❖ Le RSSIr est un indice pouvant être utilisé pour évaluer la qualité de sols contaminés et l'effet toxique des contaminants sur les fonctions du sol, et plus précisément la stabilité fonctionnelle des potentiels d'activités enzymatiques.
- ❖ Le RSSIr apporte une information plus complète qu'une simple mesure de potentiel enzymatique qui dans certains cas est inhérent au sol et à la présence de contaminants. Il repose sur la capacité et la dynamique de la fonction enzymatique à résister et à récupérer face à un changement dans son environnement, tout comme le RSSI élaboré par Bécaert (2004).
- ❖ Dans le cadre d'une bioremédiation, l'indice RSSIr a permis de montrer l'amélioration de la qualité du sol grâce aux traitements biologiques et/ou à la diminution des concentrations en contaminants dans les sols.
- ❖ L'étude a su démontrer l'importance accordée quant au choix du sol de référence pour le calcul de l'indice RSSIr.
- ❖ La méthode de mesure de la stabilité enzymatique s'applique à différents types de sols. Cependant les valeurs ne sont pas uniques. Outre la présence de contaminants, la

composition du sol a aussi un effet sur les valeurs d'indice obtenues. Il est donc recommandé de comparer la qualité de sols contaminés avec ceux ayant des propriétés physico-chimiques similaires.

- ❖ Pour la distinction des niveaux de contamination faibles et élevés, le projet permet en partie de valider les objectifs de restauration imposés par le gouvernement pour les contaminations aux HAP. Les valeurs de RSSIr obtenues pour les sols contaminés selon le critère B étaient soit non significativement différentes à celles du sol non contaminé, soit supérieures. En ce qui concerne les sols contaminés selon le critère C, les valeurs de RSSIr étaient soit non significativement différentes avec celles du sol non contaminé (cas du loam argilo-sableux), soit significativement inférieures aux valeurs de RSSIr obtenues avec le sol non contaminé et supérieures aux valeurs de RSSIr obtenues avec des sols plus fortement contaminés.
- ❖ L'évaluation de la stabilité fonctionnelle dans les sols a également permis de cibler la fonction du sol atteinte par une contamination complexe aux hydrocarbures. En effet, le cycle de l'azote est fortement affecté par la créosote. La stabilité fonctionnelle de la protéase et l'uréase diminuait avec l'augmentation des niveaux de concentrations en présence. Quant au cycle du soufre, celui-ci est dans certains cas affecté aussi par cette même contamination : la stabilité du potentiel de l'arylsulfatase est améliorée au cours de l'application de traitements biologiques (du moins pour le cas étudié).

2. Recommandations pour la suite des travaux

Suite à ce projet, des recommandations peuvent être proposées quant à l'utilisation de l'outil RSSIr et au développement de la méthodologie du développement d'un indice de stabilité du sol:

- ❖ Tester plus de concentrations, en vue d'établir des courbes dose-réponse (concentrations en contaminants versus inhibition de la stabilité) plus complètes et précises;
- ❖ Tester plusieurs types de sols, afin d'investiguer le rôle de la composition des sols, en particulier le contenu en argile et le COT (paramètres qui semblent importants dans le cadre de cette contamination) sur la variation de l'outil, dans le but, par exemple, d'établir un indice unique ou un modèle mathématique;
- ❖ Tester la variation de l'indice en considérant le paramètre de l'âge de la contamination;

- ❖ Tester l'outil RSSIr avec un sol de référence unique, comme c'est le cas dans la réalisation des essais écotoxicologiques (croissance de l'orge, par exemple).
- ❖ Tester l'indice RSSIr avec d'autres types de contaminations complexes (incluant des composés organiques et/ou inorganiques).

3. Perspectives dans les champs d'application de l'indice

L'indice RSSIr peut avoir plusieurs domaines d'applications :

- ❖ En analyse de risque, l'outil d'évaluation de la qualité de sols et de la toxicité des contaminants dans le sol par le biais des microorganismes, permettant d'étudier le facteur de risque sur un terrain contaminé;
- ❖ En restauration de sols, le RSSIr servirait d'outil d'aide à la décision, afin de déterminer le seuil de détoxification de contaminants persistants dans les sols;
- ❖ En écotoxicologie, le RSSIr permettrait de compléter les bases de données déjà existantes avec l'apparition d'un nouveau niveau trophique, celui des microorganismes dans les sols;
- ❖ En analyse du cycle de vie, l'utilisation de l'indice comme facteur d'effet dans le calcul des facteurs de caractérisation pour la catégorie d'écotoxicité terrestre.

BIBLIOGRAPHIE

- ACOSTA-MARTÍNEZ, V., CRUZ, L., SOTOMAYOR-RAMÍREZ, D. et PÉREZ-ALEGRÍA, L. (2007). Enzyme activities as affected by soil properties and land use in a tropical watershed. Applied Soil Ecology 35(1) p.35-45.
- AISLABIE, J., MCLEOD, M. et FRASER, R. (1998). Potential for biodegradation of hydrocarbons in soil from the Ross Dependency, Antarctica. Applied Microbiology and Biotechnology 49(2) p.210-214.
- AJWA, H.A., DELL, C.J. et RICE, C.W. (1999). Changes in enzyme activities and microbial biomass of tallgrass prairie soil as related to burning and nitrogen fertilization. Soil Biology and Biochemistry 31(5) p.769-777.
- ALEXANDER, M. (2000). Aging, Bioavailability, and Overestimation of Risk from Environmental Pollutants. Environmental Science & Technology 34(20) p.4259-4265.
- ANDREONI, V., CAVALCA, L., RAO, M.A., NOCERINO, G., BERNASCONI, S., DELL'AMICO, E., COLOMBO, M. et GIANFREDI, L. (2004). Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. Chemosphere 57(5) p.401-412.
- ANDREWS, S.S., KARLEN, D.L. et MITCHELL, J.P. (2002). A comparison of soil quality indexing methods for vegetable production systems in Northern California. Agriculture, Ecosystems & Environment 90(1) p.25-45.
- ASTM (1995). Standard test method for pH of soils D4972-95a. Annual Book of ASTM Standards. West Conshohocken, PA. 04.08: p. 10-16.
- ASTM (1996). Standard Test Method for Volume Weights, Water-Holding Capacity, and Air Capacity of Water-Saturated Peat Materials D2980-71 Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia, PA. 04.08: p. 332-333.
- ASTM (1997a). Standard Test Methods for amount of material in soil finer than No.200 (75µm) sieve D 1140-92 Annual Book of ASTM Standards, Section 4. Philadelphia, PA. 04.08: p. 102-105.
- ASTM (1997b). Standard Test Methods for particle size-analysis of soils. D 422-63 . Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia, PA. 04.08: p. 10-17.
- ASTM (1998). Test method for organic matter content D2974. Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia, PA. 04.08: p. 117-127.
- BANDICK, A.K. et DICK, R.P. (1999). Field management effects on soil enzyme activities. Soil Biology and Biochemistry 31(11) p.1471-1479.
- BASTIDA, F., ZSOLNAY, A., HERNÁNDEZ, T. et GARCÍA, C. (2008). Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. Geoderma 147(3-4) p.159-171.
- BÉCAERT, V. (2004). Évaluation de la stabilité fonctionnelle d'un sol dans un contexte d'étude de la santé du sol. Département de Génie Chimique. Montreal, Canada, Ecole Polytechnique de Montréal. Thèse de doctorat, 212 p. [en ligne]. Disponible: <http://proquest.umi.com/pqdlink?Ver=1&Exp=05-16-2015&FMT=7&DID=932396671&RQT=309&attempt=1&cfc=1>

- BÉCAERT, V. et DESCHÊNES, L. (2006). Using Soil Health to Assess Ecotoxicological Impacts of Pollutants on Soil Microflora. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology p.127-148.
- BÉCAERT, V., SAMSON, R. et DESCHENES, L. (2006). Effect of 2,4-D contamination on soil functional stability evaluated using the relative soil stability index (RSSI). Chemosphere 64(10) p.1713-1721.
- BENTO, F.M., CAMARGO, F.A.O., OKEKE, B.C. et FRANKENBERGER, W.T. (2005). Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. Bioresource Technology 96(9) p.1049-1055.
- BLUM, W.E.H. (1997). Basic concepts: Degradation, resilience and rehabilitation. Methods for assessment of soil degradation. R. Lal, W.H. Blum, C. Valentine et B.A. Steward. Boca Raton, Florida, Advances in Soil Science. CRC Press: p. 1-17.
- BROHON, B., DELOLME, C. et GOURDON, R. (2001). Complementarity of bioassays and microbial activity measurements for the evaluation of hydrocarbon-contaminated soils quality. Soil Biology and Biochemistry 33(7-8) p.883-891.
- BROOKS, K.M. (2004). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Migration From Creosote-Treated Railway Ties Into Ballast and Adjacent Wetlands USA, Forest Service, 57 p. [en ligne]. Disponible: <http://www.wwpinstitute.org/mainpages/documents/BrooksRailway2004.pdf>
- BROOS, K., MERTENS, J. et SMOLDERS, E. (2005). Toxicity of heavy metals in soil assessed with various soil microbial and plant growth assays: A comparative study. Environmental Toxicology and Chemistry 24(3) p.634-640.
- BROWN, P.J., LONG, S.M., SPURGEON, D.J., SVENDSEN, C. et HANKARD, P.K. (2004). Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* to pyrene, a non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon. Chemosphere 57(11) p.1675-1681.
- BURNS, R.G. (1978). Soil enzymes. London, Academic Press, p.
- CARAVACA, F. et ROLDÁN, A. (2003). Assessing changes in physical and biological properties in a soil contaminated by oil sludges under semiarid Mediterranean conditions. Geoderma 117(1-2) p.53-61.
- CARTER, M.R., GREGORICH, E.G., ANGERS, D.A., BEARE, M.H., SPARLING, G.P., WARDLE, D.A. et VORONEY, R.P. (1999). Interpretation of microbial biomass measurements for soil quality assessment in humid temperate regions. Canadian Journal of Soil Science 79(4) p.507-520.
- CEAEQ (2002). Dosage des hydrocarbures pétroliers C10 à C50 dans les sols et les sédiments, MA. 416 – C10-C50 1.0, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 15 p. [en ligne]. Disponible: <http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/methodes/pdf/MA416C10C5010.pdf>
- CEAEQ (2007). Détermination des hydrocarbures pétroliers (C10 à C50) : dosage par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme, MA. 400 – HYD. 1.1, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 17 p. [en ligne]. Disponible: <http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/methodes/pdf/MA400HYD11.pdf>

- CHAKRABARTI, K., SINHA, N., CHAKRABORTY, A. et BHATTACHARYYA, P. (2004). Influence of soil properties on urease activity under different agro-ecosystems. Archives of Agronomy and Soil Science 50(4) p.477 - 483.
- DAVIS, M.S., MADER, T.L., HOLT, S.M. et PARKHURST, A.M. (2003). Strategies to reduce feedlot cattle heat stress: Effects on tympanic temperature,3. J. Anim Sci. 81(3) p.649-661.
- DAWSON, J.J.C., GODSIFFE, E.J., THOMPSON, I.P., RALEBITSO-SENIOR, T.K., KILLHAM, K.S. et PATON, G.I. (2007). Application of biological indicators to assess recovery of hydrocarbon impacted soils. Soil Biology and Biochemistry 39(1) p.164-177.
- DE LA HORRA, A.M., CONTI, M.E. et PALMA, R.M. (2003). Î²-Glucosidase and Proteases Activities as Affected by Long-Term Management Practices in a Typic Argiudoll Soil. Communications in Soil Science and Plant Analysis 34(17) p.2395 - 2404.
- DE LA PAZ JIMENEZ, M., DE LA HORRA, A., PRUZZO, L. et PALMA, M. (2002). Soil quality: a new index based on microbiological and biochemical parameters. Biology and Fertility of Soils 35(4) p.302-306.
- DEGENS, B.P., SCHIPPER, L.A., SPARLING, G.P. et DUNCAN, L.C. (2001). Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance? Soil Biology and Biochemistry 33(9) p.1143-1153.
- DENI, J. et PENNINGCKX, M.J. (1999). Nitrification and Autotrophic Nitrifying Bacteria in a Hydrocarbon-Polluted Soil. Appl. Environ. Microbiol. 65(9) p.4008-4013.
- DIBBLE, J.T. et BARTHA, R. (1979). Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. Appl. Environ. Microbiol. 37(4) p.729-739.
- DICK, R.P. (1997). Soil Enzyme Activities as Integrative Indicators of Soil Health. Biological Indicators of Soil Health. C.E. Pankhurst, B.M. Doube et V.V.S.R. Gupta. United Kingdom, Cab international: p. 121-156.
- DIRECTION RÉGIONALE DE L'ENVIRONNEMENT NORD-PAS-DE-CALAIS (2008). Le profil environnemental régional Nord-Pas-de-Calais, Direction Régionale de l'Environnement, Direction Régionale de l'Industrie, de la Recherche et de l'Environnement du Nord-Pas-de-Calais, 201 p. [en ligne]. Disponible: <http://www.nord-pas-de-calais.ecologie.gouv.fr/IMG/pdf/profil-environnemental-npdc-tome-1.pdf>
- DORAN, J.W. (2002). Soil health and global sustainability: translating science into practice. Agriculture, Ecosystems & Environment 88(2) p.119-127.
- DORAN, J.W. et SAFLEY, M. (1997). Defining and Assessing Soil Health and Sustainable Productivity. Biological Indicators of Soil Health. C.E. Pankhurst, B.M. Doube et V.V.S.R. Gupta. United Kingdom, Cab international: p. 1-28.
- DORAN, J.W. et ZEISS, M.R. (2000). Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. Applied Soil Ecology 15(1) p.3-11.
- DORN, P.B. et SALANITRO, J.P. (2000). Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. Chemosphere 40(4) p.419-426.

- DORN, P.B., VIPOND, T.E., SALANITRO, J.P. et WISNIEWSKI, H.L. (1998). Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, microtox®, and plants. Chemosphere 37(5) p.845-860.
- DUSSAULT, M. (2006). Validation d'un indice de la stabilité relative des sols par l'évaluation de l'activité enzymatique dans le contexte d'une contamination au cuivre. Département de génie chimique. Montréal, École polytechnique de Montréal. Mémoire de maîtrise, 230 p. [en ligne]. Disponible: <http://proquest.umi.com/pqdweb?index=0&sid=1&srchmode=2&vinst=PROD&fmt=6&startpage=-1&clientid=43390&vname=PQD&did=1268603871&scaling=FULL&ts=1304375274&vtype=>
- DUSSAULT, M., BECAERT, V., FRANCOIS, M., SAUVE, S. et DESCHENES, L. (2008). Effect of copper on soil functional stability measured by relative soil stability index (RSSI) based on two enzyme activities. Chemosphere 72(5) p.755-762.
- EFFRON, D., DE LA HORRA, A.M., DEFRIERI, R.L., FONTANIVE, V. et PALMA, R.M. (2004). Effect of Cadmium, Copper, and Lead on Different Enzyme Activities in a Native Forest Soil. Communications in Soil Science and Plant Analysis 35(9) p.1309 - 1321.
- EIVAZI, F. et TABATABAI, M.A. (1990). Factors affecting glucosidase and galactosidase activities in soils. Soil Biology and Biochemistry 22(7) p.891-897.
- EPA, U. (1996). Pump-and-Treat Ground-Water Remediation: A Guide for Decision Makers and Practitioners: p.
- EVANS, M., FAZAKAS, K. et KEATING, J. (2009). Creosote Contamination in Sediments of the Grey Owl Marina in Prince Albert National Park, Saskatchewan, Canada. Water, Air, & Soil Pollution 201(1) p.161-184.
- FRASER, M., BARKER, J.F., BUTLER, B., BLAINE, F., JOSEPH, S. et COOKE, C. (2008). Natural attenuation of a plume from an emplaced coal tar creosote source over 14 years. Journal of Contaminant Hydrology 100(3-4) p.101-115.
- FUJINO, C., WADA, S., KONOIKE, T., TOYOTA, K., SUGA, Y. et IKEDA, J.-I. (2008). Effect of different organic amendments on the resistance and resilience of the organic matter decomposing ability of soil and the role of aggregated soil structure. Soil Science & Plant Nutrition 54(4) p.534-542.
- GAN, S., LAU, E.V. et NG, H.K. (2009). Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Journal of Hazardous Materials 172(2-3) p.532-549.
- GIANFREDA, L., RAO, M.A., PIOTROWSKA, A., PALUMBO, G. et COLOMBO, C. (2005). Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: Intensive agricultural practices and organic pollution. Science of the Total Environment 341(1-3) p.265-279.
- GIL-SOTRES, F., TRASAR-CEPEDA, C., LEIROS, M.C. et SEOANE, S. (2005). Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. Soil Biology and Biochemistry 37(5) p.877-887.
- GOUVERNEMENT DU CANADA, ENVIRONNEMENT CANADA et SANTÉ CANADA (1994a). Huiles de moteur usées. Liste des substances d'intérêt prioritaire - Rapport

- d'évaluation. Loi canadienne sur la protection de l'environnement, Ministre des Approvisionnements et Services Canada 49 p. [en ligne]. Disponible: http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt_formats/hecs-sesc/pdf/pubs/contaminants/psl1-lsp1/crankcase_oils-huiles_moteur/crankcase_oils-huiles_moteur-fra.pdf
- GOUVERNEMENT DU CANADA, ENVIRONNEMENT CANADA et SANTÉ CANADA (1994b). Hydrocarbures aromatiques polycycliques. Liste des substances d'intérêt prioritaire - Rapport d'évaluation. Loi canadienne sur la protection de l'environnement. Canada, Ministre des Approvisionnements et Services Canada 76 p. [en ligne]. Disponible: http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt_formats/hecs-sesc/pdf/pubs/contaminants/psl1-lsp1/hydrocarb_aromat_polycycl/hydrocarbons-hydrocarbures-fra.pdf
- GOUVERNEMENT DU CANADA, ENVIRONNEMENT CANADA et SANTÉ CANADA (1994c). Matières résiduelles imprégnées de créosote. Liste des substances d'intérêt prioritaire - Rapport d'évaluation. Loi canadienne sur la protection de l'environnement, Ministre des Approvisionnements et Services Canada 33 p. [en ligne]. Disponible: <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/contaminants/psl1-lsp1/creosote/index-fra.php>
- GREGORICH, E., CARTER, M., DORAN, J., PANKHURST, C.E. et DWYER, L. (1997). Biological attributes of soil quality. Soil Quality for Crop Production and Ecosystem Health. Gregorich EG et C. MR. New-York, Elsevier: p. 81-114.
- GRIFFITHS, B., HALLETT, P., KUAN, H., GREGORY, A., WATTS, C. et WHITMORE, A. (2008). Functional resilience of soil microbial communities depends on both soil structure and microbial community composition. Biology and Fertility of Soils 44(5) p.745-754.
- GRIFFITHS, B.S., BONKOWSKI, M., ROY, J. et RITZ, K. (2001). Functional stability, substrate utilisation and biological indicators of soils following environmental impacts. Applied Soil Ecology 16(1) p.49-61.
- HAMDI, H., BENZARTI, S., MANUSADZIANAS, L., AOYAMA, I. et JEDIDI, N. (2007). Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. Soil Biology and Biochemistry 39(8) p.1926-1935.
- HARITASH, A.K. et KAUSHIK, C.P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. Journal of Hazardous Materials 169(1-3) p.1-15.
- HERRICK, J.E. et WANDER, M.M. (1998). Relationships between soil organic carbon and soil quality in cropped and rangeland soils: the importance of distribution, composition and soil biological activity. Soil processes and the carbon cycle. B. Raton. Florida, US, CRC Press: p. 405-425.
- HWANG, S. et CUTRIGHT, T.J. (2002). The impact of contact time on pyrene sorptive behavior by a sandy-loam soil. Environmental Pollution 117(3) p.371-378.
- INERIS (2003). Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) - Évaluation de la relation dose-réponse pour des effets cancérogènes: Approche substance par substance (facteurs d'équivalence toxique - FET) et approche par mélanges - Évaluation de la relation dose-réponse pour des effets non cancérogènes: Valeurs Toxicologiques de Référence (VTR). France, Unité d'Expertise des Substances Chimiques (ETSC), Direction des Risques

- Chroniques, INERIS, 63 p. [en ligne]. Disponible: http://www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/etud_impact/hap_ei72.pdf
- INERIS (2005). Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques - Guide méthodologique - Acquisition des données d'entrée des modèles analytiques ou numériques de transferts dans les sols et les eaux souterraines. France, INERIS, 85 p. [en ligne]. Disponible: <http://www.ineris.fr/transpol/themes/transpol/images/file/cr1/66244-DESP-R01.pdf>
- JACKSON, R.E., DWARAKANATH, V., EWING, J.E. et AVIS, J. (2006). Migration of viscous non-aqueous phase liquids (NAPLs) in alluvium, Fraser River lowlands, British Columbia. Can. Geotech. J. 43(7) p.694-703.
- KANDELER, E. (1996). Urease Activity by Colorimetric Technique. Methods in Soil Biology. F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler et R. Margesin. Germany, Springer: p. 171-174.
- KARLEN, D.L., DITZLER, C.A. et ANDREWS, S.S. (2003). Soil quality: why and how? Geoderma 114(3-4) p.145-156.
- KARLEN, D.L., MAUSBACH, M.J., DORAN, J.W., CLINE, R.G., HARRIS, R.F. et SCHUMAN, G.E. (1997). Soil Quality: A Concept, Definition, and Framework for Evaluation (A Guest Editorial). Soil Sci Soc Am J 61(1) p.4-10.
- KAUFMAN, L.H. (1982). Stream aufwuchs accumulation: Disturbance frequency and stress resistance and resilience. Oecologia 52(1) p.57-63.
- KEITH, L. et TELLIARD, W. (1979). ES&T Special Report: Priority pollutants: I-a perspective view. Environmental Science & Technology 13(4) p.416-423.
- KIM, Y.-J. et OSAKO, M. (2003). Leaching characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from spiked sandy soil. Chemosphere 51(5) p.387-395.
- KIRCHMANN, H. et ANDERSSON, R. (2001). The Swedish System for Quality Assessment of Agricultural Soils. Environmental Monitoring and Assessment 72(2) p.129-139.
- KISS, S., DRAGAN, -B., M. et RADULESCU, D. (1975). Biological significances of enzymes accumulated in soil. Advances in Agronomy 27 p.25-87.
- KLOSE, S., MOORE, J.M. et TABATABAI, M.A. (1999). Arylsulfatase activity of microbial biomass in soils as affected by cropping systems. Biology and Fertility of Soils 29(1) p.46-54.
- KLOSE, S. et TABATABAI, M.A. (1999). Urease activity of microbial biomass in soils. Soil Biology and Biochemistry 31(2) p.205-211.
- KNIGHT, T.R. et DICK, R.P. (2004). Differentiating microbial and stabilized β-glucosidase activity relative to soil quality. Soil Biology and Biochemistry 36(12) p.2089-2096.
- KNOEPP, J.D., COLEMAN, D.C., CROSSLEY, D.A. et CLARK, J.S. (2000). Biological indices of soil quality: an ecosystem case study of their use. Forest Ecology and Management 138(1-3) p.357-368.
- KRAUSS, M. et WILCKE, W. (2002). Sorption Strength of Persistent Organic Pollutants in Particle-size Fractions of Urban Soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 66(2) p.430-437.

- KUAN, H.L., FENWICK, C., GLOVER, L.A., GRIFFITHS, B.S. et RITZ, K. (2006). Functional resilience of microbial communities from perturbed upland grassland soils to further persistent or transient stresses. Soil Biology and Biochemistry 38(8) p.2300-2306.
- LABUD, V., GARCIA, C. et HERNANDEZ, T. (2007). Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. Chemosphere 66(10) p.1863-1871.
- LADD, J.N. et BUTLER, J.H.A. (1972). Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. Soil Biology and Biochemistry 4(1) p.19-30.
- LAL, R., WAGNER, A., GREENLAND, D.J., QUINE, T., BILLING, D.W., EVANS, R. et GILLER, K. (1997). Degradation and resilience of soils. Philosophical transactions-Royal Society of London. Biological sciences 352(1356) p.997-1010.
- LE CONSEIL CANADIEN DES MINISTRES DE L'ENVIRONNEMENT (2001). Standard pancanadien relatifs aux hydrocarbures pétroliers (HCP) dans les sols, 9 p. [en ligne]. Disponible: http://www.ccme.ca/assets/pdf/phc_standard_1.0_f.pdf
- LI, H., CHEN, J., WU, W. et PIAO, X. (2010). Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in different size fractions of soil from a coke oven plant and its relationship to organic carbon content. Journal of Hazardous Materials 176(1-3) p.729-734.
- LI, H., ZHANG, Y., KRAVCHENKO, I., XU, H. et ZHANG, C.-G. (2007). Dynamic changes in microbial activity and community structure during biodegradation of petroleum compounds: A laboratory experiment. Journal of Environmental Sciences 19(8) p.1003-1013.
- LINDSTROM, J.E., BARRY, R.P. et BRADDOCK, J.F. (1999). Long-term effects on microbial communities after a subarctic oil spill. Soil Biology and Biochemistry 31(12) p.1677-1689.
- LIU, L., TINDALL, J. et FRIEDEL, M. (2007). Biodegradation of PAHs and PCBs in Soils and Sludges. Water, Air, & Soil Pollution 181(1) p.281-296.
- LORENZ, N., HINTEMANN, T., KRAMAREWA, T., KATAYAMA, A., YASUTA, T., MARSCHNER, P. et KANDELER, E. (2006). Response of microbial activity and microbial community composition in soils to long-term arsenic and cadmium exposure. Soil Biology and Biochemistry 38(6) p.1430-1437.
- MACKAY, D., SHIU, W.Y. et K.C., M. (1992). Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals, Lewis Publishers p.
- MAILA, M.P. et CLOETE, T.E. (2005). The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants--perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review. International Biodeterioration & Biodegradation 55(1) p.1-8.
- MAKOI, J.H.J.R. et NDAKIDEMI, P.A. (2008). Selected soil enzymes: Examples of their potential roles in the ecosystem. African Journal of Biotechnology 7(3) p.181-191.
- MALISZEWSKA-KORDYBACH, B. (2005). Dissipation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Freshly Contaminated Soils – The Effect of Soil Physicochemical Properties and Aging. Water, Air, & Soil Pollution 168(1) p.113-128.

- MALISZEWSKA-KORDYBACH, B. et SMRECZAK, B. (2003a). Changes of Soil Microbial Properties in the Course of Pah Dissipation in Soils Artificially Contaminated with These Compounds. Polycyclic Aromatic Compounds 23(1) p.1 - 21.
- MALISZEWSKA-KORDYBACH, B. et SMRECZAK, B. (2003b). Habitat function of agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. Environment International 28(8) p.719-728.
- MALISZEWSKA-KORDYBACH, B., SMRECZAK, B. et KLIMKOWICZ-PAWLAS, A. (2009). Effects of anthropopressure and soil properties on the accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the upper layer of soils in selected regions of Poland. Applied Geochemistry 24(10) p.1918-1926.
- MARGESIN, R. et SCHINNER, F. (2001). Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. Applied and Environmental Microbiology 67(7) p.3127-3133.
- MARGESIN, R., WALDER, G. et SCHINNER, F. (2000a). The impact of hydrocarbon remediation (diesel oil and polycyclic aromatic hydrocarbons) on enzyme activities and microbial properties of soil. Acta Biotechnologica 20(3-4) p.313-333.
- MARGESIN, R., ZIMMERBAUER, A. et SCHINNER, F. (2000b). Monitoring of bioremediation by soil biological activities. Chemosphere 40(4) p.339-346.
- MDDEP (2002). Protection des sols et réhabilitation des terrains contaminés - Politique ministérielle, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Québec, [en ligne]. <http://www.mddep.gouv.qc.ca/sol/terrains/politique/index.htm> (page consultée le 2 décembre 2008).
- MDDEP (2009). Lignes directrices relatives à la gestion du bois traité. Direction des politiques en milieu terrestre. Québec, Ministère du Développement durable de l'Environnement et des Parcs, 30 p. [en ligne]. Disponible: <http://www.mddep.gouv.qc.ca/matieres/valorisation/lignesdirectrices/bois-traite.pdf>
- MEGHARAJ, M., SINGLETON, I. et MCCLURE, N.C. (1998). Effect of Pentachlorophenol Pollution Towards Microalgae and Microbial Activities in Soil from a Former Timber Processing Facility. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 61(1) p.108-115.
- MEGHARAJ, M., SINGLETON, I., MCCLURE, N.C. et NAIDU, R. (2000). Influence of Petroleum Hydrocarbon Contamination on Microalgae and Microbial Activities in a Long-Term Contaminated Soil. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 38(4) p.439-445.
- MILLENIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT (2005). Ecosystems and Human Well-being: Current State and Trends. Washington, Covelo, London, Mylenium Ecosystem Assement Board, 918 p. [en ligne]. Disponible: <http://www.millenniumassessment.org/en/Condition.aspx>
- NANNIPIERI, P., KANDELER, E. et RUGGIERO, P. (2002). Enzyme Activities and Microbiological and Biochemichal Processes in Soil. Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications. R.G. Burns et R.P. Dick, Marcel Dekker, Inc.: p. 1-34.

- NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY (2003). Standard Reference Material 1647d Priority Pollutant Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (in Acetonitrile) Certificate of Analysis, Department of Commerce, United States of America, 5 p. [en ligne]. Disponible: http://ts.nist.gov/MeasurementServices/ReferenceMaterials/archived_certificates/1647d.%20Dec%203,%202003.pdf
- NATURAL RESOURCES CONSERVATION SERVICE (2009). Texture Triangle and Particle-Size Limits of AASHTO, USDA, and Unified Classification Systems (Exhibit 618-8). National Soil Survey Handbook. United States Department of Agriculture, United States Department of Agriculture., 6: p. 430.
- NORTCLIFF, S. (2002). Standardisation of soil quality attributes. Agriculture, Ecosystems & Environment 88(2) p.161-168.
- ORTEGA-CALVO, J.J., LAHLOU, M. et SAIZ-JIMENEZ, C. (1997). Effect of organic matter and clays on the biodegradation of Phenanthrene in soils. International Biodeterioration & Biodegradation 40(2-4) p.101-106.
- ORWIN, K.H. et WARDLE, D.A. (2004). New indices for quantifying the resistance and resilience of soil biota to exogenous disturbances. Soil Biology and Biochemistry 36(11) p.1907-1912.
- PANKHURST, C.E., DOUBE, B.M. et GUPTA, V.V.S.R. (1997). Biological Indicators of Soil Health: Synthesis. Biological Indicators of Soil Health. C.E. Pankhurst, B.M. Doube et V.V.S.R. Gupta. United Kingdom, Cab international: p. 419-435.
- PASCUAL, J.A., GARCÍA, C. et HERNANDEZ, T. (1999). Lasting microbiological and biochemical effects of the addition of municipal solid waste to an arid soil. Biology and Fertility of Soils 30(1) p.1-6.
- PENA, W., TRASAR-CEPEDA, C., GIL-SOTRES, F. et LEIROS, M.C. (2007). Modification of the degradative capacity of a soil artificially contaminated with diesel. Chemosphere 67(5) p.1057-1063.
- PHILLIPS, T.M., LIU, D., SEECH, A.G., LEE, H. et TREVORS, J.T. (2000). Monitoring bioremediation in creosote-contaminated soils using chemical analysis and toxicity tests. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 24(2) p.132-139.
- PIMM, S.L. (1984). The complexity and stability of ecosystems. Nature 307(5949) p.321-326.
- PLAZA, G., NAŁĘCZ-JAWECKI, G., PINYAKONG, O., ILLMER, P. et MARGESIN, R. (2010). Ecotoxicological and microbiological characterization of soils from heavy-metal- and hydrocarbon-contaminated sites. Environmental Monitoring and Assessment 163(1) p.477-488.
- PLAZA, G., NAŁĘCZ-JAWECKI, G., ULFIG, K. et BRIGMON, R.L. (2005). The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. Chemosphere 59(2) p.289-296.
- PNUE (2007). GEO4 - L'environnement pour le développement, 574 p. [en ligne]. Disponible: http://www.unep.org/geo/geo4/report/GEO-4_Report_Full_FR.pdf

- REID, B.J., JONES, K.C. et SEMPLE, K.T. (2000). Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments--a perspective on mechanisms, consequences and assessment. Environmental Pollution 108(1) p.103-112.
- RENELLA, G., MENCH, M., VAN DER LELIE, D., PIETRAMELLARA, G., ASCHER, J., CECCHERINI, M.T., LANDI, L. et NANNIPIERI, P. (2004). Hydrolase activity, microbial biomass and community structure in long-term Cd-contaminated soils. Soil Biology and Biochemistry 36(3) p.443-451.
- RIFFALDI, R., LEVI-MINZI, R., CARDELLI, R., PALUMBO, S. et SAVIOZZI, A. (2006). Soil Biological Activities in Monitoring the Bioremediation of Diesel Oil-Contaminated Soil. Water, Air, & Soil Pollution 170(1) p.3-15.
- SALANITRO, J.P., DORN, P.B., HUESEMANN, M.H., MOORE, K.O., RHODES, I.A., RICE JACKSON, L.M., VIPOND, T.E., WESTERN, M.M. et WISNIEWSKI, H.L. (1997). Crude Oil Hydrocarbon Bioremediation and Soil Ecotoxicity Assessment. Environmental Science & Technology 31(6) p.1769-1776.
- SAMANTA, S.K., SINGH, O.V. et JAIN, R.K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: Environmental pollution and bioremediation. Trends in Biotechnology 20(6) p.243-248.
- SAVIOZZI, A., CARDELLI, R. et COZZOLINO, M. (2009). Bioremediation with Compost of a Diesel Contaminated Soil: Monitoring by Dehydrogenase Activity and Basal Respiration. Compost Science & Utilization 17.1 p.55-60.
- SCELZA, R., ANTONIETTA RAO, M. et GIANFREDI, L. (2007). Effects of compost and of bacterial cells on the decontamination and the chemical and biological properties of an agricultural soil artificially contaminated with phenanthrene. Soil Biology and Biochemistry 39(6) p.1303-1317.
- SCHINNER, F., ÖHLINGER, R., KANDELER, E. et MARGESIN, R. (1996). Methods in Soil Biology. Germany, Springer, 426 p.
- SERRANO, A., TEJADA, M., GALLEGO, M. et GONZALEZ, J.L. (2009). Evaluation of soil biological activity after a diesel fuel spill. Science of The Total Environment 407(13) p.4056-4061.
- SEYBOLD, C.A., HERRICK, J.E. et BREJDA, J.J. (1999). Soil Resilience: A Fundamental Component of Soil Quality. Soil Science 164(4) p.224-234.
- SHIN, K.-H. et KIM, K.-W. (2001). Ecotoxicity Monitoring of Hydrocarbon-Contaminated Soil using Earthworm (*Eisenia foetida*). Environmental Monitoring and Assessment 70(1) p.93-103.
- SILVA, Í.S., SANTOS, E.D.C.D., MENEZES, C.R.D., FARIA, A.F.D., FRANCISCON, E., GROSSMAN, M. et DURRANT, L.R. (2009). Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. Bioresource Technology 100(20) p.4669-4675.
- SINSABAUGH, R.L., CARREIRO, M.M. et ALVAREZ, S. (2002). Enzyme and Microbial Dynamics of Litter Decomposition. Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications. R.G. Burns et R.P. Dick, Marcel Dekker, Inc.: p. 249-265.

- SPARLING, G.P. (1997). Soil Microbial Biomass Activity and Nutrient Cycling as Indicators of Soil Health. Biological Indicators of Soil Health. C.E. Pankhurst, B.M. Doube et V.V.S.R. Gupta. United Kingdom, Cab international: p. 97-119.
- SPOSITO, G. (2000). The Chemical Composition of Soils. The Chemistry of Soils. Oxford University Press. New-York: p. 3-27.
- STADDON, W.J., DUCHESNE, L.C. et TREVORS, J.T. (1998). Acid phosphatase, alkaline phosphatase and arylsulfatase activities in soils from a jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.) ecosystem after clear-cutting, prescribed burning, and scarification. Biology and Fertility of Soils 27(1) p.1-4.
- STATSOFT INC (2009). Statistica 9.0p. [en ligne]. Disponible:
- STROBL, W. et TRAUNMÜLLER, M. (1996). Arylsulfatase activity. Methods in Soil Biology. F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler et R. Margesin. Germany, Springer: p. 230-232.
- SVERDRUP, L.E., EKELUND, F., KROGH, P.H., NIELSEN, T. et JOHNSEN, K. (2002). Soil microbial toxicity of eight polycyclic aromatic compounds: Effects on nitrification, the genetic diversity of bacteria, and the total number of protozoans. Environmental Toxicology and Chemistry 21(8) p.1644-1650.
- TANG, L., TANG, X.-Y., ZHU, Y.-G., ZHENG, M.-H. et MIAO, Q.-L. (2005). Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in urban soils in Beijing, China. Environment International 31(6) p.822-828.
- TATE, R.L. (2002). Microbiology and Enzymology of Carbon and Nitrogen Cycling. Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications. R.G. Burns et R.P. Dick, Marcel Dekker, Inc.: p. 227-248.
- TEJADA, M., GONZALEZ, J.L., HERNANDEZ, M.T. et GARCIA, C. (2008). Application of different organic amendments in a gasoline contaminated soil: Effect on soil microbial properties. Bioresource Technology 99(8) p.2872-2880.
- TEJADA, M., HERNANDEZ, M.T. et GARCIA, C. (2006). Application of Two Organic Amendments on Soil Restoration: Effects on the Soil Biological Properties. J Environ Qual 35(4) p.1010-1017.
- TRASAR-CEPEDA, C., LEIRÓS, C., GIL-SOTRES, F. et SEOANE, S. (1997). Towards a biochemical quality index for soils: An expression relating several biological and biochemical properties. Biology and Fertility of Soils 26(2) p.100-106.
- TRASAR-CEPEDA, C., LEIROS, M.C. et GIL-SOTRES, F. (2008). Hydrolytic enzyme activities in agricultural and forest soils. Some implications for their use as indicators of soil quality. Soil Biology and Biochemistry 40(9) p.2146-2155.
- TRASAR-CEPEDA, C., LEIRÓS, M.C., SEOANE, S. et GIL-SOTRES, F. (2000). Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. Soil Biology and Biochemistry 32(13) p.1867-1875.
- TSCHERKO, D., KANDELER, E. et BÁRDOSSY, A. (2007). Fuzzy classification of microbial biomass and enzyme activities in grassland soils. Soil Biology and Biochemistry 39(7) p.1799-1808.

- TUGEL, A.J., HERRICK, J.E., BROWN, J.R., MAUSBACH, M.J., PUCKETT, W. et HIPPLE, K. (2005). Soil Change, Soil Survey, and Natural Resources Decision Making: A Blueprint for Action. Soil Sci Soc Am J 69(3) p.738-747.
- U.S. EPA (1986). Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. EPA Method 8310. Washington D.C., U.S. Environmental Protection Agency, 13 p. [en ligne]. Disponible: <http://www.epa.gov/waste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8310.pdf>
- U.S. EPA (1996). Soxhlet Extraction. EPA Method 3540 C. Washington D.C., U.S. Environmental Protection Agency, 8 p. [en ligne]. Disponible: <http://www.epa.gov/waste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540c.pdf>
- U.S. EPA (2008a). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Washington, USA, Office of Solid Wastes, , 3 p. [en ligne]. Disponible: <http://www.epa.gov/waste/hazard/wastemin/minimize/factshts/pahs.pdf>
- U.S. EPA (2008b). Registration Eligibility Decision for Creosote (Case 0139), United States Environmental Protection Agency 99 p. [en ligne]. Disponible: http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/creosote_red.pdf
- VASSEUR, P., BONNARD, M., PALAIS, F., EOM, I.C. et MOREL, J.L. (2008). Bioavailability of chemical pollutants in contaminated soils and pitfalls of chemical analyses in hazard assessment. Environmental Toxicology 23(5) p.652-656.
- VÁZQUEZ, S., NOGALES, B., RUBERTO, L., HERNÁNDEZ, E., CHRISTIE-OLEZA, J., LO BALBO, A., BOSCH, R., LALUCAT, J. et MAC CORMACK, W. (2009). Bacterial Community Dynamics during Bioremediation of Diesel Oil-Contaminated Antarctic Soil. Microbial Ecology 57(4) p.598-610.
- VINAS, M., SABATE, J., ESPUNY, M.J. et SOLANAS, A.M. (2005). Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation during Bioremediation of Heavily Creosote-Contaminated Soil. Appl. Environ. Microbiol. 71(11) p.7008-7018.
- WILCKE, W. (2000). SYNOPSIS Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Soil - a Review. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 163(3) p.229-248.
- WILCKE, W., KRAUSS, M., SAFRONOV, G., FOKIN, A.D. et KAUPENJOHANN, M. (2005). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Soils of the Moscow Region-- Concentrations, Temporal Trends, and Small-Scale Distribution. J Environ Qual 34(5) p.1581-1590.
- WINDING, A., HUND-RINKE, K. et RUTGERS, M. (2005). The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. Ecotoxicology and Environmental Safety 62(2) p.230-248.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2004). Coal Tar Creosote - Concise International Chemical Assessment Document 62. Geneva, Switzerland, 143 p. [en ligne]. Disponible: <http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/CICAD62.pdf>
- YANG, Y., TAO, S., ZHANG, N., ZHANG, D.Y. et LI, X.Q. (2010). The effect of soil organic matter on fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil: A microcosm study. Environmental Pollution 158(5) p.1768-1774.

- YANG, Z.-X., LIU, S.-Q., ZHENG, D.-W. et FENG, S.-D. (2006). Effects of cadmium, zinc and lead on soil enzyme activities. Journal of Environmental Sciences 18(6) p.1135-1141.
- ZAPF-GILJE, R., PATRICK, G.C. et MCLENEHAN, R. (2001). Overview of the remediation process at sites with creosote related contamination in soil, groundwater and river sediment. Canadian Journal of Civil Engineering 28 p.141-154.
- ZHAN, X., WU, W., ZHOU, L., LIANG, J. et JIANG, T. (2010). Interactive effect of dissolved organic matter and phenanthrene on soil enzymatic activities. Journal of Environmental Sciences 22(4) p.607-614.
- ZHANG, B., DENG, H., WANG, H.-L., YIN, R., HALLETT, P.D., GRIFFITHS, B.S. et DANIELL, T.J. (2010). Does microbial habitat or community structure drive the functional stability of microbes to stresses following re-vegetation of a severely degraded soil? Soil Biology and Biochemistry 42(5) p.850-859.
- ZHANG, Y.-M., WU, N., ZHOU, G.-Y. et BAO, W.-K. (2005). Changes in enzyme activities of spruce (*Picea balfouriana*) forest soil as related to burning in the eastern Qinghai-Tibetan Plateau. Applied Soil Ecology 30(3) p.215-225.
- ZORNOZA, R., MATAIX-SOLERA, J., GUERRERO, C., ARCENEGUI, V., GARCIA-ORENES, F., MATAIX-BENEYTO, J. et MORUGAN, A. (2007). Evaluation of soil quality using multiple lineal regression based on physical, chemical and biochemical properties. Science of the Total Environment 378(1-2) p.233-237.

ANNEXE 1 – Récapitulatif des études récentes de la littérature

Les Tableau A.1- 1 et Tableau A.1- 2 répertorient des études récentes et pertinentes de la littérature dans le domaine des hydrocarbures. Les contextes des études et la liste des fonctions évaluées y sont présentés. Le Tableau A.1- 1 liste plus particulièrement les études de sols contaminés aux hydrocarbures, tandis que le Tableau A.1- 2 énumère des études pour lesquelles les sols contaminés sont en cours ou en fin de traitement de bioremédiation. Certaines études concernent des sols de terrain, mais plusieurs rapportent des contaminations artificielles (études de laboratoire). Plusieurs résultats de ces études sont présentés dans la revue de littérature (Chapitre 1).

Tableau A.1- 1: Études récentes traitant de l'impact d'une contamination aux hydrocarbures dans les sols

Contamination	Artificielle	Fonctions étudiées	Sources
HAP : - 2 sols contaminés à moyen terme (3 ans d'exposition) avec respectivement 9 et 32 mg HAP/kg sol sec - 1 sol contaminé aux hydrocarbures pétroliers à long terme (> 50 ans) avec 100 mg HAP/kg sol sec	Non	- Activités enzymatiques (arylsulphatase, β -glucosidase, déshydrogénase, diacetate fluorescein, oxydase de o-diphénol, phosphatase, uréase)	(Gianfreda <i>et al.</i> , 2005)
HAP (et métaux) - 2 sols contaminés à long (> 50 ans) et moyen terme (3 ans d'exposition) avec respectivement 94; et 31 mg HAP/kg sol sec - 1 sol peu exposé (sans présence de HAP)	Non	- Décompte de bactéries hétérotrophes - Activités enzymatiques (arylsulphatase, déshydrogénase, fluorescein diacetate hydrolase, phosphatase, uréase) - Diversité génétique	(Andreoni <i>et al.</i> , 2004)
Pyrène - Niveaux de contamination: 0; 10; 40; 160; 640 et 2560 mg/kg sol sec - Loam	Oui	- Activités enzymatiques (ethoxiresorufin-o-doethylase, catalase) - Suivi de la mortalité et reproduction des vers de terre (<i>Lumbricus rubellus</i>)	(Brown <i>et al.</i> , 2004)
Mélange de 4 HAP (anthracène, chrysène, fluorène, pyrène) - 2 niveaux de contamination : 10 et 100 mg HAP/kg sol sec - 2 sables loameux (avec faibles COT de 0.72-0.75%, pH respectifs de 5.5 et 6) et 4 sols : un loam argilo-limoneux (COT de 3.2%, pH 7), avec ou sans ajout de compost et/ou acidifié	Oui	- Décompte des bactéries - Activités enzymatiques (acide phosphatase, déshydrogénase) - Respiration microbienne	(Maliszewska-Kordybach et Smreczak, 2003a)
Mélange de 4 HAP (anthracène, chrysène, fluorène, pyrène) avec ou sans métaux - 4 niveaux de contamination : 0; 10; 50 et 100 mg HAP/kg sol sec avec ou sans présence de métaux lourds - 2 sables loameux et 1 loam argilo-limoneux, un sable loameux avec compost; un avec compost et acidifié	Oui	- Décompte de bactéries - Respiration microbienne - Activités enzymatiques (déshydrogénase, phosphatase) - Élongation de racines de blé (<i>Triticum vulgre Vill</i>), avoine (<i>Avena sativa L.</i>), maïs (<i>Zea mays L.</i>), tomate (<i>Lyco-persicon esculentum Miller</i>), pois (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>), tournesol (<i>Helianthus annus L.</i>)	(Maliszewska-Kordybach et Smreczak, 2003b)

Contamination	Artificielle	Fonctions étudiées	Sources
Étude de la contamination simple de 4 HAP et 4 composés hétérocycliques : pyrène, fluoranthène, phénanthrène, fluorène, carbazole, dibenzothiophène, dibenzofurane, acridine - niveaux de contamination : 1; 3; 10; 30; 100; 300; 1 000, and 3 000 mg/kg sol sec	Oui	- Nitrification - Décompte de Protozoa - Diversité génétique (ADN)	(Sverdrup <i>et al.</i> , 2002)
Mélange de HAP - Niveaux de contamination semblables: 2 634 et 1539 mg HAP/kg sol sec - 2 sols prélevés sur des sites industriels de cokerie	Non	- Suivi de la mortalité des vers de terre (<i>Eisenia Fetida</i>) et colembes (<i>Falsamia Candida</i>) - Germination de graine de plantes: laitue (<i>Lectuve sativa</i>), avoine (<i>Avena Setiva L.</i>), chou chinois (<i>Brassica Chinensis</i>)	(Vasseur <i>et al.</i> , 2008)
Phénanthrène - 4 niveaux de contamination : 0; 100, 200 mg par kg sol sec - Ajout de MO dissoute (différentes quantités)	Oui	- Activités enzymatiques (catalase, oxydase de polyphénol, uréase)	(Zhan <i>et al.</i> , 2010)
Diesel - Niveau de contamination : 0; 20; 40; 80; 160 et 400 mL diesel par kg sol sec - Type de sol : loam sableux (CT de 90 g par kg sol sec et pH de 4.2)	Oui	- Biomasse microbienne - Respiration microbienne - Minéralisation de N - Activités enzymatiques (β -glucosidase, phosphomonoestérase, uréase)	(Pena <i>et al.</i> , 2007)
Diesel - Simulation d'un déversement sur un sol agricole (correspondant à 1L/m ² sol)	Oui	- Biomasse microbienne - Activités enzymatiques (arylsulphatase, β -glucosidase, déshydrogénase, phosphatase, protéase, uréase) - Germination de graines de cresson de jardin (<i>Lepidium sativum L.</i>)	(Serrano <i>et al.</i> , 2009)
Hydrocarbures pétroliers - Sol provenant d'un site contaminé aux hydrocarbures sur le long terme Niveaux de contaminations : 2 120; 5 200; 9 200; 13 300 et 21 400 mg de C10-C50 par kg sol sec	Non	- Biomasse microbienne - Activités enzymatiques (déshydrogénase, uréase) - Croissance et diversité des microalgues (<i>Chlorococcum</i> , <i>Scenedesmus sp.</i>)	(Megharaj <i>et al.</i> , 2000)

Contamination	Artificielle	Fonctions étudiées	Sources
Hydrocarbures pétroliers - Sol provenant d'un site contaminé aux hydrocarbures sur le long terme - Niveau de contamination : approximativement 47 900 mg d'hydrocarbures par kg sol sec (40 mg HAP par kg sol sec)	Non	- Décomptes de bactéries hétérotrophes et eucaryotes - Biomasse microbienne - Respiration microbienne - Nitrification - Minéralisation de N - Activités enzymatiques (arylsulfatase, déshydrogénase, diacetate fluorescein, lipase, phosphomonoestérase acide, protéase) - Microtox - Spirotox - Test sur les crustacées Ostracodtoxkit - Élongation de racines provenant de la germination de graine de cresson (<i>Lepidium sativum</i> L.)	(Plaza <i>et al.</i> , 2010)
Hydrocarbures pétroliers - Sol provenant d'un site contaminé et exposé (> 50 ans) à des fuites de réservoirs de pétrole - Niveaux de contaminations : 1.5 à 79 mg hydrocarbures par kg sol sec	Non	- Respiration microbienne induite par substrat - Activités enzymatiques (déshydrogénase, diacetate fluorescein, phosphatase, uréase) - Microtox en phase solide	(Brohon <i>et al.</i> , 2001)
Étude de 3 contaminations : diesel, gazoline ou huile de pétrole brute - 3 niveaux de contaminations : 0; 50 000 et 100 000 mg/kg sols sec - 2 types de sols : sable loameux (COT de 5.8%, pH de 8.2) et un loam limoneux (COT de 13.8%, pH de 7.8)	Oui	- Biomasse microbienne - Respiration microbienne - Activités enzymatiques (β-glucosidase, phosphatase, protéase, uréase) - Germination de graines et élongation des racines d'orge (<i>Ordeum vulgare</i>) d'ivraies vivaces (<i>Lolium perenne</i>)	(Labud <i>et al.</i> , 2007)
Pétrole brut de différentes fractions (lourde, médium, légère) : - 3 niveaux de contamination : respectivement en BTEX 1 735; 15 140 et 36 100 mg/kg sol sec et en naphtalène 140, 320 et 960 mg/kg sol sec - 2 types de sols : limon (COT de 0.3%, pH de 4.1) et sable (COT de 29%, pH de 8.2)	Oui	- Microtox en phase solide de bactéries luminescentes (<i>Photobacterium phosphoreum</i>) - Suivi de la mortalité des vers de terre (<i>Eisenia Fetida</i>) - Germination de graines de laitue (<i>Lactuca sativa</i>), maïs (<i>Zea mays</i>), blé (<i>Triticum aestivum</i>), seigle (<i>Lolium perenne</i>), avoine sauvage (<i>Avena sativa</i>)	(Dorn <i>et al.</i> , 1998)
Pentachlorophénol (PCP) - 3 niveaux de contamination : 0; < 10 et > 800 mg PCP/kg sol sec	Non	- Décompte des microalgues cyanobactéries et fungi - Biomasse microbienne - Activités enzymatiques (déshydrogénase, réductase de nitrate, uréase)	(Megharaj <i>et al.</i> , 1998)

Tableau A.1- 2 : Études récentes traitant de l'impact d'une contamination aux hydrocarbures dans des sols en cours de bioremédiation

Contamination	Artificielle	Fonctions étudiées	Sources
HAP (anthracène, pyrène, benzo(a)pyrène) - niveau de contamination : 3 000 mg HAP total par kg sol sec - Type de traitement : bioaugmentation avec des sols contaminés vieillis, biostimulation par ajout de compost ou de paille de riz	Oui	- Croissance et respiration microbienne - Décompte des bactéries hétérotrophes et fungi - Activités enzymatiques (déshydrogénase, fluorescein diacetate, phosphomonoestérase) - Germination et élongation des racines de graines de laitue (<i>Lactuca Sativa</i>) - Mortalité et inhibition de croissance de crustacés ostracodes (<i>Heterocypris incongruens</i>)	(Hamdi <i>et al.</i> , 2007)
Diesel ou mélange de 2 HAP (naphtalène et phénanthrène) - Niveaux de contamination : 10 000 mg diesel / kg sol sec; 1 000 mg HAP/kg sol sec - Ajout de fertilisant (N) pour bioremédiation : 100 ou 1 000 mg/kg sol sec	Oui	- Biomasse microbienne - Respiration microbienne - Respiration métabolique - Décompte des bactéries - Minéralisation de N - Activités enzymatiques (catalase, déshydrogénase, fluorescein diacetate, lipase, phosphomonoestérase, protéase, uréase)	(Margesin <i>et al.</i> , 2000a)
Phénanthrène – - Niveau de contamination : 150 mg / kg sol sec - Ajout de compost et/ou des souches bactériennes dégradant le phénanthrène	Oui	- Biomasse microbienne - Respiration basale - Activités enzymatiques (arylsulphatase, β -glucosidase, déshydrogénase, phosphatase, uréase)	(Scelza <i>et al.</i> , 2007)
Créosote - Niveaux de contamination : approximativement 2 500; 4 000 et 17 000 mg d'hydrocarbures pétroliers par kg sol sec (dont respectivement 40; 900 et 800 mg HAP par kg sol sec) - Types de sols : 2 loams sableux (COT de 5.3%, pH de 6.5 et COT de 6.9% et pH de 7.5) et 1 sable loameux (COT de 2.4% et pH de 8.1) - Ajout de nutriments et eau	Non	- Mortalité des vers de terre (<i>Eisenia Fetida</i>) - Germination de graines de laitue (<i>Lactuca Sativa</i>) - Microtox en phase solide - SOS-chromtest, toxi-chromotest	(Phillips <i>et al.</i> , 2000)
Diesel ou phénanthrène - Niveaux de contamination : 200 mg phénanthrène par kg sol sec ou 20 000 mg diesel par kg sol sec - Ajout de biosurfactant	Non	- Mortalité, croissance et reproductibilité des vers de terre (<i>Eisenia Fetida</i>)	(Shin et Kim, 2001)

Contamination	Artificielle	Fonctions étudiées	Sources
Hydrocarbures aliphatiques et aromatiques (sol prélevé d'une ancienne manufacture de gaz) – Traitements en cours en biopiles - Niveau de contamination : 640 mg/kg sol sec - sols subissant différents traitements : avec ajout de nutriments (100 C:15 N:1P), avec addition de surfactant	Non	- Biomasse microbienne - Respiration basal et induite par substrat - Respiration microbienne - Activités enzymatiques (déshydrogénase, arylphosphatase) - Biosenseurs (<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Escherichia coli</i>) - Effet léthal et subléthal sur les vers de terre (<i>Eisenia Fetida</i> , <i>L. Terrestris</i>) - Germination de graines d'herbes ivraies (<i>L. perenne</i>), de moutardes (<i>B. alba</i>) et de pois (<i>P. sativum</i>)	(Dawson <i>et al.</i> , 2007)
Diesel - Niveau de contamination : 5 950 mg hydrocarbures total / kg sol sec contamination à moyen terme (2 ans d'exposition) provenant d'un site exposée à une fuite de conduite de gaz - Sols subissant des traitements amendement de nutriments et addition de différents consortia de bactéries	Non	- Décompte des bactéries - Diversité génétique - Recherche de gènes spécifiques (dégradation de catechols et dénitrification)	(Vázquez <i>et al.</i> , 2009)
Diesel - Niveau de contamination : 2 600 mg biodiesel / kg sol sec - Type de sol : principalement sable et gravier - Ajout ou non de fertilisant pour biostimulation ou non	Non	- Respiration microbienne (CO ₂) - Décompte des bactéries hétérotrophes - Activités enzymatiques (lipase, catalase) - Inhibition de la bioluminescence de <i>Vibrio fischeri</i> (<i>Photobacterium phosphoreum</i>)	(Margesin et Schinner, 2001)
Diesel - Niveaux de contamination : approximativement 12 000 et 11 000 mg hydrocarbures par kg sol sec - 2 sols : COT respectifs de 1.5 et 3.8% et pH de 6.3 et 7.7 - 3 types de traitement : atténuation naturelle, biostimulation par ajout de nutriments et bioaugmentation par ajout d'un consortium microbien	Non	- Décompte des bactéries - Activité enzymatique (Déshydrogénase)	(Bento <i>et al.</i> , 2005)
Diesel - Niveau de contamination : 10 000 mg diesel par kg sol sec - Sol essentiellement sableux avec CT de 1.32% et pH 7.5 Traitements de bioremédiation : ajout de fertilisants inorganiques N et P (C 4:N : P 0.2) ou ajout de compost	Oui	- COT - Respiration microbienne - Activités enzymatiques (β-glucosidase, déshydrogénase, Lipase) - Mesure de l'ATP du sol	(Riffaldi <i>et al.</i> , 2006)
Diesel Niveau de contamination : 10 000 mg diesel par kg sol sec Biostimulation : ajout compost (1; 2 ou 4 %)	Oui	- Respiration basale microbienne - Activité enzymatique (déshydrogénase)	(Saviozzi <i>et al.</i> , 2009)

Contamination	Artificielle	Fonctions étudiées	Sources
Diesel - Niveau de contamination : 5 000 mg huile de diesel par kg sol sec - Sol amendé par différents types de fertilisants et nutriments	Oui	- Biomasse C - Biomasse N - Respiration microbienne - Respiration métabolique - Activités enzymatiques (catalase, déshydrogénase, uréase)	(Margesin <i>et al.</i> , 2000b)
Diesel - Niveaux de contamination : 0; 50 000 et 100 000 mg par kg sols sec - Type de sol : loam argileux (COT de 0.63% et pH de 7.7) - Ajout de différents amendements organiques : composte de coton, fumier de volaille, boues d'effluents, et déchets municipaux solides	Oui	- Biomasse microbienne - Respiration microbienne - Activités enzymatiques (arylsulfatase, β -glucosidase, déshydrogénase, phosphatase, uréase)	(Tejada <i>et al.</i> , 2008)
Pétrole brute (fractions légères, moyennes ou lourdes) - 3 niveaux de contamination : respectivement en BTEX 1 735; 15 140 et 36 100 mg/kg sol sec et en naphtalène 140, 320 et 960 mg/kg sol sec - 2 types de sols : limon (COT de 0.3%, pH de 4.1) et sable (COT de 29%, pH de 8.2) - Ajout de fertilisant pour bioremédiation : C 100:N 1 :P 0.2)	Oui	- Microtox en phase solide - Suivi de la mortalité des vers de terre (<i>Eisenia Fetida</i>) - Germination de graines et croissance de maïs (<i>Zea mays</i>), blé (<i>Triticum aestivum</i>), avoine (<i>Avena sativa</i>)	(Dorn et Salanitro, 2000)
Hydrocarbures pétroliers lourds - Traitement en biopiles : une en bioremédiation active depuis 2 ans et une en atténuation naturelle depuis 8 mois - Niveaux de contamination : respectivement 6 050 et 97 000 mg d'hydrocarbures pétroliers par kg sol sec; 2 et 25 320 mg HAP par kg sol sec	Non	- Test sur les crustacés Ostracodtoxkit - Spirotox, Microtox en phase solide - Germination de graines et croissance des racines de seigle (<i>Seccale cereale L.</i>), laitue (<i>Lactuca sativa L.</i>), maïs (<i>Zea mays L.</i>), blé (<i>Triticum vulgare L.</i>), cresson (<i>Lepidum sativum L.</i>), chou (<i>Brassica olearacea</i>)	(Plaza <i>et al.</i> , 2005)
Pétrole brut de différentes fractions (lourde, médium, légère) : - Type de sol : 2 loams limoneux avec COT de 0.3 et pH de 8.2 ou COT de 4.7 % et pH de 7.1 - Niveaux de contamination : avec fraction lourde, médium et légère respectivement dans 1 ^{er} sol : 16 500; 17 800 et 5 350 et dans 2 nd sol : 17 800; 13 350 et 14 870 mg C10-C50 par kg sol sec - Ajout de fertilisant pour bioremédiation : C 100:N 1 :P 0.2)	Oui	- Microtox en phase solide - Suivi de la mortalité des vers de terre (<i>Eisenia Fetida</i>) - Germination de graines et croissance de maïs (<i>Zea mays</i>), blé (<i>Triticum aestivum</i>), avoine (<i>Avena sativa</i>)	(Salanitro <i>et al.</i> , 1997)

ANNEXE 2 – Protocoles expérimentaux

Cette Annexe présente un recueil des protocoles expérimentaux des manipulations réalisées au laboratoire.

A2-1. Contamination artificielle à la créosote de trois sols de texture différente (CIRAIG – PE 72A)

A2-1.1.Objectifs

Ce protocole a pour objectif principal d'élaborer une procédure de contamination artificielle à la créosote dans trois sols de manière à ce que cette contamination soit la plus homogène possible.

Les sols choisis sont : un sol organique (sol Delson), un sol argileux (sol 3T_2) et sol sableux (sol 9T_2).

A2-1.2.Matériel

- ✓ Créosote (Stella Jones, année 2004);
- ✓ Acétone (Fisher, A18-4);
- ✓ Hexane (CAS no 110-54-3);
- ✓ Dichlorométhane (Aldrich, 27056-3);
- ✓ Eau stérile;
- ✓ 3 Sols;
- ✓ 10 bouteilles ambrées cylindriques neuves d'une capacité de 1 L (sols argileux et sableux) et 5 bouteilles cylindriques neuves d'une capacité de 2 L (sol organique) à recouvrir avec du papier d'aluminium;
- ✓ Balance PB3002 pour le sol (précision : 0,01 g);
- ✓ Hotte chimique;
- ✓ Gants de latex ou de nitrile;
- ✓ Seringues de 100, 250 µL, 1 mL et 2,5 mL pour le prélèvement de créosote;
- ✓ Pipettes de 2, 10 et 25 mL;
- ✓ Agitateur mécanique par culbutage.

A2-1.2. Méthodologie

A2-1.2.1. Préparation du sol

1. Déterminer la capacité de rétention d'eau au champ de l'échantillon (selon le protocole PSO A23).

Calcul de la CRC :

$$CRC \left(\frac{g \text{ eau}}{g \text{ sol sec}} \right) = \frac{m_{\text{sol saturé en eau}} - m_{\text{sol sec}}}{m_{\text{sol sec}}}$$

2. Laisser sécher le sol sous hotte quelques jours avant la contamination.

Remarque : La contamination d'un sol peu humide se fait de manière plus homogène qu'avec un sol contenant une trop grande quantité d'eau.

A2-1.2.2. Contamination du sol

Se placer sous une hotte chimique ET NON SOUS UNE HOTTE BIOLOGIQUE;

1. Nettoyer toute la verrerie à l'eau chaude et savon et rincer trois fois à l'eau distillée.
2. Nettoyer toute la verrerie 3 fois à l'acétone, puis 3 fois à l'hexane.
3. À l'aide d'une seringue ou d'une pipette, prélever le volume de créosote nécessaire (voir tableaux en Annexes), puis le mettre dans la bouteille préalablement identifiée : type de sol + C₀, C₁, C₂, C₃ ou C₄.
4. À l'aide d'une pipette de 2 mL, ajouter 2 mL de dichlorométhane dans chacune des bouteilles (préalablement identifiées).
5. Laisser le solvant (dichlorométhane) s'évaporer environ 5min et faire rouler horizontalement de temps à autres les bouteilles de manière à ce que la solution de créosote et dichlorométhane soit en contact avec la surface totale des parois.
6. Une fois le solvant (dichlorométhane) évaporé, introduire la quantité de sol sec voulue (voir Annexes) dans chacun des pots ambrés.
7. Fermer chaque pot avec un couvercle approprié.
8. Placer les pots dans l'agitateur mécanique et laisser culbuter les 5 bouteilles pendant 24h.

Remarque : La surface d'échange du sol avec les parois de la bouteille doit être maximale pour que la créosote puisse s'absorber dans le sol.

9. Procéder à la détermination du poids sec du sol séché sous hotte (voir le protocole standard d'opération (PSO) A7).

La détermination du poids sec du sol :

$$\text{Poids sec} = \frac{m_{\text{échantillon sol humide}} - m_{\text{échantillon sol sec}}}{m_{\text{échantillon sol sec}}}$$

$$\% \text{ Humidité} = \frac{m_{\text{échantillon sol humide}} - m_{\text{échantillon sol sec}}}{m_{\text{échantillon sol humide}}}$$

10. En fonction de la valeur de poids sec du sol séché sous hotte, calculer la quantité de sol sec manquant :

$$m_{\text{sol séché sous à ajouter}} (\text{g sol humide}) = m_{\text{sol sec désiré}} - \frac{m_{\text{sol sec}}}{1 - \text{Poids sec}}$$

11. 24h après la contamination, arrêter l'agitation par culbutage et ajouter dans chaque pot la quantité de sol séché manquante.
12. 48h après le début de la contamination, ajuster le contenu en eau de l'échantillon à environ 60% de la capacité de rétention au champ (CRC), préalablement déterminée.

Exemple de calcul de masse d'eau à ajouter :

$$m_{\text{eau}} = \left(0,60 \times \text{CRC} \left(\frac{\text{g eau}}{\text{g sol sec}} \right) - \text{Poids sec du sol} \left(\frac{\text{g eau}}{\text{g sol sec}} \right) \right) \times m_{\text{sol sec}} (\text{g sol sec})$$

Remarque : L'eau ajoutée doit être stérilisée au préalable.

A2-1.2.3. Mode de conservation des sols / congélation

1. Peser une quantité d'environ 60 g dans une bouteille ambrée et muni d'un bouchon en téflon.
2. Fermer la bouteille de manière hermétique et à l'abri de la lumière et humidité.
3. Congeler les échantillons.

Note : Pour la caractérisation des HAP : conserver 30 g / échantillon

Pour la caractérisation des C_{10} - C_{50} : conserver 30 g / échantillon

A2-1.3. Santé et Sécurité

- Porter des gants pendant la réalisation des manipulations
- Se placer sous hotte chimique.

A2-1.4. Références

Protocole standard d'opération (PSO) A7 : Mesure du poids sec

Protocole standard d'opération (PSO) A 23 : Détermination de la capacité de rétention d'eau au champ d'un échantillon de sol

A2-1.5. Recommandations

Certains HAP sont photoréactifs. Les contenants d'échantillons et d'extraits doivent donc être opaques, ambrés ou recouverts d'aluminium. Leurs bouchons doivent être en téflon ou si ce n'est pas le cas placer de l'aluminium avant le couvercle.

A2-1.6. Annexes

A2-1.6.1. Calcul de la quantité de créosote à ajouter dans le sol

Les facteurs de toxicité équivalents (TEF) utilisés afin de calculer la quantité de créosote à ajouter au sol correspondent aux TEF français selon l'INERIS.

Tableau A.2- 1 Équivalence entre TEF et concentrations.

Composé	Concentration (mg/kg créosote)	TEF français	Équivalence (mg B(a)P/kg créosote)
Acénaphène	87 000	0,001	87,00
Acénaphthylène	2 600	0,001	2,60
Anthracène	4 100	0,01	41,00
Benz[a]anthracène	10 000	0,1	1 000,00
Benzo[a]pyrène	4 700	1	4 700,00
Benzo[b+j+k]fluoranthène	8 900	0,1	890,00
Benzo[c]phénanthrène	1 300		0,00
Benzo[g,h,i]perylène	1 200	0,01	12,00
Chrysène	7 100	0,01	71,00
Coronène		0,001	
Cyclopenta[c,d]pyrène		0,1	
Dibenz[a,c]anthracène		0,1	
Dibenz[a,h]anthracène	350	1	350,00
Fluoranthène	51 000	0,001	51,00
Fluorène	51 000	0,001	51,00
Indéno[1,2,3-cd]pyrène	1 200	0,1	120,00
Naphtalène	65 000	0,001	65,00
Phénanthrène	94 000	0,001	94,00
Pyrène	32 000	0,001	32,00
2-Méthylnaphtalène	32 000		
1-Méthylnaphtalène	13 000		
1,3- Diméthylnaphtalène	4 500		
Triméthylnaphtalène	440		
TOTAL	471 390		7 567

A2-1.6.2. Volumes de créosote nécessaires pour la contamination

Densité de la créosote utilisée : **0,0010837 kg de créosote par mL**

➤ Sol Organique

Masse de sol humide nécessaire : 700 g

CRC du sol sableux : **2,12 g eau / g sol sec** $\pm 0,05$ g eau / g sol sec

Masse de sol sec à introduire dans chaque pot : **308,10 g**

Tableau A.2- 2 : Quantités de créosote à ajouter pour le sol organique.

	Concentration (en mg équ. B(a)P / kg sol sec)	Quantité de créosote à ajouter (kg créosote/kg de sol sec)	Volume de créosote à ajouter (mL/kg de sol sec)	Concentration (en mg HAP / kg sol sec)	Volume de créosote à ajouter (mL)	Instrument de prélèvement de la créosote
C₀	0	0	0	0	0,00	-
C₁- critère B	1,40	1,85E-04	0,17	87	0,052	1 seringue 100 µL
C₂ - critère C	13,96	1,85E-03	1,70	870	0,525	1 seringue 1 mL
C₃	200	2,64E-02	24,39	12 432	7,5	1 pipette 10 mL
C₄	500	6,60E-02	60,98	31 173	18,8	1 pipette 25 mL

➤ Sol Argileux (sol 3 T-2)

Masse de sol humide nécessaire : 780 g

CRC du sol sableux : **0,58 g eau / g sol sec** $\pm 0,00$ g eau / g sol sec

Masse de sol sec à introduire dans chaque pot : **578,64 g**

Tableau A.2- 3 : Quantités de créosote à ajouter pour le sol argileux.

	Concentration (en mg équ. B(a)P / kg sol sec)	Quantité de créosote à ajouter (kg créosote/kg de sol sec)	Volume de créosote à ajouter (mL/kg de sol sec)	Concentration (en mg HAP / kg sol sec)	Volume de créosote à ajouter (mL)	Instrument de prélèvement de la créosote
C₀	0	0	0	0	0,00	-
C₁- critère B	1,40	1,85E-04	0,17	87	0,099	1 seringue 250 µL
C₂ - critère C	13,96	1,85E-03	1,70	870	0,985	1 seringue 1 mL
C₃	200	2,64E-02	24,39	12 432	14,1	1 pipette 25 mL
C₄	500	6,60E-02	60,98	31 173	35,3	1 pipette 25 mL (1 fois 25 mL et 1 fois 15 mL)

➤ **Sol Sableux (sol 3 T-2)**

Masse de sol humide nécessaire : 780 g

CRC du sol sableux : **0,73 g eau / g sol sec** ± 0,06 g eau / g sol sec

Masse de sol sec à introduire dans chaque pot : 542,42 g

Tableau A2- 1. Quantités de créosote à ajouter pour le sol sableux.

	Concentration (en mg équ. B(a)P / kg sol sec)	Quantité de créosote à ajouter (kg créosote/kg de sol sec)	Volume de créosote à ajouter (mL/kg de sol sec)	Concentration (en mg HAP / kg sol sec)	Volume de créosote à ajouter (mL)	Instrument de prélèvement de la créosote
C₀	0	0	0	0	0,00	-
C₁- critère B	1,40	1,85E-04	0,17	87	0,092	1 seringue 100 µL
C₂ - critère C	13,96	1,85E-03	1,70	870	0,924	1 seringue 1 mL
C₃	200	2,64E-02	24,39	12 432	13,2	1 pipette 25 mL
C₄	500	6,60E-02	60,98	31 173	33	1 pipette 25 mL (1 fois 25 mL et 1 fois 15 mL)

A2-2. Extraction des HAP d'un échantillon de sol (CIRAIG – PE 72B)

A2-2.1. Objectif

L'objectif principal de ce protocole est d'extraire au Soxtec les HAP contenus dans des échantillons de sols contaminés à la créosote.

A2-2.2. Matériel

- ✓ Unité d'extraction Soxtec (modèle 1043 Extraction Unit, Tecator);
- ✓ Huile de silicone pour l'unité chauffante du Soxtec;
- ✓ Pierres à ébullition;
- ✓ Hotte chimique;
- ✓ Four à 105°C;
- ✓ Four à 650 °C;
- ✓ Coupelle en céramique;
- ✓ 1 ballon jaugé de 10 mL avec bouchon de verre;
- ✓ Ballons jaugés de 50 mL avec bouchons de verre;
- ✓ Entonnoirs de verre;
- ✓ Pipettes pasteurs;
- ✓ 1 cylindre gradué de 25 mL;
- ✓ 1 cylindre gradué de 50 mL;
- ✓ Bêchers de 50 mL;
- ✓ 2 bêcher de 250 mL pour stocker du dichlorométhane et de l'acétonitrile;
- ✓ 1 bêcher en plastique pour les déchets organiques;
- ✓ Bêchers en aluminium pour l'extraction au Soxtec;
- ✓ 1 Pince;
- ✓ Filtres minipores
- ✓ Vials à HPLC de 1,8 mL;
- ✓ Tubes poreux en celluloses (cellulose extraction thimbles);
- ✓ 1 seringue de 100 µL;
- ✓ 1 seringue de 2,5 mL ou 5 mL
- ✓ Décafluorobiphényle;
- ✓ Acétonitrile;
- ✓ Dichlorométhane;

- ✓ Sulfate de magnésium anhydre, MgSO_4 (CAS n°7487-88-9)
- ✓ Balance analytique avec une précision de $\pm 0,002$ g (Mettler Toledo AB204 ou PB302 switzweland).

A2-2.3. Méthodologie

Se placer sous une hotte chimique et NON SOUS UNE HOTTE BIOLOGIQUE.

A2-2.3.1. Conditionnement du sulfate de magnésium

1. Traiter le MgSO_4 en le chauffant à 650 °C, pendant une nuit dans des petites coupelles en céramique.

Le four utilisé doit être placé sous hotte en raison de la combustion des composés organiques.

2. Laisser refroidir au dessiccateur.

A2-2.3.2. Séchage des tubes poreux en cellulose

1. Entreposer les poreux dans le dessiccateur pendant au moins 12 heures. *Mettre les tubes poreux au dessiccateur le jour précédent l'expérience.*

A2-2.3.3. Conditionnement de la verrerie

1. À l'aide d'une pipette pasteur, rincer les ballons jaugés, leurs bouchons de verre, les entonnoirs en verre, les filtres en inox et les seringues au moins 3 fois avec de l'acétonitrile.
2. À l'aide d'une pipette pasteur, rincer les béchers en aluminium et les béchers en verre de 50 mL avec du dichlorométhane.

A2-2.4. Préparation du standard de récupération : solution de 10 g/L de décafluorobiphényle

La solution de décafluorobiphényle sera injectée dans les échantillons de sol avant l'extraction.

1. Peser exactement 0,25 g de décafluorobiphényle, dans un bécher en verre. *Éviter l'inhalation du produit.*
2. Transvaser la quantité pesée dans un ballon jaugé de 25 mL. Bien rincer le bécher avec de l'acétonitrile (utiliser pour cela une pipette pasteur en verre).
3. Remplir le ballon et compléter au trait de jauge avec de l'acétonitrile.
4. À l'aide d'une pipette pasteur, transférer 1 mL de la solution ainsi obtenue dans 10 vials à HPLC de 1,8 mL (les conserver au congélateur).

A2-2.5. Extraction des HAP au Soxtec

A2-2.5.1. Démarrage du Soxtec

Allumer le Soxtec 2 heures avant le début de l'extraction.

1. Allumer l'unité de réfrigération du Soxtec (température de consigne -12°C) en allumant d'abord la pompe.
2. Allumer l'unité chauffante du Soxtec contenant de l'huile de silicone et fixer la température de consigne à 110°C (voir Annexe). Vérifier l'état de l'huile avant chaque utilisation et faire une vidange si nécessaire.

A2-2.5.2. Préparation des échantillons de sol

À noter qu'il n'est possible de réaliser des extractions que pour trois échantillons de sol à la fois, avec 2 duplicatas pour chacun. Des blancs d'expérience devraient également être réalisés.

1. Dans des béchers de 50 mL, peser précisément environ 1,0000 g d'échantillon de sol dans des béchers de 50 mL.
2. Ajouter la même quantité de MgSO_4 et noter la masse précise pesée.
3. Mélanger jusqu'à l'obtention d'un matériel sec et laisser reposer environ 15 minutes à la température ambiante.

Remarque : *Si le matériel est encore humide, rajouter un poids connu de MgSO_4 et en tenir compte lors de la préparation du blanc de méthode.*

Pour le sol organique, doubler la quantité de MgSO_4 .

4. Placer 6 tubes poreux en cellulose (« cellulose extraction thimbles ») dans les adaptateurs métalliques en prenant soin de bien mettre en contact le bord des tubes et les butoirs des adaptateurs; puis placer les tubes fixés aux adaptateurs sur le support approprié.

Les tubes poreux sont à manipuler avec des gants propres.

5. Transférer le contenu de chaque bécher de 50 mL dans les tubes poreux tout en rinçant le bécher avec quelques mL de dichlorométhane.
6. À l'aide d'une seringue de 100 μL , ajouter 100 μL (5 mg) de la solution de décafluorobiphényle concentrée à 50 g/L (concentration finale dans 50 mL d'extrait est de 100 mg/L) dans chaque échantillon à analyser (contenu dans les tubes poreux en cellulose).

A2-2.5.3. Préparation de blancs d'expérience

Des blancs d'expérience devraient également être réalisés de temps à autre en duplicata.

1. Dans deux béchers de 50 mL, peser précisément environ 1 g MgSO_4 et noter la masse précise pesée.
2. Laisser reposer environ 15 minutes à la température ambiante.

Remarque : Ajuster la masse de MgSO_4 , selon la masse pesée pour les échantillons de sol. Pour le sol organique, par exemple, la masse de MgSO_4 est doublée.

3. Peser deux tubes poreux (« cellulose extraction thimbles ») et noter leurs masses précises (0,0001 g près).

Les tubes poreux sont à manipuler avec des gants propres.

4. Transférer le contenu de chaque bécher de 50 mL dans les tubes poreux tout en rinçant le bécher avec quelques mL de dichlorométhane.
5. Placer les 2 tubes poreux en cellulose dans les adaptateurs métalliques en prenant soin de bien mettre en contact le bord des tubes et les butoirs des adaptateurs; puis placer les tubes fixés aux adaptateurs sur le support approprié.
6. À l'aide d'une seringue de 100 μL , ajouter 100 μL (5 mg) de la solution de décafluorobiphényle concentrée à 50 g/L (concentration finale dans 50 mL d'extrait est de 100 mg/L) dans chaque échantillon à analyser (contenu dans les tubes poreux en cellulose).

A2-2.5.4. Extraction au Soxtec

1. Placer les tubes poreux dans l'extracteur, en position rinçage.
2. À l'aide d'un cylindre gradué de 30 mL, verser environ 30 mL de dichlorométhane dans les béchers en aluminium du Soxtec contenant 5-6 pierres à ébullition.
3. Placer les béchers en aluminium sur la plaque chauffante de l'extracteur et sceller l'extracteur.
4. Placer les tubes poreux en position d'ébullition (« boiling ») et les laisser dans cette position pendant une nuit (16 heures).

En position d'ébullition, les tubes poreux sont immergés dans le solvant. Il faut s'assurer que les valves de condensation sont toutes ouvertes.

5. Placer ensuite les tubes en position de rinçage (« rinsing ») et les laisser dans cette position pendant 30 min.

En position de rinçage, les tubes poreux se trouvent à la surface du solvant.

A2-2.5.5. Transfert de solvants

1. Après le rinçage, fermer les valves de condensation en les tournant d'un quart de tour.
2. Lorsque presque tout le solvant restant est collecté dans le condenseur, appuyer sur l'interrupteur « AIR » de l'unité de service et ouvrir la valve « EVAPORATION » de l'unité d'extraction.

Les traces de dichlorométhane seront collectées dans le condenseur.

3. Fermer la valve « EVAPORATION ».
4. Déceler l'extracteur et retirer les béciers en aluminium de la plaque chauffante l'unité d'extraction en utilisant le support approprié.
5. Récupérer les tubes poreux de l'unité d'extraction en utilisant le support approprié;
6. Afin de récupérer le dichlorométhane évaporé, placer 6 autres béciers propres de la plaque chauffante et sceller l'extracteur.
7. Ouvrir les valves du condenseur et récupérer le solvant dans les béciers.
8. Une fois le dichlorométhane récupéré, retirer les béciers contenant le solvant de la plaque chauffante.
9. Rallumer l'unité chauffante du Soxtec et fixer une nouvelle température de consigne 180°C (voir Annexe).
10. Attendre que cette température de consigne soit atteinte.
11. À l'aide d'un cylindre gradué de 50 mL, verser environ 30 mL d'acétonitrile dans les béciers en aluminium du Soxtec contenant 5-6 pierres à ébullition.
12. Placer les béciers en aluminium sur la plaque chauffante de l'extracteur et sceller l'extracteur.

Il faut s'assurer que les valves de condensation sont toutes ouvertes.

13. Laisser chauffer pendant 30 minutes.
14. Éteindre l'unité chauffante du Soxtec et attendre 20 à 30 min.

A2-2.5.6. Récupération des extraits et préparation pour l'analyse des HAP au HPLC

1. Déceler l'extracteur et retirer les béciers en aluminium de la plaque chauffante.
2. À l'aide d'entonnoirs en verre, verser les extraits contenus dans chaque bécier dans des ballons jaugés de 50 mL préalablement identifiés.
3. Rincer les béciers en aluminium, puis les entonnoirs avec 2 à 3 mL d'acétonitrile.

4. Enlever les entonnoirs et mettre les bouchons sur les ballons.
5. À l'aide d'une pipette pasteur, compléter le volume avec de l'acétonitrile jusqu'au trait de jauge.
6. Bouchonner la fiole jaugée de 50 mL et bien mélanger en inversant à plusieurs reprises (au moins 13 fois).
7. À l'aide d'une seringue et de filtres en inox, filtrer en transférant environ 1,5 mL de l'extrait de sol dans chacun des 2 vials à HPLC de 1,8 mL munis d'un bouchon de téflon. Identifier les vials de la façon suivante : HAP C_i (C₀, C₁, C₂, C₃ ou C₄) – sol (O : organique; A : argileux, S : sableux) – NP/P.
8. Fermer les vials avec des bouchons en téflon. Placer les 12 vials à HPLC dans une boîte de rangement dans congélateur à –20°C.
9. Analyser les extraits de sol au HPLC selon le protocole PE-72C.

A2-2.5.7. Poids sec du sol

1. Réaliser un poids sec du sol de départ (sans ajout de MgSO₄), selon le protocole PSO-A7.

A2-2.6. Santé et sécurité

- Manipuler sous hotte chimique
- Porter des gants de protection
- Le dichlorométhane est un solvant cancérigène. Baisser la vitre de la hotte, lors des manipulations. Ne pas inhaler et éviter tout contact avec la peau. Voir fiche signalétique du dichlorométhane.

A2-2.7. Références

Protocole PE-64I – Extraction au Soxtec des HAP d'un échantillon de sol provenant d'une phase boueuse contaminée à la créosote pour des fins d'analyse au HPLC.

Protocole PE-42E – Extraction au Soxtec et quantification au GC-FID de l'hexadécane à partir d'un échantillon de sol.

Protocole PSO-A7 – Détermination du poids sec d'un sol

Manuel du bain refroidissant, Tecator, Höganäs, Sweden

Manuel du Soxtec System HT6, Tecator, Höganäs, Sweden

Manuel du 1046 Soxtec Service Unit, Tecator, Höganäs, Sweden

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC (2008).

Détermination des hydrocarbures aromatiques polycycliques; Dosage par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse. MA. 400 – HAP 1.1, Rév. 3, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 28 p. [en ligne]. Disponible: <http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/methodes/pdf/MA400HAP11.pdf>

U.S. EPA (1996). Soxhlet Extraction. EPA Method 3540 C. Washington D.C., U.S. Environmental Protection Agency, 8 p. [en ligne]. Disponible: <http://www.epa.gov/waste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540c.pdf>

A2-2.8. Recommandations

S'assurer tout au long de la manipulation de limiter l'exposition des échantillons à la lumière.

Utiliser des bouteilles ambrées ou couvrir avec du papier en aluminium.

A2-2.9. Annexe : Température consigne de l'unité chauffante

Tableau A.2- 4 : Température d'opération de l'unité chauffante du Soxtec selon le solvant utilisé.

Tiré du manuel du 1046 Soxtec Service Unit

Solvant	Température d'opération recommandée (°C)
Diéthyléther	100
Dichlorométhane	110
Ether de pétrole 40-60	110
Acétone	140
Hexane	140
Chloroforme	150
Chloroforme – Méthanol (2 : 1)	160
Tétrachlorure de carbone	160
Acétate d'éthyl	180
Cyclohexane	180
Acétonitrile	180
Trichloroéthylène	190
Méthanol	200
Éthanol	200
Octane	200
Heptane	200
Toluène	200

A2-3. Analyse des HAP au HPLC (CIRAIG – PE 72C)

A2-3.1. Objectifs

Séparer les HAP de la créosote par HPLC afin de détecter et quantifier les 16 HAP prioritaires selon l'EPA (« Environmental Protection Agency ») à l'aide des détecteurs UV et fluorescence. Ce protocole s'applique à l'analyse des HAP extraits d'un échantillon de sol selon le protocole PE-72B.

A2-3.2. Matériel

Pour la calibration :

- ✓ Solution de référence standard des 16 HAP prioritaires selon l'EPA dissous dans l'acétonitrile (Standard Reference Material 1647d : Priority Pollutant Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (in Acetonitrile));
- ✓ Vials ambrés de 1,8 mL avec bouchons munis de septum recouvert de Teflon.

Pour l'analyse au HPLC :

- ✓ Bouteille de 4 L d'acétonitrile grade HPLC, Anachemia;
- ✓ Bouteille de 4 L d'eau pur grade HPLC, Optima;
- ✓ Bouteille de 4 L de méthanol grade HPLC, Optima;
- ✓ Bouteille de 4 L vide pour les déchets de phase liquide;
- ✓ Hélium comprimé;
- ✓ Colonne : CSC-A300/PAH, 5 μ m, 150 x 4,6 mm d.i.(diamètre intérieur) (Numéro de catalogue : 117-205, Chromatography Science Company (CSC) Inc.);
- ✓ CSC Guard-Column kit 4,0 mm d.i. (Numéro de catalogue : CSC-9111-117-4.0, CSC);
- ✓ Colonne de garde : Drop-in Cartridges 5 μ m 20 x 4 mm d.i. (Numéro de catalogue : 9102-117, CSC);
- ✓ Pre-column filter 1/16'' SSi, 0,5 μ m (Numéro de catalogue : 05-0149, CSC) ;
- ✓ Remplacement Fritz (Numéro de catalogue : 05-0155, CSC);
- ✓ Seringues de verre de 25, 100, 250 et 1000 μ L (Hamilton).

A2-3.3. Méthodologie

Ce protocole a été rédigé pour des utilisateurs étant familier avec l'opération d'un appareil HPLC et l'utilisation du logiciel ChromQuest 4.1. Vous référer aux manuels d'instruction du HPLC et du logiciel ChromQuest 4.1 pour plus de détails sur leur fonctionnement.

A2-3.3.1. Procédure de mise en marche de l'ordinateur de contrôle (Dell) et du HPLC

1. Mettre en marche la pompe (**P4000**) (*bouton à l'arrière*), l'auto échantillonneur (**AS3000**) (*bouton à l'avant*), le détecteur UV (**Spectra FOCUS**) (*bouton à l'arrière*) et le détecteur fluorescence (**FL3000**).
2. Mettre en marche le contrôleur (**SN4000**) (*bouton à l'arrière*).
3. Mettre en marche l'ordinateur (**Dell**) et son écran plat.

Le username est : **usager**

Le mot de passe : **utilisation**

4. Vérifier les niveaux des bouteilles de 4L d'acétonitrile, d'eau, de méthanol et la bouteille de rinçage de la seringue d'injection.
5. Remplacer les bouteilles de solvant vide si nécessaire ou ajouter de l'acétonitrile dans la bouteille de rinçage de la seringue d'injection.
6. Ouvrir la valve de la bombonne d'hélium et la valve du régulateur de pression à moins de **10 psi** et vérifier le niveau de gaz dans cette dernière afin d'en avoir suffisamment pour la séquence d'analyse à réaliser. Si nécessaire remplacer la bouteille d'hélium vide par une pleine.
7. Ouvrir les 4 interrupteurs d'alimentation en hélium pour les bouteilles de solvants situés sur le bain dégasseur et ajuster le débit d'hélium avec les régulateurs pour les 4 solvants (A : acétonitrile, B : eau, C : méthanol et D : acétonitrile pour le rinçage de la seringue d'injection). Vérifier le bullage dans les bouteilles de solvant.
8. Laisser dégazer les solvants pendant 30 minutes avec un bon débit en hélium avant d'équilibrer la colonne.
9. Purger les tuyaux d'alimentation à l'aide du clavier de la pompe (P4000).
 - A. Sur le système de commande du **P4000**
 - a. Choisir *Purge*
 - b. Choisir l'alimentation A, B, C ou D à l'aide des touches + ou -, puis appuyer sur *enter*

- c. Ajuster le débit à 8 mL/min, puis appuyer sur *enter*, s'il y a des bulles qui demeurent dans les lignes, augmenter le débit afin de les faire circuler.
 - d. Le temps est toujours mis à 0 et donc contrôler de façon manuelle, appuyer de nouveau sur *enter* tout en ouvrant la vanne noire au-dessus de la pompe
 - e. Vérifier qu'il n'y ait plus de bulles dans les lignes et appuyer sur *Stop* tout en fermant la valve noire.
 - f. Répéter l'opération pour toutes les alimentations.
 - g. Choisir *Status*
- B. Sur le système de commande du **AS3000**
- a. Choisir *Menu*
 - b. Choisir *Commande*, puis *Flush sample syringue*
 - c. Inscire le volume 2500 µL à l'aide des touches + et –
 - d. Choisir *Enter*
 - e. Après le nettoyage de la seringue, choisir *Status*

A2-3.3.2. Équilibration de la colonne

1. Ouvrir le logiciel **Chrom Quest 4.1** dont l'icône se trouve sur le bureau de l'ordinateur.

Le user name est : **dominic damours**

Le mot de passe : **touille**

2. Ouvrir la fenêtre de contrôle **Focus_FL**.
3. Dans la fenêtre **Focus_FL**, ouvrir la méthode d'opération du HPLC pour l'analyse des échantillons (ex : HAP UV FLUO colonne 5 pre-colonne 4 met 2.met) (*choisir la méthode la plus récente*). La méthode est basée sur la méthode : Method 8310 du U.S. EPA. La température de la colonne et pré-colonne fut ajustée à 30°C avec un débit d'élution de 0,8 mL/min.
4. Downloader la méthode (sélectionner **Control>Download method**) afin d'équilibrer la colonne avec un mélange de 50% acétonitrile et 50% eau.
5. Cliquer sur l'icône **Control>Preview run** dans la barre d'outils pour démarrer un monitoring du signal des détecteurs fluorescence et UV afin de vérifier qu'aucun pic n'est apparent et que le signal est constant et équivalent au bruit de fond (surveiller la stabilité du signal et la pression qui doit être inférieure à 3500-4000 psi).

6. Cliquer sur **Control>Instruments status** afin de vérifier la stabilité de la pompe P4000. La valeur de stabilité doit être inférieure à 10 et généralement entre 1 et 3 environ pour considérer que la colonne est équilibrée. L'équilibration de la colonne dure environ 30 minutes.
7. Une fois la colonne équilibrée arrêter le **Preview** en cliquant sur l'icône **Control>Stop Run** dans la barre d'outils et débiter l'analyse des échantillons.

A2-3.3.3. Préparation des standards externes (16 HAP prioritaires)

1. À la balance, peser 0,25 mg de décafluorobiphényle (standard de récupération) et transférer dans un ballon de 25 mL.
2. Ajouter de l'acétonitrile et compléter au trait de jauge. On obtient une solution à 10 g/L.
3. Diluer 10 fois la solution de décafluorobiphényle à 1 g/L : ajouter 100 µL de la solution à 1 g/L à 900 µL d'acétonitrile. On obtient une solution à 1 g/L.
4. Transférer le contenu d'une ampoule de matériel standard de référence 1647d : 16 HAP prioritaires dissous dans l'acétonitrile conservée à la température de la pièce dans un vial à HPLC de 1,8 mL et refermer avec un bouchon muni d'un septum recouvert de téflon.
Conserver le standard de HAP dans le congélateur à -20 °C pour 1 mois maximum afin de minimiser la volatilisation des HAP et de l'acétonitrile.
5. Laisser la solution standard de référence de HAP se réchauffer à la température de la pièce (23°C ± 2°C) et la passer au vortex avant de prélever les volumes nécessaires à la préparation des dilutions du tableau ci-dessous.
6. Effectuer les dilutions en série suivante du matériel standard et de récupération avec de l'acétonitrile grade HPLC dans des vials à HPLC (voir tableau 3-1)

Remarque : Les concentrations de HAP contenues dans la solution de référence 1647d sont jointes en annexes.

Tableau A.2- 5 : Volumes et concentrations du SRM_HAP et du Décafluorobiphényle pour la préparation des standards externes

Dilution	Volume SRM 1647d (µL)	Volume Décafluorobiphényle à 1 g/L (µL)	Volume Acétonitrile (µL)	Concentration HAP total (mg /L)	Concentration décafluorobiphényle (mg /L)
1 :10*(S7)	100	100	800	11.452	100
1 :20 (S6)	50	50	900	5.726	50
1 :50 (S5)	20	20	960	2.290	20
1 :100 (S4)	200 de 1 :20	N/A	800	1.145	10
1 :200 (S3)	100 de 1 :20	N/A	900	0.573	5
1 :250 (S2)	200 de 1 :50	N/A	800	0.458	4
1 :500 (S1)	100 de 1 :50	N/A	900	0.229	2

* Cette dilution n'est pas toujours nécessaire, cela dépend de la concentration des inconnus à analyser.

Remarque : Pour chaque dilution, injecter d'abord le volume d'acétonitrile dans la vial, puis celui du décafluorobiphényle et enfin le volume de la solution standard de référence 1647d.

7. Passer les solutions diluées au vortex suite à leur préparation.
8. Placer les vials de standard externe par ordre croissant de concentration (du moins concentré au plus concentré de S1 à S7) dans l'auto-échantillonneur aux positions A01 à A07.

A2-3.3.4. Collecte et préparation des échantillons

1. Extraction au Soxtec des HAP du sol voir protocole PE-72B
2. Effectuer les dilutions nécessaires des échantillons de l'extrait de sol avec du méthanol afin que l'ensemble des 16 HAP prioritaires se retrouvent dans les intervalles de concentration des standard externes de HAP. (voir le tableau 3.2)

Tableau A.2- 6 : Facteurs de dilution pour les différentes concentrations de HAP dans les sols

Identification	Concentration théorique (mg HAP / kg sol sec)	Concentration de l'extrait (mg HAP /L)	Dilution	Volume de l'extrait à prélever (µL)	Volume d'acétonitrile à prélever (µL)
C ₀	0	0	N/A	1000	0
C ₁ - critère B	87	0,87	N/A	1000	0
C ₂ - critère C	870	8,7	N/A	1000	0
C ₃	12 460	124,6	1 : 20	50	950
C ₄	31 149	311,49	1 : 50	20	980

A2-3.3.5. Analyse des échantillons

➤ Création d'une séquence d'analyse

1. Créer une séquence d'analyse en utilisant l'icône **File>Sequence> Sequence Wizard** et sélectionner **Create a sequence**. La fenêtre **Sequence Wizard – Method** s'ouvrira.
2. Sélectionner la méthode d'analyse soit la même méthode utilisée pour l'équilibration de la colonne (ex. : HAP UV FLUO colonne 3 pre-colonne 4 met 2.met). Dans le champ **Data file type** sélectionnez **For aquisition**. Ensuite, cliquez sur **Next**. La fenêtre **Sequence Wizard – Unknowns** s'ouvrira.
3. Inscrire le **Sample ID** (ex : HAP 150705 PA R1 1p2).
4. Spécifier le **Data path** (ex. : C:\ChromQuest\Projects\Roxanne\Data).
5. Inscrire le **Date file** (ex. : <D><ID>.dat). <D> permet d'inscrire la date et l'heure et <ID> ajouter le **Sample ID** dans le nom du fichier qui sera généré.
6. Spécifier le nombre d'échantillons inconnus à analyser dans la case **Number of unknown runs in sequence**. Cliquez sur **Next**. La fenêtre **Sequence Wizard – Autosampler** s'ouvrira.
7. Spécifier la position du premier échantillon inconnu (ex. : A08).

8. Spécifier la position du premier standard externe de HAP utilisé pour l'étalonnage (ex. A01).
9. Spécifier le volume d'injection (10 µL) qui sera utilisé pour chaque échantillon inconnu et standard externe. Cliquez sur **NEXT**. La fenêtre **Sequence Wizard – Calibration** s'ouvrira.
10. Inscrire le **Calibration ID** (ex : HAP STD 1p500).
11. Spécifier le **Calibration path** (ex. : C:\ChromQuest\Projects\Roxanne\Data).
12. Inscrire le **Date file** (ex. : <D><ID>.dat). <D> permet d'inscrire la date et l'heure et <ID> ajouter le **Sample ID** dans le nom du fichier qui sera généré.
13. Spécifier le nombre de niveau d'étalonnage dans la case **Number of calibration levels**. Cliquez sur **Next**. La fenêtre **Sequence Wizard – Reports** s'ouvrira. Sélectionner "Clear all calibration at start of sequences".
14. Cliquez sur **Finish**. La fenêtre du tableau de la séquence d'analyse s'ouvrira.
15. Vérifier la séquence d'analyse. Changer les dilutions des **Sample ID** et **Filename** des standards externes de HAP utilisé pour l'étalonnage (ex. : changer « ... 1p500... » pour « ...1p250 » etc.). Les standards externes de HAP sont analysés par ordre croissant de concentration (du moins concentré, 1p500, au plus concentré, 1p10).
16. Ajouter une méthode de shutdown à la fin de la séquence si un shutdown du HPLC est désiré à la fin des analyses. Pour ce faire cliquer sur la flèche bleue dans la dernière case de la colonne **Run Type**. La fenêtre **Sample Run Type(s)** s'ouvrira et sélectionner **Shutdown**.
17. Cliquer ensuite sur la flèche verte dans la dernière case de la colonne **Method** afin de spécifier la méthode de shutdown à utiliser. La fenêtre **Open Method File** s'ouvrira et sélectionnez la méthode de shutdown désirée (ex. : Shutdown MeOH 0,05 ml min 4°C.met) L'acétonitrile ne doit pas rester dans la colonne.
18. Sauvegarder la séquence modifiée : **File>Sequence>Save**. Utiliser un nom de séquence tel : 2009 08 06_analys HAPs_1 par exemple.

➤ **Lancer l'analyse**

1. Cliquer sur l'icône **Control>Sequence Run** dans la barre d'outils. La fenêtre **Sequence Run** s'ouvrira. Vérifier que le nom de la séquence est le bon dans le champ **Sequence name**.

2. Cliquer sur **Start** et l'analyse débutera.

A2-3.3.6. Analyse des résultats

➤ **Créer une séquence d'analyse des résultats**

1. Créer une séquence d'analyse en utilisant l'icône **Instrument Wizard** dans la barre d'outil et sélectionner **Create a sequence**. La fenêtre **Sequence Wizard – Method** s'ouvrira.
2. Sélectionner la méthode d'analyse des résultats (ex. : Reprocess Cal 13 07 05 –19 1p10 + DFB.met). Dans le champ **Data file type** sélectionnez **From existing data files**. Ensuite, cliquer sur **Next**. La fenêtre **Sequence Wizard – Select Files** s'ouvrira
3. Ouvrir les fichiers de standard d'étalonnage des HAP et les fichiers des échantillons inconnus à analyser.
4. Cliquer sur **Finish** et la fenêtre du tableau de la séquence d'analyse s'ouvrira.
5. Classez les standards externes par ordre croissant de concentration (S1, ...S7) et spécifiez les **Level** des standards externes de HAP (1 pour S1,...7 pour S7).
6. Sauvegarder la séquence modifiée : **File>Sequence>Save**. Utiliser un nom de séquence tel : 2005 07 15 Reprocess PE64Rv2 T2 par exemple.

➤ **Démarrer la séquence d'analyse des résultats**

1. Cliquer sur **Sequence>Process** l'analyse débutera par la suite et les données de concentrations et d'air sous les chromatogrammes seront sauvegardés dans des fichiers rapports dans le sous-répertoire Reprocess HPLC du répertoire My Documents.
2. Récupérez les fichiers rapport.

A2-3.3.7. Procédure d'arrêt de l'ordinateur de contrôle (Dell) et du HPLC

1. Avant d'arrêter le HPLC vérifiez que le solvant dans lequel la colonne se trouve est le méthanol, sinon rouler une méthode de shutdown (ex : Shutdown MeOH 1 ml min).
2. Éteindre (Shut Down) l'ordinateur (**Dell**) et son écran plat.
3. Éteindre le contrôleur (**SN3000**)
4. Éteindre la pompe (**P4000**), l'auto échantillonneur (**AS3000**), le détecteur UV (**Spectra FOCUS**) et le détecteur fluorescence (**FL3000**).
5. Fermez les 4 interrupteurs d'alimentation en hélium pour les bouteilles de solvants situés sur le bain dégasseur.

6. Fermez la valve de la bombonne d'hélium et la valve du régulateur de pression.

A2-3.4. Références

PSO G12 version 2

U.S. EPA (1986). Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. EPA Method 8310. Washington D.C., U.S. Environmental Protection Agency, 13 p. [en ligne]. Disponible: <http://www.epa.gov/waste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8310.pdf>

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY (2003). Standard Reference Material 1647d Priority Pollutant Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (in Acetonitrile) Certificate of Analysis, Department of Commerce, United States of America, 5 p. [en ligne]. Disponible: http://ts.nist.gov/MeasurementServices/ReferenceMaterials/archived_certificates/1647d.%20Dec%203,%202003.pdf

A2-3.5. Annexe : Contenu d'une ampoule de solution de référence 1647d

Tableau A.2- 7 : Contenu en HAP de la solution de référence 1647 d (National Institute of Standards and Technology, 2003)

Composé	Fraction massique (mg/kg)	Concentration (µg/mL) (à 23°C ± 2 °C)
Naphtalène	25,84 ± 0,33	20,13 ± 0,32
Acenaphthylène	19,89 ± 0,32	15,49 ± 0,29
Acenaphène	26,67 ± 0,54	20,77 ± 0,48
Fluorène	6,09 ± 0,06	4,75 ± 0,06
Phénanthrène	4,40 ± 0,07	3,42 ± 0,06
Anthracène	1,02 ± 0,02	0,79 ± 0,02
Fluoranthène	9,81 ± 0,11	7,64 ± 0,10
Pyrène	10,88 ± 0,11	8,47 ± 0,11
Benz[a]anthracène	5,25 ± 0,04	4,09 ± 0,04
Chrysène	4,71 ± 0,04	3,67 ± 0,04
Benzo[b]fluoranthène	5,36 ± 0,05	4,17 ± 0,05
Benzo[k]fluoranthène	6,06 ± 0,07	4,72 ± 0,07
Benzo[a]pyrène	6,31 ± 0,09	4,91 ± 0,08
Dibenzo[a,h]anthracène	4,54 ± 0,27	3,54 ± 0,22
Benzo[ghi]perylène	4,73 ± 0,15	3,68 ± 0,13
Indeno[1,2,3-cd]perylène	5,49 ± 0,10	4,28 ± 0,09
TOTAL	147,05	114,52

A2-4. Extraction des C₁₀-C₅₀ d'un échantillon de sol (CIRAIG – PE 72D)

A2-4.1. Objectifs

Cette méthode d'extraction s'applique pour extraire à l'aide d'hexane la fraction d'hydrocarbures dans des échantillons de sol en vue d'une analyse par GC-FID. La méthode consiste en la mise en contact de l'échantillon de sol (environ exactement 1 g, préalablement déshydratés par trituration avec du Na₂SO₄) avec de l'hexane. La phase organique recueillie est analysée par chromatographie en phase gazeuse (GC-FID). Pour toute série d'échantillons, les éléments de contrôles de la qualité à réaliser sont décrits.

A2-4.2. Matériel

- ✓ Hexane Optima Fisher 303-04 pour la chromatographie en phase gazeuse;
- ✓ Sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄);
- ✓ Silice (SiO₂);
- ✓ Blanc d'extraction : Un échantillon de sol propre sera extrait et analysé;
- ✓ Balance de précision : 0.0001g;
- ✓ Mortier et pilon de porcelaine;
- ✓ Bouteilles d'extraction de 30 ml munies d'un goulot suffisamment large pour ajouter le sol facilement (une par échantillon);
- ✓ Bain à ultrasons;
- ✓ Vials pour GC (un par échantillon);
- ✓ Agitateur rotatif 30 rpm.

A2-4.3. Méthodologie

Manipuler sous une HOTTE CHIMIQUE et non biologique.

A2-4.3.1. Conditionnement de la verrerie

1. Rincer tout le matériel au moins trois fois à l'hexane.

A2-4.3.2. Préparation du sulfate de sodium (Na₂SO₄)

1. Chauffer le sulfate de sodium à 650 °C pendant une nuit.
2. Laisser refroidir au dessiccateur à la température de la pièce et conserver dans un contenant en verre fermé.

Remarque : Si le Na₂SO₄ a été conservé en permanence au dessiccateur depuis sa livraison, il est inutile de le chauffer à 650°C.

A2-4.3.3. Préparation des colonnettes de silice (SiO_2)

1. Traiter le gel de silice en le chauffant à 650°C pendant une nuit.
2. Laisser refroidir au dessiccateur à la température de la pièce et conserver dans un contenant en verre fermé.
3. Verser l'équivalent d'1 mL de silice, dans une colonnette dans laquelle de la laine de verre a été placée (pour éviter que le silice ne s'écoule). Vérifier l'étanchéité des colonnettes.

A2-4.3.4. Préparation du sol

1. Prélever et peser environ exactement 1g d'échantillon de sol préalablement homogénéisé avec une précision de 0,0001g. (Faire des duplicatas d'expérience).
2. Ajouter 0,5 g de Na_2SO_4 anhydre (dans le cas du sol organique qui a une teneur extrêmement élevée en eau, il faut ajouter 1 g de Na_2SO_4 anhydre).
3. Triturer à l'aide du mortier et du pilon jusqu'à l'obtention d'une fine poudre.

Remarque : S'il se forme des agrégats ou si la poudre s'agglomère sur le pilon, il n'y a probablement pas assez de Na_2SO_4 pour déshydrater l'échantillon.

4. Transvaser délicatement le sol ainsi déshydraté dans la bouteille qui va servir à l'extraction.

Le blanc d'expérience sera considéré comme étant la bouteille contenant du Na_2SO_4 et pas de sol.

A2-4.3.5. Extraction des $\text{C}_{10}\text{-C}_{50}$ contenus dans le sol

1. Transvaser délicatement le sol ainsi déshydraté dans la bouteille qui va servir à l'extraction.
2. Ajouter 5 mL d'hexane dans la bouteille à extraction contenant le sol déshydraté.

Remarque : Dans le cas du sol organique, il est nécessaire d'ajouter 10 ml d'hexane pour pouvoir obtenir un surnageant. Ajouter plus d'hexane si l'échantillon n'est pas totalement recouvert.

3. Mettre du papier d'aluminium sur la bouteille et visser fermement.
4. Mettre au bain à ultrasons pendant exactement 10 minutes.

Remarque : Pour le sol organique, le bain à ultrasons est utilisé pendant 20 minutes pour améliorer le taux de récupération qui est trop faible au bout de 10 minutes. Bien s'assurer

que le niveau de l'eau dans le bain est égal ou supérieur au niveau d'hexane dans les bouteilles.

5. Ajouter 10 mL d'hexane à l'échantillon.
6. Agiter 30 minutes à l'aide de l'agitateur rotatif.
7. À l'aide d'une pipette Pasteur, prélever le surnageant et le passer dans des colonnettes à silice, préalablement préparées.
8. Transférer ensuite dans deux vials (duplicatas d'analyse) pour l'analyse à l'aide du GC-FID.

A2-4.3.6. Analyse des C₁₀-C₅₀ contenus dans le sol

1. Analyser les extraits à l'aide du GC-FID en suivant le protocole PE 72E.

A2-4.3.7. Poids sec du sol

1. Réaliser un poids sec du sol de départ (sans ajout de MgSO₄), selon le protocole PSO-A7.

A2.3.4. Santé et sécurité

- Toujours travailler sous la hotte chimique
- Porter des gants de protection

A2.3.5. Références

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC (2007). Détermination des hydrocarbures pétroliers (C10 à C50) : dosage par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme, MA. 400 – HYD. 1.1, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 17 p. [en ligne]. Disponible: <http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/methodes/pdf/MA400HYD11.pdf>

The total petroleum hydrocarbon criteria working group (TPHCWG) analytical method: Characterization of C6 to C35 petroleum hydrocarbons in environmental samples.

A2-3.6. Recommandation

L'échantillon de sol déshydraté avec du sulfate de sodium peut être conservé à 4 °C.

A2-5. Analyse des C₁₀-C₅₀ par GC-MS (CIRAIG – PE 72E)

A2-5.1. Objectifs

Ce protocole est conçu pour doser les C₁₀-C₅₀ contenus dans les extraits solubilisés dans l'hexane et provenant d'échantillons de sol contaminés à la créosote.

La quantification de mélanges de composés, comme les hydrocarbures pétroliers, se réalise par chromatographie, en faisant passer les extraits dans une colonne. Cette colonne a la capacité de retenir les composés à divers degrés, ce qui a pour conséquence de faire sortir les constituants du mélange l'un après l'autre. Étant donné que le nombre d'hydrocarbures présents dans le mélange est extrêmement élevé, on obtient une « patate » qui correspond à la succession des différents pics de plusieurs composés. La quantification ne sera donc pas réalisée grâce à l'aire sous un pic, mais grâce à l'aire sous l'ensemble de la courbe. Les solutions standard soigneusement préparées seront utilisées afin de définir la fenêtre d'intégration.

A2-5.2. Matériel

- ✓ Appareil chromatographique Varian CP-3380, Auto-sampler CP-8200, Détecteur FID
- ✓ Colonne capillaire CP-SIL 8 CB low bleed / MS. 25m par 0.32mm de diamètre interne
- ✓ Vials
- ✓ Hexane
- ✓ Huile impériale de préservation des poteaux (Esso)
- ✓ Ballon jaugé de 25 ml en verre avec son bouchon
- ✓ Pipette pasteur à long embout
- ✓ Poire pour pipette pasteur
- ✓ Seringue de verre de 100 µl
- ✓ Seringue de verre de 1 ml
- ✓ Bécher de 50 ml

A2-5.3. Connaissances de base pour utiliser le GC

A2-5.3.1. Le logiciel

Le logiciel de l'ordinateur comprend trois programmes principaux :

- Le premier, auquel on accède en appuyant sur le premier bouton à gauche dans la barre d'outils, est le « System Control ». Ce programme contrôle l'acquisition. C'est là que les listes d'échantillons (« Sample Lists ») sont créées;

- Le deuxième bouton ouvre le programme de création de méthodes (« Method Builder »);
- Finalement, le troisième bouton ouvre le programme qui sert à traiter les chromatogrammes et les analyser (« Interactive Graphics »).

A2-5.3.2. Le Chromatogramme

Sur le GC lui-même, il y a une série de boutons permettant de modifier les paramètres de l'analyse :

- « **GC Control** » : Cette section comprend les principaux boutons qui servent à contrôler les paramètres de l'analyse. C'est là que l'on peut changer les programmations de température, la quantité injectée, la température du détecteur, etc.
- « **Method** » : Cette section nous permet de créer ou de modifier les méthodes. Il est important de bien distinguer « méthode active » et « méthode éditée ». La méthode active est la méthode utilisée par le GC pour faire l'analyse. La méthode éditée est la méthode qui est affichée à l'écran et que l'on peut modifier par les boutons de la section GC Control. Il faut se souvenir que la méthode affichée à l'écran (méthode éditée) n'est pas nécessairement celle qui est active. Le GC a la possibilité d'avoir en mémoire jusqu'à huit méthodes. Si l'analyse que l'on veut effectuer ne correspond pas à l'une de ces méthodes, il faudra en choisir une déjà existante et la modifier.
- « **Automatisation** » : Cette section, composée d'un seul bouton, sert à indiquer le type d'automatisation. On peut faire une analyse à l'aide d'une seule méthode (Single Method), ou utiliser plusieurs méthodes (Method Sequence). C'est dans cette section aussi que l'on indique le nombre de vials à analyser et le nombre d'injections à faire. Il faut toujours s'assurer que la méthode active correspond à la méthode indiquée dans cette section.
- « **Instrument** » : Cette section comprend le bouton *Statue* qui nous permet de visualiser l'état du GC. Les boutons *Setup* et *Menu* permettent de modifier la configuration du GC.
- Les trois boutons sous l'écran servent à sélectionner les choix qui y apparaissent

A2-5.4. Méthodologie

A2-5.4.1 Ouverture du GC

1. Commencer par ouvrir le GC à l'aide de l'interrupteur situé au-dessus. Ouvrir les gaz avec les pressions suivantes : He : 60 psi

H₂ : 40 psi

Air : 60 psi

L'indicateur de pression sur le GC devrait indiquer **15 psi**.

2. Laisser le système réchauffer 30 minutes au minimum.

A2-5.4.2. Ouverture du GC

Sur le GC :

1. Choisir la méthode #1 pour le dosage des C₁₀-C₅₀.
2. Activer cette méthode en allant dans **Activate**, en choisissant le numéro de la méthode (**METHOD 1**) et en appuyant sur le bouton juste en bas de l'écran, au milieu (**Activate Method**).
3. Éditer et activer la méthode 1 et programmer les différents paramètres suivants (dans la section GC Control):
 - Dans Sample Delivery et Mode d'injection : Standard (▼ pour passer à la ligne suivante).
 - Dans CP-8200 :
 - Volume d'injection : 5µl (triangle + ou triangle – pour défiler un choix)
 - Temps d'injection : 1.0µl/sec
 - Solvant de rinçage : indiquer quelle bouteille contient le solvant utilisé, dans notre cas : Hexane A
 - Dans Sample Delivery et ensuite:
 - S'assurer que l'on est en mode splitless (programmation vannes)
 - Dans Injector :
 - Température de l'injecteur : Initial 69°C
 - Pas 1 à 300°C,
 - Vit.(°C/min.) : 200.0,
 - maintien (min) 5.00,
 - Total (min) 6.16
 - Alimentation Chauffage : On (option se situant sur la 2^{ème} page)
 - Dans Column Oven :
 - Programmation de température de la colonne: 30°C initiale,

- ensuite 300°C,
- vitesse 10°C/minute,
- maintient pour 10,00 minutes,
- pour un total de 37minutes.
- Temps de stabilisation de la colonne : 2.0 minutes (option se situant sur la 2^{ième} page)
- Dans *Detector* :
 - Température du FID : 320°C
 - Alimentation Chauffage : On
 - Electronique : ON
 - Range du FID : 12
 - Auto-Zéro : On (option se situant sur la 2^{ième} page)
- 4. Dans la section **Automatisation** :
 - appuyer sur *Select/Edit*,
 - choisir *Selection mode automatization*
 - se mettre en mode *Single Method*.
 - Appuyer de nouveau sur *Select/Edit*
 - choisir maintenant l'option *Édition méthode automatization single*.
 - Mettre *premier échantillon* à 1 et *dernier échantillon* à 48 (Ces paramètres seront modifiés par la suite selon le nombre d'analyse souhaitées).
 - Spécifier que l'on fait deux injections par vial.
- 5. Vérifier finalement si la méthode active est bien la méthode #1 qui vient d'être éditée.

A2-5.4.3. Standards de calibration

➤ **Conditionnement de la verrerie**

1. Rincer au moins trois fois à l'hexane le ballon de 25 mL, les seringues de 100 µl et 1 mL.

➤ **Préparation de la solution mère**

1. Dans un ballon de 25 ml, ajouter exactement 1 g d'huile impériale de préservation des poteaux. L'ajout se fait sur la balance de précision à l'aide d'une pipette pasteur après avoir préalablement taré le ballon.

2. Noter le poids exact d'huile ajouté.
3. Compléter jusqu'au trait de jauge du ballon avec de l'hexane. Mettre le bouchon sur le ballon et retourner le ballon au moins 13 fois afin d'homogénéiser son contenu et d'obtenir ainsi une solution mère contenant 40 g/l d'huile.
4. Conserver la solution-mère dans la chambre froide à 4°C pendant une période maximale de 1 mois.

➤ **Préparation des solutions standards**

1. À l'aide d'une seringue de 100 µl, prélever 100 µl de solution-mère et vider la seringue dans un vial. Renouveler l'opération dans un second vial.
2. Ajouter à l'aide d'une seringue de 1 ml, 900 µl d'hexane dans chacun des vials préparés à l'étape précédente. Fermer les deux vials et les agiter au vortex pour homogénéiser leur contenu.

Les deux vials contiennent chacun une solution standard à 4000 mg/l.

3. Procéder de la même manière (dilution en série) en prélevant successivement deux fois 100 µl de la solution à 4000 mg/l et en les diluants dans deux vials avec deux fois 900 µl d'hexane pour obtenir deux vials d'une solution standard à 400 mg/l.

Remarque : il faut soigneusement rincer trois fois à l'hexane la seringue de 100 µl avant de préparer un standard de concentration différente.

4. De la même manière, on préparera une solution à 400 mg/l et une à 4 mg/l.
5. À l'aide d'une seringue de 100 µl, prélever 25 µl de solution mère et vider la seringue dans un vial. Renouveler l'opération dans un second vial.
6. Ajouter à l'aide d'une seringue de 1 ml préalablement rincée trois fois à l'hexane 975 µl d'hexane dans chacun des vials préparés à l'étape précédente. Fermer les deux vials et les agiter pour homogénéiser leur contenu. On obtient ainsi 2 vials contenant chacun une solution standard à 1000 mg/l.
7. Procéder de la même manière (dilutions en série) en prélevant successivement deux fois 100 µl de la solution à 1000 mg/l et en les diluants dans deux vials avec deux fois 900 µl d'hexane pour obtenir deux vials d'une solution standard à 100 mg/l. De la même manière, on préparera une solution à 10 mg/l.
8. En récapitulant, les solutions standards ainsi préparées sont les suivantes :

- 4000 mg/l
- 1000 mg/l
- 400 mg/l
- 100 mg/l
- 40 mg/l
- 10 mg/l
- 4 mg/l

Tableau A.2- 8 : Récapitulatif des standards à préparer

	Concentration du standard (mg/L)	Volume à prélever	Volume d'hexane
S7	4000	100 µL de la solution mère (40 g/L)	900 µL
S6	1000	25 µL de la solution mère (40 g/L)	975 µL
S5	400	100 µL de la solution S7	900 µL
S4	100	100 µL de la solution S6	900 µL
S3	40	100 µL de la solution S5	900 µL
S2	10	100 µL de la solution S4	900 µL
S1	4	100 µL de la solution mère S3	900 µL

Chaque standard doit être préparé en duplicata.

A2-5.4.4. Mise au point de la méthode

Sur l'ordinateur :

1. Ouvrir le programme **Method Builder**.
2. Dans la fenêtre qui vient de s'ouvrir, faire **Open an existing method file**, si la méthode est déjà existante. Dans le cas contraire, faire une nouvelle méthode en utilisant l'option **Create a new method file**. Dans ce cas, plusieurs fenêtres s'ouvriront et vous devrez cliquer **OK** à chacune d'elle.
3. Une fois terminé, vous devez modifier les paramètres suivants :
 - Dans *Set Conditions*, mettre *End Time* à 4,00 minutes
 - Dans *Integration parameters*, mettre *Initial peak reject value* à 250
 - Dans *Calibration setup*, mettre 5.0% au lieu de 0.5% dans la boîte *replicate tolerance*
 - Dans la même fenêtre, mettre *number of calibration level* à 4

- Toujours au même endroit, cocher l'option *Keep replicates separate* dans la boîte *Replicate treatment*.
 - Tout le reste garde les valeurs définies par défaut.
4. Sauvegarder la méthode.

A2-5.4.5. Analyse des échantillons

1. Sur l'ordinateur, aller dans le programme System Control. Ouvrir ensuite une nouvelle SampleList (menu File). Rentrer le nom des échantillons, des standards et des contrôles (blancs, matériaux de référence, hexane...). À « Sample Type », mettre « Analysis » (même pour les standards et les éléments de contrôle qualité, l'ensemble des calculs et des validations de l'analyse étant réalisés par la suite sous Excel). Indiquer que vous faites deux injections par vial.
2. Cliquer sur « Data files » et indiquer dans quel dossier vous voulez stocker vos chromatogrammes et appuyer sur OK (dossier Roxanne, sous-dossier avec la date de l'analyse). Cliquer sur « RecalcList », vérifier que le dossier indiqué est bien le bon et ensuite appuyer sur OK.
3. Placer les vials dans le carrousel dans l'ordre indiqué dans la SampleList.
4. Appuyer sur le bouton « stop » du GC pour s'assurer qu'il va bien commencer par prélever le contenu du vial no 1 du carrousel.
5. Cliquer sur « Begin » sur l'ordinateur. On vous demandera de confirmer la méthode; faites OK.
6. Attendre que la lumière « Ready » soit allumée sur le GC (en général il faut attendre le temps de stabilisation de 2 minutes pour la température dans la colonne à moins que le GC ne vienne de faire une analyse) et appuyer sur le bouton *Start du GC*. S'assurer visuellement que le GC pique bien dans le vial no 1.
7. Une fois l'acquisition terminée, ouvrir le programme Interactive Graphics.
8. À partir de la fenêtre qui apparaît, ouvrir successivement les différents chromatogrammes obtenus. Pour le faire, aller chercher les filières correspondant aux chromatogrammes et les faire descendre dans la petite fenêtre du bas en double cliquant sur la filière. Appuyer sur *Open File(s)*. S'il y a déjà des courbes d'ouvertes, vous n'avez qu'à faire *Clear All*. Il est à noter que l'on peut ouvrir un maximum de 7 chromatogrammes en même temps.

9. En allant ensuite dans *Result*, on devrait voir le nom des filières des chromatogrammes affichés. En plaçant le curseur sur une de ces filières, la fenêtre s'agrandit laissant d'autres choix. En cliquant sur *View results only*, une page s'ouvre avec les valeurs d'aire sous la courbe. Noter ces valeurs dans le cahier de laboratoire pour pouvoir les traiter par la suite.

A2-5.4.6. Fermeture du GC

1. Activer la méthode 2 et attendre que les différents modules aient atteint leur température.
2. Si l'on doit fermer le GC pour moins d'une semaine, simplement fermer l'hydrogène et l'air. Si c'est pour une plus grande période, il faut fermer tous les gaz de même que le GC.

A2-5.5. Calculs

A2-5.5.1. Droite de calibration

1. À l'aide d'un tableur Excel, réaliser un tableau avec dans la première colonne les valeurs d'aires sous la courbe obtenues pour les standards et dans la colonne de droite la concentration (réelle) des standards.

Remarque : Pour obtenir la concentration réelle des standards, on utilise la masse exacte d'huile pesée pour préparer la solution-mère que l'on divise par 25 ml (soit $2,5 \cdot 10^{-2}$ L). Si par exemple on a pesé exactement 1002,7 mg, la solution mère a une concentration réelle de $1002,7 \text{ mg} / 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ L} = 40108 \text{ mg/L}$.

2. Tracer ensuite un graphique avec en abscisse les aires et en ordonnée les concentrations. Ce graphique doit correspondre à une droite s'il n'y a pas eu d'erreur ou de contamination lors de la préparation des standards.
3. La linéarité est vérifiée en ajoutant une courbe de tendance linéaire au graphique. Le coefficient de corrélation R de cette droite doit dépasser 0,995 pour que la droite de calibration soit considérée comme valide.

Remarque : Les standards d'étalonnage choisis représentent une gamme de concentrations extrêmement étendue et il est probable que la droite d'étalonnage ne soit pas parfaitement linéaire sur un tel écart de concentrations (de 4 mg/l à 4000 mg/l). La meilleure solution pour obtenir des résultats précis sur toute l'étendue de ces concentrations est alors de faire deux « segments » sur la droite d'étalonnage, l'un plus adapté pour les échantillons peu concentrés

(en utilisant les standards de 4 mg/l à 400 mg/l), le second plus précis pour les concentrations plus élevées (en utilisant les standards de 100 mg/l à 4000 mg/l).

4. L'équation obtenue pour la courbe de tendance est une relation linéaire qui permet d'obtenir la concentration mesurée à l'aide de l'aire sous la courbe :

$$\text{Concentration} = a + b \times \text{aire sous la courbe}$$

C'est cette relation qui va être utilisée pour déterminer la concentration des échantillons et des éléments de contrôle.

A2-5.5.2. Droite de calibration

➤ **Hexane**

Afin de vérifier qu'il n'y a pas de contamination ou d'interférences dues au solvant ou au GC, afin de vérifier également que la colonne n'est pas contaminée suite au passage des échantillons les plus concentrés, un certain nombre d'échantillons d'hexane (au minimum 2 par série de 30 échantillons) est ajouté à chaque « sample list » à des endroits stratégiques. On place en général des échantillons d'hexane en tout début de liste après un changement de septum ou d'insert sur le GC afin de s'assurer que cette manipulation ne contamine pas un échantillon. On place également des vials d'hexane entre un échantillon très concentré et l'échantillon suivant moins concentré pour s'assurer que la colonne du GC soit propre...

La concentration obtenue à partir de l'aire sous la courbe pour un échantillon d'hexane doit être proche de 0 et dans tous les cas inférieure à la limite de détection.

➤ **Blanc eau (analyse d'un extrait de solution aqueuse)**

La concentration obtenue à partir de l'aire sous la courbe pour un échantillon d'eau pure doit être proche de 0 et dans tous les cas inférieure à la limite de détection.

➤ **Blanc sol (analyse d'un extrait de sol)**

La concentration obtenue à partir de l'aire sous la courbe pour un échantillon de sol propre doit être proche de 0 et généralement inférieure à la limite de détection.

Attention : pour les sols organiques, on observe un certain niveau d'interférences (légèrement supérieur au bruit de fond) dues probablement à la teneur élevée en matière organique du sol.

➤ **Matériaux de référence (MR)**

Il est nécessaire de vérifier l'efficacité de la méthode d'extraction en extrayant, puis en analysant au GC des matériaux de référence (sol ou solution aqueuse) contenant une quantité connue d'huile. Il est parfois nécessaire de réaliser des MR de différentes concentrations pour déterminer des taux de récupération à différentes teneurs en huile.

Le taux de récupération est calculé en divisant la concentration mesurée (obtenue à l'aide de l'aire sous la courbe du chromatogramme et de la relation linéaire obtenue grâce à la droite de calibration) par la concentration réelle dans le matériau de référence extrait.

➤ **Étalons de vérification**

Les vials de solutions standards ont été préparés en double afin de pouvoir glisser quelques étalons de vérification dans la « **sample list** » (au minimum 2 par série de 30 échantillons). Les concentrations mesurées pour ces étalons de vérification ne devront pas varier de plus de 20% par rapport à la concentration attendue. En général, des étalons de vérification ont été utilisés de manière systématique en fin de carrousel afin de s'assurer que la droite de calibration reste valide jusqu'au dernier vial.

➤ **Duplicatas**

Chaque vial fait l'objet de deux injections successives dans le GC. L'écart pour un duplicata d'échantillon ayant une valeur supérieure à la limite de quantification doit rester inférieur à 25%.

➤ **Analyse des échantillons**

À l'aide des aires sous les chromatogrammes, il est possible de calculer la concentration dans l'extrait (hexane). En connaissant le volume d'hexane utilisé pour réaliser l'extraction et la masse de sol extraite, on peut déterminer la concentration dans l'échantillon analysé :

$$\text{Concentration dans le sol} = \frac{\text{Concentration dans l'hexane} \times \text{Volume d'hexane}}{\text{Masse de sol extrait}}$$

A2-5.6. Notes

- Lors de l'acquisition, l'ordinateur sauve les chromatogrammes sous le nom qui lui a été donné dans la SampleList. Si on fait plusieurs injections, l'ordinateur rajoute 001, 002, 003, etc.

- En mode d'injection standard, l'échantillonneur aspire une petite quantité d'hexane avant de prendre l'échantillon à analyser. Il faut donc remplir la bouteille sur le côté du GC avec de l'hexane.
- Dans le cas où il serait nécessaire de mesurer les différents débits, les valeurs sont les suivantes :

Air : 300 ml/min

H₂ : 30 ml/min

He : 30 ml/min (Gaz porteur + Make-up)

A2-5.7. Références

Varian CP-3800 GC, Getting Started Manuel

Varian CP-3800 GC, Operator's Manuel

8200/SPME AutoSampler, Operator's Manuel

A2-6. Mesure de l'activité de la protéase dans un sol (CIRAIG – PE 72F)

A2-6.1. Objectifs

Ce protocole a pour objectif de mesurer le potentiel d'activité enzymatique dans un sol. L'enzyme testée est un représentant du cycle de l'azote.

Puisqu'il est très difficile d'extraire et de mesurer les enzymes contenus dans les sols, le principe sur lequel repose chacun des protocoles proposés est la mesure du potentiel d'activité enzymatique. C'est à dire, que l'on va introduire dans un échantillon de sol un substrat ciblé par l'enzyme testé et l'on mesure après une période d'incubation les produits de la transformation enzymatique (Schinner *et al.*, 1996).

A2-6.2. Matériel

- ✓ Lecteur microplaque (GENios, Tecan)
- ✓ Un agitateur rotatif tempéré
- ✓ HCl 1M
- ✓ NaOH 3 M
- ✓ 3 fioles jaugées de 2 L
- ✓ 4 fioles jaugées de 1L
- ✓ 1 fiole jaugée de 500 mL
- ✓ 1 fiole jaugée de 250 mL (ou de 500 mL)
- ✓ 2 fioles jaugées de 100 mL
- ✓ 3 béciers de 2 L
- ✓ 1 bécier de 250 mL (ou de 500 mL)
- ✓ 1 cylindre gradué de 50 mL
- ✓ 5 erlenmeyers de 25 mL
- ✓ 30 erlenmeyers de 50 mL (ou 50)
- ✓ Micropipette P1000
- ✓ Microplaque transparente 96 puits à fond plat
- ✓ Pipette Eppendorf de 50 mL
- ✓ Pipette Eppendorf de 12,5 mL
- ✓ tris (hydroxyméthyl)aminométhane
- ✓ caséine (sodium-salt, Sigma C-2649)
- ✓ CCl₃ COOH (TCA)

- ✓ carbonate de sodium
- ✓ copper(II)sulfate pentahydrate
- ✓ sodium potassium tartate ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$)
- ✓ Folin Ciocalteu's phenol reagent
- ✓ Tyrosine

A2-6.3. Préparation des solutions

Préparation des solutions pour deux semaines d'activités enzymatiques pour un total de (30 échantillons + 5 standards)/jour * 5 échantillonnages, (20 échantillons + 5 standards)/jour * 2 échantillonnages et (50 échantillons + 5 standards)/jour * 1 échantillonnage. (Total de 40 standards et 230 échantillons)

A2-6.3.1. Préparation des solutions à l'avance

➤ **Tampon tris (0.05M, pH 8,1) :**

1. Peser 12,12g de tris(hydroxyméthyl)aminométhane dans un bécher de 2L;
2. Ajuster le pH à 8,1 avec 1M HCl;
3. Transférer dans un ballon de 2L et compléter au trait de jauge avec de l'eau déionisée;
4. Répéter les étapes 1 à 4 pour obtenir 4L de tampon Tris;
5. Garder la solution à 4°C.

➤ **Solution d'acide trichloroacétique (TCA, 0,92M) :**

3. Peser 300 g de $CCl_3 COOH$ (TCA) dans un ballon de 2L;
4. Dissoudre et diluer jusqu'au trait de jauge avec de l'eau déionisée.

➤ **Réactif A :**

1. Peser 25 g de carbonate de sodium (anhydre) dans un ballon de 500mL;
2. Ajouter 1 mL de NaOH 3M;
3. Dissoudre dans 300 mL d'eau distillée, ajuster le volume au trait de jauge;
4. Garder la solution à 4°C au maximum 3 semaines.

➤ **Réactif B :**

1. Peser 0.5 g de copper(II)sulfate pentahydrate dans un ballon de 100mL;
2. Dissoudre et diluer avec de l'eau distillée;
3. Garder à 4°C au maximum 3 semaines.

➤ **Réactif C :**

1. Peser 1g de sodium potassium tartate ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$) dans un ballon de 100mL;
2. Dissoudre et diluer avec de l'eau distillée;
3. Garder à 4°C au maximum 3 semaines.

➤ **Réactif de phénol Folin-Ciocalteu pour une analyse et une courbe de calibration :**

1. Pipeter 10 mL de Folin Ciocalteu's phenol reagent (Merck, 9001 ou Sigma F-9252) dans un ballon de 100 mL et diluer avec eau distillée

➤ **Solution standard stock pour une courbe (500 µg de tyrosine/mL):**

1. Peser 50mg de tyrosine dans un ballon de 100mL et dissoudre dans le tampon tris;
2. Si nécessaire, chauffer pour dissolution complète;
3. Ajuster au trait de jauge avec du tampon tris;
4. Garder la solution à 4°C.

A2-6.3.2. Préparation des solutions le jour même

➤ **Solution de substrat pour une analyse et une courbe de calibration (2% w/v) :**

3. Dans un bécher de 250mL, peser 5g de caséine et ajouter du tampon Tris;
4. Ajouter un barreau magnétique puis agiter à l'aide d'une plaque chauffante agitatrice;
5. Mélanger la suspension à 50°C jusqu'à ce que la caséine soit dissoute;
6. Transférer dans un ballon de 250mL et compléter au trait de jauge avec du tampon Tris;
- 7. Préparer, ce réactif la journée même.**

Remarque : Pour la journée à 50 échantillons, préparer 1 solution de 500 mL. (Peser 10 g de caséine dans un bécher de 500 mL)

➤ **Réactif alcali pour une analyse et une courbe de calibration (solution de travail) :**

1. Mélanger 50mL de réactif A (dans un cylindre gradué), 1mL de réactif B (pipette P1000) et 1mL de réactif C (pipette P1000) dans un bécher;
- 2. Préparer cette solution le jour même.**

➤ **Standard de calibration :**

1. Pipeter 0, 0.25, 0.5, 1, 2 et 3 mL de la solution stock dans six erlenmeyers de 25 mL;

2. À l'aide de pipettes Eppendorf de 50 mL et de 12,5 mL, ajuster les volumes à 5 mL avec le tampon tris, (ajouter dans le même ordre que précédemment : 5, 4.75, 4.5, 4, 3, 2mL);
3. À l'aide d'une pipette Eppendorf 50 mL, ajouter 5mL de solution de substrat, puis 5mL de solution TCA.

Les standards de calibration contiennent : 0 (blanc), 100, 250, 500, 1000 et 1500µg de tyrosine.

A2-6.4. Méthode

Les mesures sont effectuées en 4 étapes : 1) Il faut préparer le sol avec le substrat et l'incuber, 2) Préparation du filtrat qui contient le produit de l'activité de la protéase, 3) Traiter le filtrat avec un réactif coloré pour mesure photométrique, 4) Préparation de la courbe de calibration pour effectuer les calculs.

A2-6.4.1. Préparation du sol et incubation avec substrat

1. Peser 1g ($\pm 0,05$) de sol humide dans cinq erlenmeyers de 50 mL (3 échantillons et 2 contrôles);
2. À l'aide d'une pipette Eppendorf de 50 mL, ajouter 5 mL de tampon tris dans tous les erlenmeyers (échantillons + contrôles);
3. À l'aide d'une pipette Eppendorf 50 mL, ajouter 5mL de solution de substrat dans les trois premiers erlenmeyers (échantillons);
4. Agiter les flacons brièvement, sceller avec des « rubber stoppers » et incuber pour **2h à 50°C sur un agitateur rotatif – 100 rpm.**

A2-6.4.2. Préparation du filtrat après incubation

1. Ajouter 5 mL (avec une pipette Eppendorf 50 mL) de TCA dans les cinq erlenmeyers;
2. Ajouter 5 mL (avec une pipette Eppendorf 50 mL) de substrat dans les deux contrôles;
3. Mélanger brièvement;
4. Agiter brièvement, transférer dans des tubes Eppendorf 1,5ml et centrifuger à 20 000g pendant 2 min;

A2-6.4.3. Analyses photométrique du filtrat

1. Pipeter 250 µL (avec micropipette P1000) de filtrat dans un tube Eppendorf 1,5 mL pour centrifugation;
2. Ajouter 750 µL (avec pipette Eppendorf 12,5 mL) de réactif alcali dans les éprouvettes Eppendorf 1,5 mL pour centrifugation;

3. Ajouter 500 μL (avec pipette Eppendorf 12,5 mL) de Folin Ciocalteu's phenol reagent, dans les éprouvettes Eppendorf 1,5 mL pour centrifugation;
4. Centrifuger à nouveau la solution à 20 000 g pendant 2 min (en raison de la formation d'un précipité pour les sols argileux et organiques);
5. Laisser reposer 90 min pour le développement de la couleur;
6. Pipeter 250 μL (avec micropipette P1000) des tubes Eppendorf dans les puits de la microplaque;
7. Dans les prochaine 90 min, mesurer l'extinction des standards, des échantillons et des contrôles contre le blanc à 660 nm.

A2-6.4.4. Courbe de calibration

1. Centrifuger les standards de calibration;
2. Pipeter 500 μL (avec micropipette P1000) de filtrat dans un des puits de la microplaque;
3. Ajouter 750 μL (avec pipette Eppendorf 12,5 mL) de réactif alcali dans les puits de la microplaque;
4. Ajouter 500 μL (avec pipette Eppendorf 12,5 mL) de Folin Ciocalteu's phenol reagent.
5. Centrifuger à nouveau la solution à 20 000 g pendant 2 min (en raison de la formation d'un précipité pour les sols argileux et organiques);
6. Laisser reposer 90 min pour le développement de la couleur;
7. Pipeter 250 μL (avec micropipette P1000) des tubes Eppendorf dans les puits de la microplaque;
8. Dans les prochaine 90 min, mesurer l'extinction des standards, des échantillons et des contrôles contre le blanc à 660 nm.

A2-6.5. Calculs

L'activité de la protéase est exprimée en μg de tyrosine équivalent (tyr) par gramme de matière sèche et temps d'incubation. L'équivalent tyrosine est calculé à partir de la courbe de calibration.

$$\frac{(S-C) \cdot 100}{\% \text{ sol sec}} = \mu\text{g tyr} \cdot \text{g}^{-1} \text{ sol sec} \cdot \text{h}^{-1}$$

S Valeur moyenne des échantillons ($\mu\text{g tyr}$)

C Control ($\mu\text{g tyr}$)

$100 \cdot \%^{-1} \text{ sol sec}$ Facteur pour le sol sec.

A2-6.6. Note

- Il est possible de garder les filtrats à 4°C pendant 5h.
- Si la concentration en tyrosine dépasse la courbe de calibration, réduire le temps d'incubation à 1h.

A2-6.7. Références

Protocole PSO A32. Mesure de l'activité de la protease dans les sols.

Ladd JN, Butler JHA (1972) Short-term assay of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biology and Biochemistry*, 4: 19-39.

Tiré de Schinner et al. 1997.

A2-7. Mesure de l'activité de l'uréase dans un sol (CIRAIG – PE 72G)

A2-7.1. Objectifs

Ce protocole a pour objectif de mesurer le potentiel d'activité enzymatique dans un sol. L'enzyme testée est un représentant du cycle de l'azote. Puisqu'il est très difficile d'extraire et de mesurer les enzymes contenus dans les sols, le principe sur lequel repose le protocole proposé est la mesure du potentiel d'activité enzymatique : on introduit dans un échantillon de sol un substrat ciblé par l'enzyme testé puis on mesure, après une période d'incubation à une température donnée, les produits de la transformation enzymatique.

A2-7.2. Matériel

- ✓ HCl 1M (Anachemia, 46396-460)
- ✓ NaOH 10M (Anachemia, 83076-300)
- ✓ NaOH 3M (Anachemia, 83076-300)
- ✓ 6 ballons de 50 mL
- ✓ 3 ballons de 1 L
- ✓ 3 ballons de 25 mL
- ✓ 3 ballons de 100 mL
- ✓ 5 erlenmeyers de 25 mL
- ✓ 30 erlenmeyers de 50 mL
- ✓ Tubes Eppendorf
- ✓ Pipette Eppendorf de 50 mL
- ✓ Pipette Eppendorf de 12,5 mL
- ✓ Pipettes P20 et multicanaux (model 8800, Nichityo)
- ✓ Pipette graduée de 50 ml
- ✓ Microplaque à fond plat transparente (Costar 96wells, Fisher)
- ✓ Lecteur microplaque (GENios, Tecan)
- ✓ Incubateur tempéré à 37°C
- ✓ Balance $\pm 0,0001$ (Mettler Toledo)
- ✓ Tetraborate de sodium (Anachemia, AC-8262)
- ✓ NH_4Cl (Anachemia, AC-0611)
- ✓ Urée (Anachemia, AC-9700)
- ✓ KCl (Anachemia, 72830-380)

- ✓ salicylate de sodium (JT Baker, 3872-01)
- ✓ sodium nitro-prusside (sodium nitrofericyanide, à 4°C dans dessiccateur) (Sigma, 431451)
- ✓ dichloroisocyanurate de sodium (attention peut brûler, à manipuler avec ventilation, tenir loin du feu) (Sigma, D2536).

A2-7.3. Préparation des solutions

A2-7.3.1 Préparation des solutions à l'avance

Préparation des solutions pour deux semaines d'activités enzymatiques pour un total de (30 échantillons + 5 standards)/jour * 5 échantillonnages, (20 échantillons + 5 standards)/jour * 2 échantillonnages et (50 échantillons + 5 standards)/jour * 1 échantillonnage. (Total de 40 standards et 240 échantillons)

➤ NaOH (3M)

1. Dissoudre 120 g de NaOH dans de l'eau distillée dans un bécher de 1 L
2. Transférer dans un ballon de 1L, et compléter avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

➤ Solution de tampon borate (0,1M, pH10)

1. Dans un bécher de 2L, dissoudre 57,2g de Tetraborate de sodium dans de l'eau déionisée;
2. Chauffer si nécessaire afin d'obtenir une dissolution complète;
3. Refroidir à la température de la pièce et ajuster le pH à 10 avec la solution de NaOH 3M;
4. Transférer dans un ballon de 2L;
5. Ajuster le volume jusqu'au trait de jauge avec de l'eau déionisée.

➤ HCl (1M)

1. Pour la production de 1 L, ajouter 82,5 mL de HCl concentré à 0,5 L d'eau distillée dans un ballon de 1 L;
2. Ajuster au trait de jauge avec de l'eau distillée.

➤ Solution de chlorure de potassium KCl (1M) :

1. Dans un bécher de 2L, dissoudre 149,2 g de KCl dans de l'eau déionisée;
2. À l'aide d'une pipette graduée de 25 ml, ajouter 20 mL d'HCl 1M;
3. Transférer dans un ballon de 2L;
4. Ajuster le volume jusqu'au trait de jauge avec de l'eau déionisée;
5. Répéter les étapes 1 et 4 à une reprise pour obtenir un volume total de 4 L;

6. Garder cette solution quelques semaines seulement.

➤ **Solution de NaOH (0,3M) :**

1. À l'aide d'une P5000, pipeter 2,5 mL de NaOH 3M dans un ballon de 25 mL;
2. Ajuster le volume au trait de jauge avec de l'eau distillée.

➤ **Solution standard stock (1000 μ g NH₄⁺-N ml⁻¹):**

1. Dans un ballon de 1 L, dissoudre 3,8207g de NH₄Cl dans de l'eau distillée et ajuster jusqu'au trait de jauge ;
2. Garder cette solution à 4°C.

A2-7.3.2. Préparation des solutions le jour même

➤ **Solution de substrat pour une analyse et une courbe de calibration (720 mM) :**

1. Dans un ballon de 50 mL, dissoudre 2,16 g d'*urée* dans le tampon borate (0,1M, pH10);
2. **Préparer ce réactif le jour même.**

➤ **Solution de Salicylate de sodium pour une analyse et une c. c. (1,06M) :**

1. Dissoudre 4,25 g de *salicylate de sodium* dans un ballon de 25 mL;
2. Ajouter 30 mg de *sodium nitro-prusside*;
3. Ajuster jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée;
4. **Préparer juste avant de l'utiliser.**

➤ **Réactif A (à préparer pendant l'incubation):**

1. Dans un bécher de 100 mL, mélanger 2,5 mL de NaOH 3M, 25 mL de solution de salicylate de sodium et 47,5 mL d'eau distillée;
2. **Préparer ce réactif juste avant l'usage.**

➤ **Réactif B : Solution de dichloroisocyanurate pour une analyse et une c. c. (39,1 mM), à préparer pendant l'incubation :**

1. Dans un ballon de 25 mL, dissoudre 25 mg de *dichloroisocyanurate de sodium* dans de l'eau distillée et ajuster au trait de jauge;
2. **Préparer ce réactif le jour même.**

➤ **Standards de calibration :**

1. Avec une pipette Eppendorf de 12,5 mL, pipeter 0 (blanc), 0.5, 0.75, 1 et 1.25mL de solution stock dans des ballons de 50 mL ;
2. Ajuster le volume au trait de jauge avec la solution de chlorure de potassium.

Les standards contiennent 0, 10, 15, 20 et 25 $\mu\text{g NH}_4^+-\text{N mL}^{-1}$.

A2-7.4. Méthodologie

Les mesures sont effectuées en 4 étapes : 1) Il faut préparer le sol avec le substrat et l'incuber, 2) Préparation du filtrat qui contient le produit de l'activité de l'uréase, 3) Traiter le filtrat avec un réactif coloré pour mesure photométrique, 4) Préparation de la courbe de calibration pour effectuer les calculs.

A2-7.4.1. Préparation du sol et incubation avec substrat

1. Peser 1g ($\pm 0,05$ g) de sol humide dans 5 erlenmeyers de 50 mL (3 échantillons et 2 contrôles);
2. Avec une pipette Eppendorf de 50ml, ajouter 4mL de tampon borate dans tous les erlenmeyers;
3. Avec une pipette Eppendorf de 12,5 mL, ajouter 500 μL de la solution de substrat dans trois erlenmeyers (échantillons);
4. Agiter brièvement, sceller et incuber pour **2h à 37°C**.

A2-7.4.2. Préparation du filtrat après incubation

1. À l'aide d'une pipette Eppendorf de 50 mL, ajouter 6mL de solution de chlorure de potassium dans tous les erlenmeyers et mélanger pendant 30 minutes sur un agitateur rotatif à une vitesse de 100 rpm;
2. Après agitation, ajouter pipette Eppendorf de 12,5 mL (*position 2*), 500 μL de substrat dans les contrôles;
3. Transférer le surnageant dans des tubes Eppendorf de 2mL;
4. Centrifuger à 20 000g pendant 2 min.

A2-7.4.3. Analyses photométriques des échantillons

1. Pipeter 20 μL avec une micropipette P20 d'échantillons dans les puits de la microplaque;
2. Ajouter, à l'aide d'une pipette multicanaux, 180 μL d'eau distillée dans les puits;
3. Ajouter, à l'aide d'une pipette multicanaux, 100 μL du réactif A dans les puits;

4. Ajouter, à l'aide d'une pipette multicanaux, 40 µL de réactif B (solution de dichloroisocyanurate) dans les puits;
5. Laisser décanter pendant 30 minutes à la température ambiante;
6. Lecture à 685 nm.

A2-7.4.4. Courbe de calibration

1. Pipeter 20 µL avec une micropipette P20 des standards dans les puits de la microplaque;
2. Ajouter, à l'aide d'une pipette multicanaux, 180 µL d'eau distillée dans les puits;
3. Ajouter, à l'aide d'une pipette multicanaux, 100 µL du réactif A dans les puits;
4. Ajouter, à l'aide d'une pipette multicanaux, 40 µL de réactif B (solution de dichloroisocyanurate) dans les puits;
5. Laisser décanter pendant 30 minutes à la température ambiante;
6. Lecture à 685 nm.

Les standards de calibration contiennent maintenant 0, 1, 1.5, 2 et 2.5 µg NH₄⁺-N ml⁻¹.

A2-7.5. Calculs

Calculer les concentrations à partir de la courbe de calibration

$$\frac{(S-C) \cdot D}{\% \text{ du poids sec}} = \mu\text{g N} \cdot \text{g sol sec}^{-1} \cdot 2\text{h}^{-1}$$

- | | |
|---|---|
| S | valeur moyenne des échantillons (µg N ml ⁻¹) |
| C | valeur moyenne des contrôles (µg N ml ⁻¹) |
| D | volume de l'extrait = 10,5 |
| 1 | poids initial du sol humide (g) |

A2-7.6. Notes

- Si nécessaire les filtrats peuvent être entreposés pendant une nuit à 4°C
- La courbe de calibration est linéaire jusqu'à 3.5 µg N·ml⁻¹. Si l'intensité de la couleur des filtrats n'est pas dans cette limite, ils doivent être dilués avec de l'eau distillée.
 - Le complexe coloré est stable pendant 8 heures.

A2-7.7. Références

Protocole PSO A30. Mesure de l'activité de l'uréase dans les sols.

A2-8. Mesure de l'activité de l'arylsulfatase dans un sol (CIRAIG – PE 72H)

A2-8.1. Objectifs

Ce protocole a pour objectif de mesurer le potentiel d'activité enzymatique dans un sol selon la procédure de (Tejada *et al.*, 2006). L'enzyme testé est un représentant du cycle du soufre. Puisqu'il est très difficile d'extraire et de mesurer les enzymes contenus dans les sols, le principe sur lequel repose ce protocole est la mesure du potentiel d'activité enzymatique : on introduit dans un échantillon de sol un substrat ciblé par l'enzyme testé puis on mesure, après une période d'incubation à une température donnée, les produits de la transformation enzymatique.

A2-8.2. Matériel

- ✓ Incubator shaker (New Brunswick scientific, Innova 4000, U.S.A);
- ✓ Centrifugeuse sur table (IEC);
- ✓ Lecteur microplaque (GENios, Tecan);
- ✓ pH-mètre (Accumet, modèle 25, pH/ionmeter);
- ✓ Balance précision 0,0001 (Mettler toledo, AB204, Switzerland);
- ✓ Balance précision 0,01 (Mettler toledo);
- ✓ 30 erlenmeyers de 50mL (ou 50);
- ✓ 6 erlenmeyers de 25 mL;
- ✓ 3 ballons et béchers de 2L;
- ✓ 2 ballons de 1L;
- ✓ 2 ballons de 50 ml;
- ✓ 1 microplaque transparente 96 puits à fond plat;
- ✓ Micropipette P1000, P5000 et embouts;
- ✓ Dispensettes graduées de 1 et 10mL;
- ✓ Dispensette multichannel (Nichiryo, model 8800)
- ✓ Bouteille ambrée de 1L;
- ✓ Tubes Eppendorf de 2mL;
- ✓ Acétate de sodium trihydrate (Anachemia, 79948-300);
- ✓ Acide acétique concentré (Fisher, UN-2789);
- ✓ *Potassium-p-nitrophenylsulfate* (Sigma, N-3877);
- ✓ NaOH (Anachemia, AC-8370);
- ✓ Chlorure de calcium (Anachemia, 18711-300);

✓ *p*-nitrophenol (Anachemia, 63802-100).

A2-8.3. Préparation des solutions

A2-8.3.1. Préparation des solutions à l'avance

Préparation des solutions pour deux semaines d'activités enzymatiques pour un total de (30 échantillons + 5 standards)/jour * 5 échantillonnages, (20 échantillons + 5 standards)/jour * 2 échantillonnages et (50 échantillons + 5 standards)/jour * 1 échantillonnage. (Total de 40 standard et 240 échantillons)

➤ Tampon Acétate (0.5 M, pH 5.8) :

1. Dans un bécher de 2L, dissoudre 128 g d'acétate de *sodium trihydrate* dans 1700mL d'eau déionisée;
2. Ajuster le pH à 5.8 avec approximativement 2mL d'acide acétique concentré pipeté goutte à goutte avec une pipette pasteur en agitant avec un barreau magnétique et en suivant l'évolution du pH avec le pH-mètre;
3. Transférer dans un ballon de 2 L et compléter jusqu'au trait de jauge.

➤ Solution de Chlorure de calcium CaCl₂ (0,5M)

1. Dans un ballon de 1 L, peser 73, 48 g de CaCl₂ dihydrate;
2. Ajuster au trait de jauge avec de l'eau distillée.

ATTENTION aux bulles quand on ajoute l'eau, il y a du chlore qui se libère, alors faire le mélange sous une hotte.

➤ Solution d'hydroxyde de sodium (0.5M) :

1. Peser 40g de *NaOH* dans un bécher de 2 L;
2. Mélanger avec de l'eau distillée;
3. Transvider le contenu de la cupule dans un ballon de 2L et ajouter de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge;
4. Répéter les étapes 1 et 3 à une reprise pour obtenir un volume total de 4 L.

➤ Solution standard stock (1mg *p*-nitrophenol·ml⁻¹): même que pour phosphatase

1. Peser 1g de *p*-nitrophenol dans une cupule de plastique ;
2. Transvider le contenu de la cupule dans un ballon de 1L ;
3. Ajuster le volume au trait de jauge avec de l'eau distillée ;

4. Garder cette solution à 4°C dans un contenant ambré.

A2-8.3.2. Préparation des solutions le jour même

➤ **Solution de substrat pour une analyse et une courbe de calibration (0.02M) :**

1. Peser 257,5 mg de *potassium-p-nitrophenylsulfate* dans un ballon de 50mL;
Le potassium p-nitrophenylsulfate est stocké au congélateur.
2. Diluer dans le tampon acétate et ajuster le volume au trait de jauge à 50mL avec le tampon;

3. Préparer la solution le jour même.

ATTENTION : le substrat est sensible à la lumière et à la température.

Remarque : Pour la journée à 50 échantillons, préparer 1 solution de 100 mL. (Peser 515 mg de potassium p-nitrophenylsulfate dans un bécher de 100 mL)

➤ **Standard de travail pour une courbe de calibration (0.1mg p-nitrophenol-mL-1) :**

1. Pipeter 5 mL avec une micropipette P5000 de la solution stock dans un ballon de 50mL ;
2. Ajuster le volume au trait de jauge avec de l'eau distillée ;
3. Transvider dans un bécher ;
4. **Préparer la solution le jour même.**

➤ **Standard de calibration :**

1. Pipeter avec la pipette Eppendorf 50 mL (blanc) 0, 1, 2, 3, 4, 5mL du standard de travail dans des erlenmeyers de 25mL ;
2. Ajuster les volumes à 5mL avec de l'eau distillée en pipetant avec une pipette Eppendorf 50 mL dans le même ordre qu'au point précédent 5, 4, 3, 2, 1 et 0mL ;
3. Avec une dispensette de 1 mL, ajouter 1mL de CaCl₂ (0,5M) ;
Il est important d'ajouter le CaCl₂ avant le NaOH.
4. Avec une dispensette de 10 mL, ajouter 10mL d'une solution d'hydroxyde de sodium (0,5M). ;
5. Transférer dans les tubes Eppendorf 2mL et centrifuger à 20000g pendant 2min.

Les standards de calibration contiennent 0, 6.25, 12.5, 18.75, 25 et 31.25 µg de p-nitrophenol par mL.

A2-8.4. Méthodologie

Les mesures sont effectuées en quatre étapes :

1) Préparer les échantillons de sol avec le substrat et les incuber durant 2 heures à 37°C) Préparer le filtrat qui contient le produit de l'activité de l'arylsulfatase, 3) Traiter le filtrat avec un réactif coloré pour mesure photométrique, 4) Préparer la courbe de calibration pour effectuer les calculs.

A2-8.4.1. Préparation du sol et incubation avec substrat

1. Peser 1g ($\pm 0,05$ g) de sol humide dans cinq erlenmeyers de 50mL ;
2. Avec une pipette Eppendorf de 50 mL, ajouter 4mL du tampon acétate dans chaque erlenmeyer ;
3. Avec une pipette Eppendorf de 50 mL, ajouter 1mL de la solution de substrat dans les trois premiers erlenmeyers (échantillons) ;
4. Agiter brièvement et mettre les échantillons dans l'incubateur et **incuber pendant 2h à 37°C.**

A2-8.4.2. Préparation du filtrat après incubation

1. Avec une dispensette de 1 mL, ajouter 1mL de chlorure de calcium (0.5M) dans tous les erlenmeyers ;

ATTENTION il est très important d'ajouter le CaCl_2 avant le NaOH.

2. Avec une dispensette de 10 mL, ajouter 10mL de NaOH (0,5M) dans tous les erlenmeyers ;
3. Avec une pipette Eppendorf de 50 mL, ajouter 1mL de solution substrat correspondant dans les contrôles ;
4. Agiter les erlenmeyers ;
5. Transférer dans les tubes Eppendorf de 2mL et centrifuger à 20000g pendant 2min ;
6. Avec une P1000, prélever 250 μL d'échantillons et transférer sur une microplaque de 96 puits.

A2-8.4.3. Analyses photométrique du filtrat Analyses photométrique du filtrat

1. Mesurer l'extinction en absorbance à **420nm** avec un lecteur microplaque contre le blanc.

A2-8.5. Calculs

Calculer les concentrations of p-nitrophenol (pNP) à partir des courbes de calibration.

$$\frac{(S-C) \cdot 16 \cdot 100}{\% \text{ sol sec}} = \mu\text{g pNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{ sol sec} \cdot \text{h}^{-1}$$

S	valeur moyenne des échantillons ($\mu\text{g pNP}$)
C	valeur moyenne des contrôles ($\mu\text{g pNP}$)
16	volume de l'extrait (mL)
100 / % ms	facteur pour matière sèche.

A2-8.6. Notes

- Le substrat est sensible à la chaleur et à la lumière, les flacons doivent être recouverts d'aluminium.
- Mesurer l'extinction dans les 6 premières heures.
- La courbe de calibration est linéaire jusqu'à 120 $\mu\text{g p-nitrophenol}$

A2-8.7. Références

PSO A31 – Mesure de l'activité de l'arylsulfatase dans un sol.

ANNEXE 3 – Courbes de suivis enzymatiques

Dans cette annexe, sont présentées les courbes d'activités enzymatiques ne figurant pas dans les deux chapitres 4 et 5.

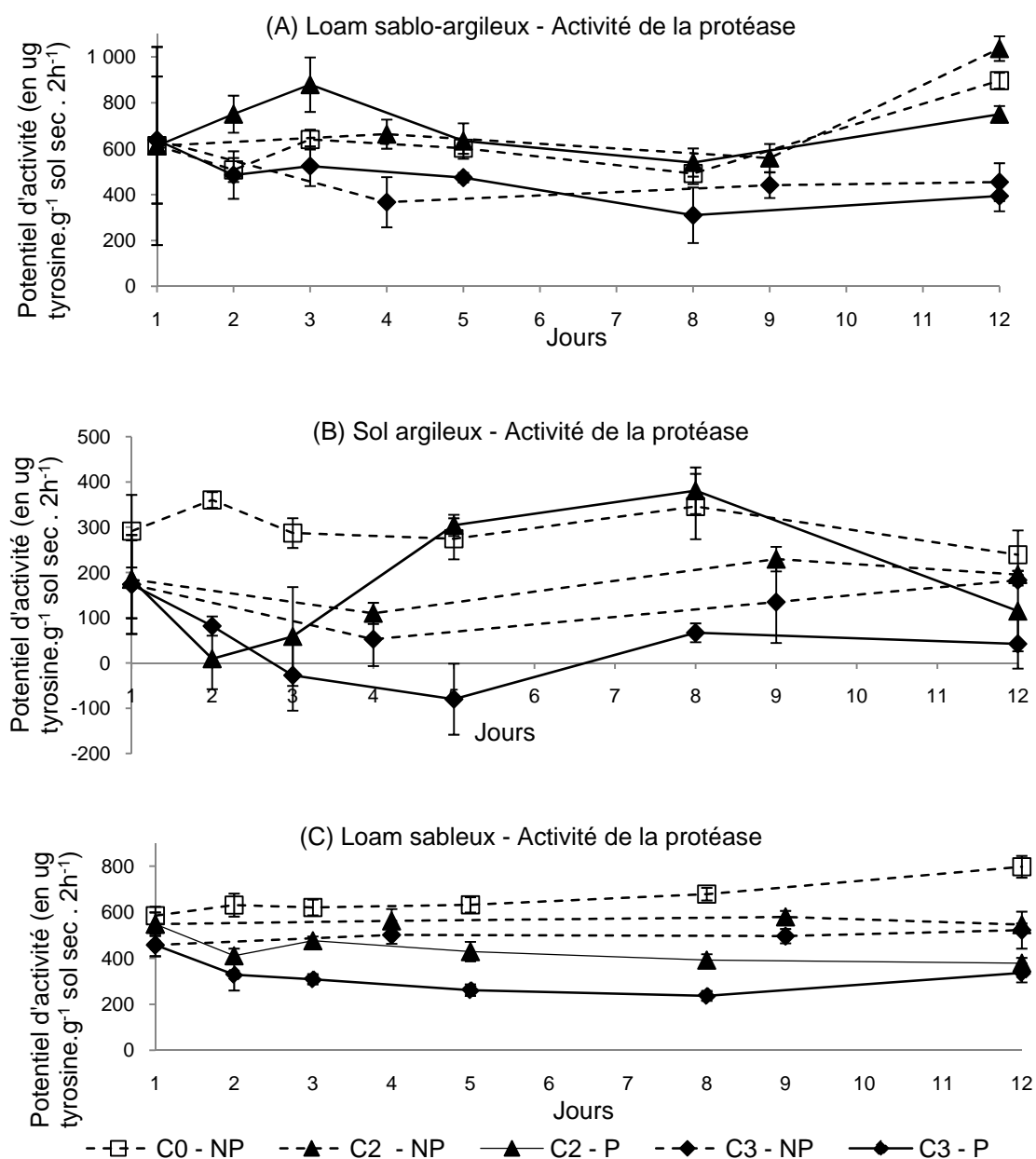


Figure A.3- 1 : Suivi du potentiel enzymatique de la protéase dans des sols perturbés par la chaleur (lignes pleines) et non perturbés (lignes discontinues) pour les sols contaminés aux niveaux C₂ et C₃ dans le loam argilo-sableux (A), l'argile (B) et le loam sableux (C). Les flèches

indiquent le jour où la perturbation a été appliquée (jour 2). Valeurs moyennes représentées avec écart-type ($n = 3$).

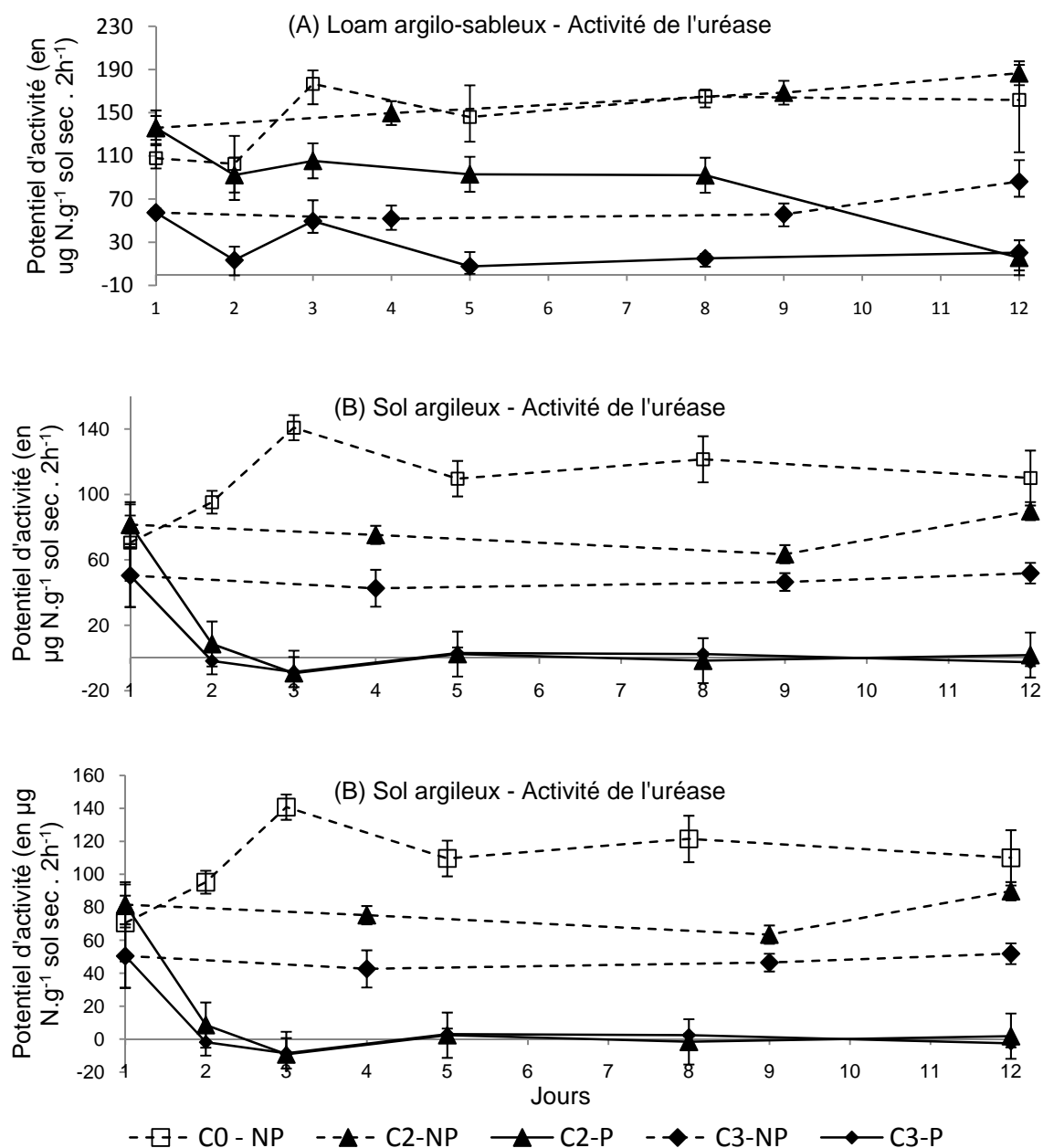


Figure A.3- 2 : Suivi du potentiel enzymatique de l'uréase dans des sols perturbés par la chaleur (lignes pleines) et non perturbés (lignes discontinues) pour les sols contaminés aux niveaux C₂ et C₃ dans le loam argilo-sableux (A), l'argile (B) et le loam sableux (C). Les flèches indiquent le jour où la perturbation a été appliquée (jour 2). Valeurs moyennes représentées avec écart-type ($n = 3$).

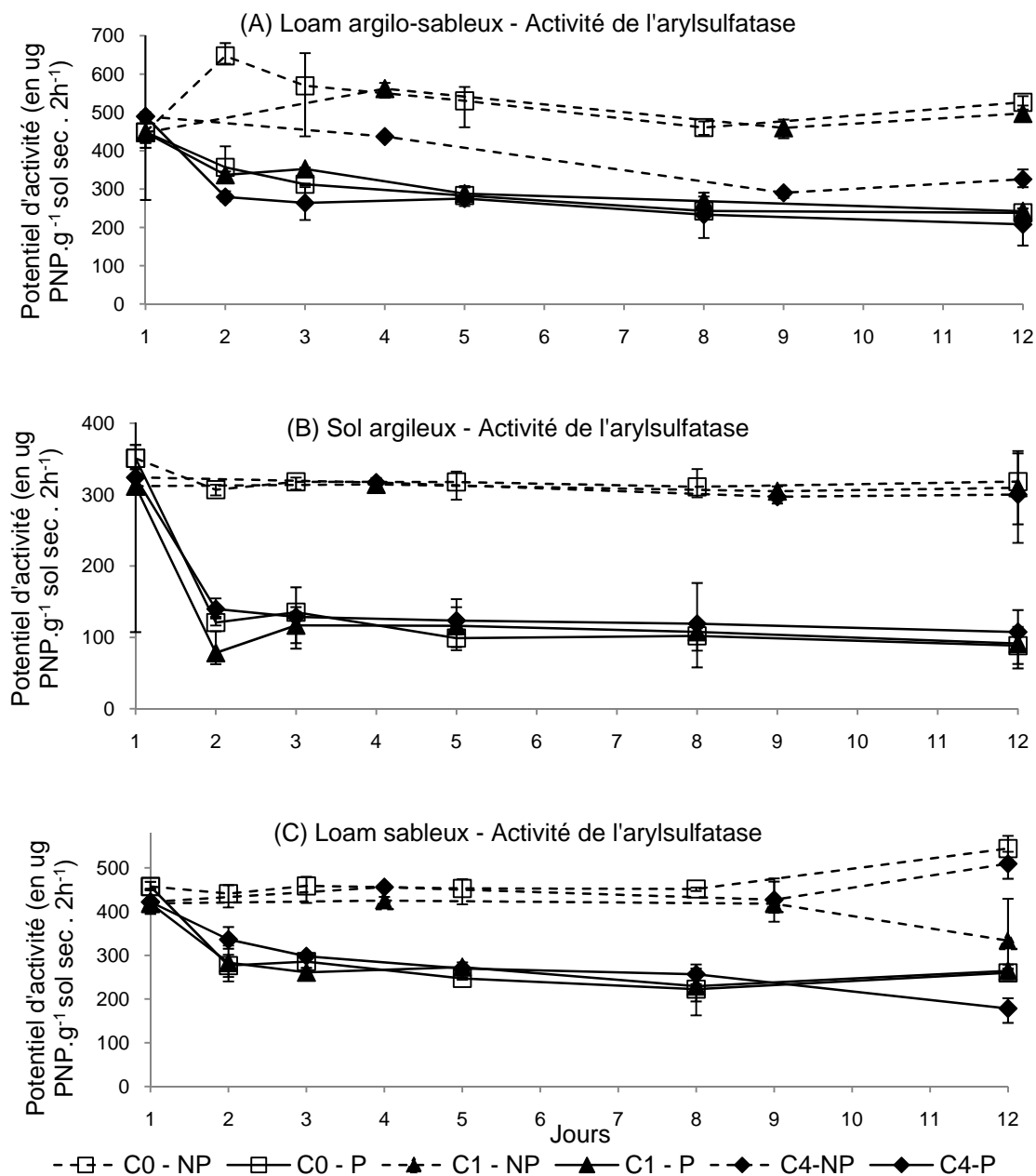


Figure A.3- 3 : Suivi du potentiel enzymatique de l'arylsulfatase dans des sols perturbés par la chaleur (lignes pleines) et non perturbés (lignes discontinues) pour les sols contaminés aux niveaux C₀, C₁ et C₄ dans le loam argilo-sableux (A), l'argile (B) et le loam sableux (C). Les flèches indiquent le jour où la perturbation a été appliquée (jour 2). Valeurs moyennes représentées avec écart-type (n = 3).

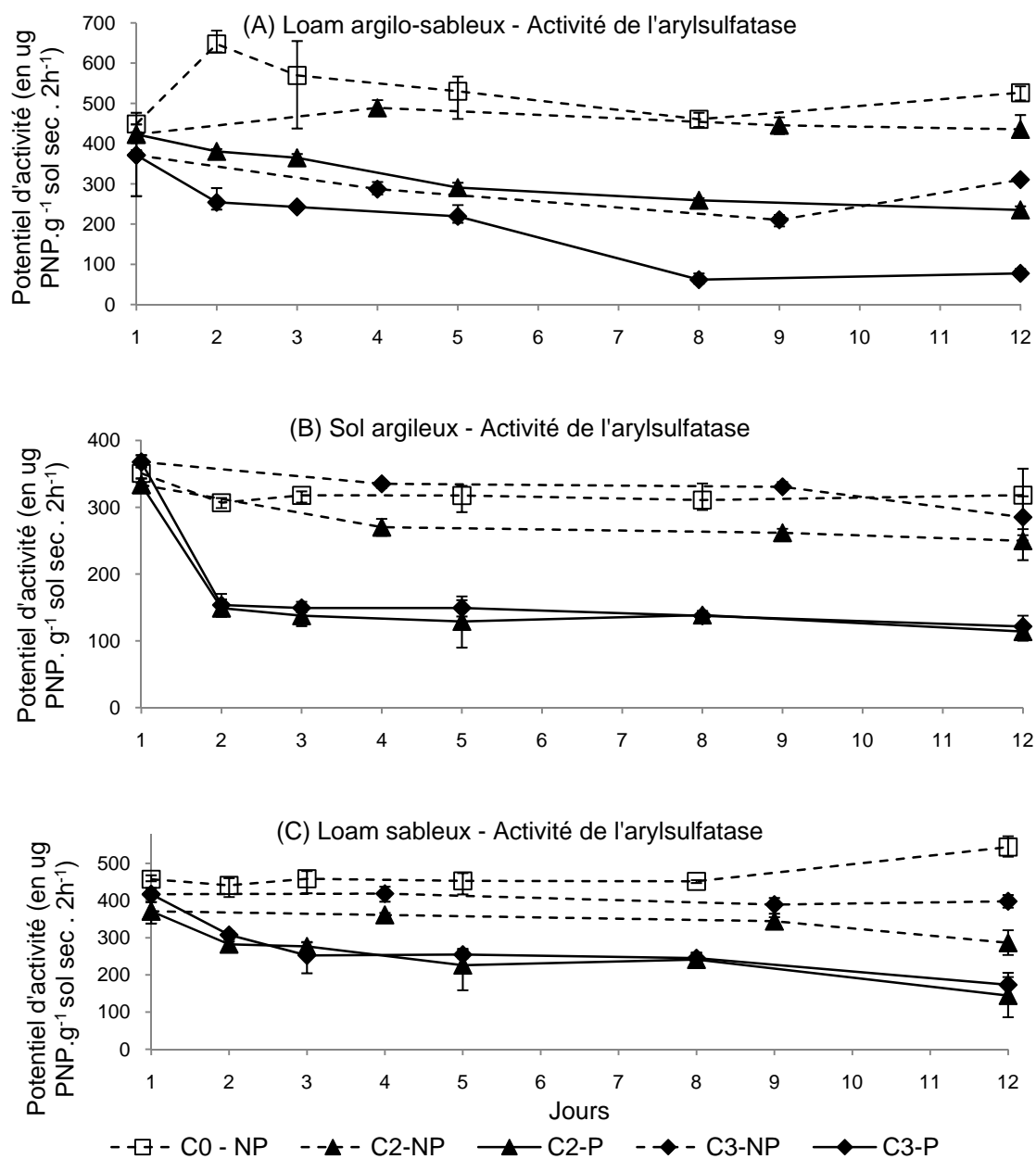


Figure A.3- 4 : Suivi du potentiel enzymatique de l'arylsulfatase dans des sols perturbés par la chaleur (lignes pleines) et non perturbés (lignes discontinues) pour les sols contaminés aux niveaux C₂ et C₃ dans le loam argilo-sableux (A), l'argile (B) et le loam sableux (C). Les flèches indiquent le jour où la perturbation a été appliquée (jour 2). Valeurs moyennes représentées avec écart-type (n = 3).

ANNEXE 4 – Régressions statistiques

Cette Annexe est un complément aux résultats du Chapitre 5. Dans cette annexe, sont présentés les résultats de l'analyse de covariance obtenue pour l'uréase.

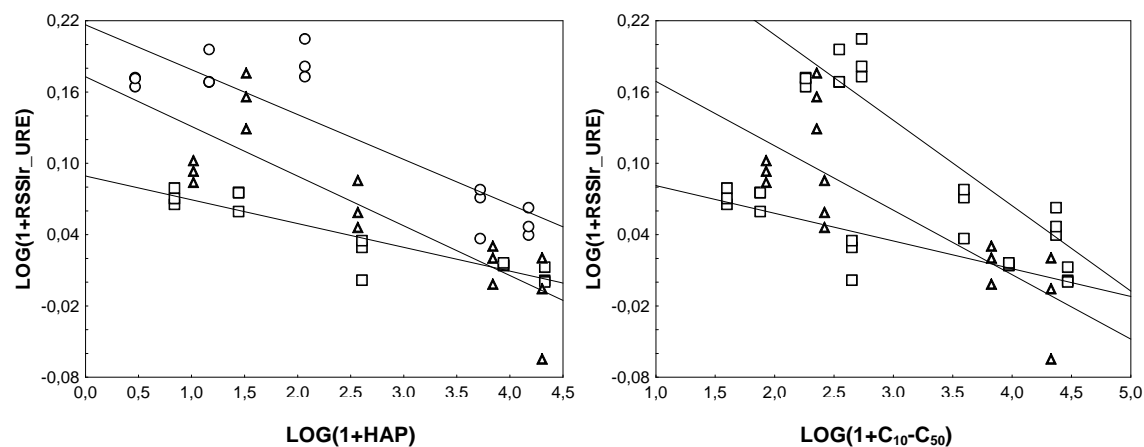


Figure A.4-1 : Variation des valeurs RSSIr en fonction des concentrations en créosote (exprimées en HAP et $\text{C}_{10}\text{-C}_{50}$) pour l'enzyme uréase dans le loam argilo-sableux (cercles), le sol argileux (carrés) et le loam sableux (triangles); les concentrations en HAP sont exprimées en mg total de HAP. kg^{-1} sol sec et celles en $\text{C}_{10}\text{-C}_{50}$ en mg total $\text{C}_{10}\text{-C}_{50}$. kg^{-1} sol sec ($n=3$).

ANNEXE 5 – Établissement de courbes dose-réponse

Cette annexe présente des courbes dose-réponse obtenues à partir des résultats du Chapitre 5. Les doses de créosote ont été exprimées en concentrations de HAP théoriques (mg HAP.kg⁻¹.sol sec) et la réponse représente l'inhibition de la stabilité enzymatique fonctionnelle mesurée via le RSSIr (en %)

A5-1. Calcul de l'inhibition de la stabilité enzymatique

$$\text{Inhibition du RSSIr} = 1 - \frac{\text{RSSIr du sol contaminé}}{\text{RSSIr du sol de référence}}$$

- ❖ Courbes dose-réponse obtenues avec les valeurs RSSIr de la protéase obtenues au Chapitre 4 :

A5-2. Courbes dose-réponse obtenues avec les valeurs RSSIr de la protéase obtenues au Chapitre 4 :

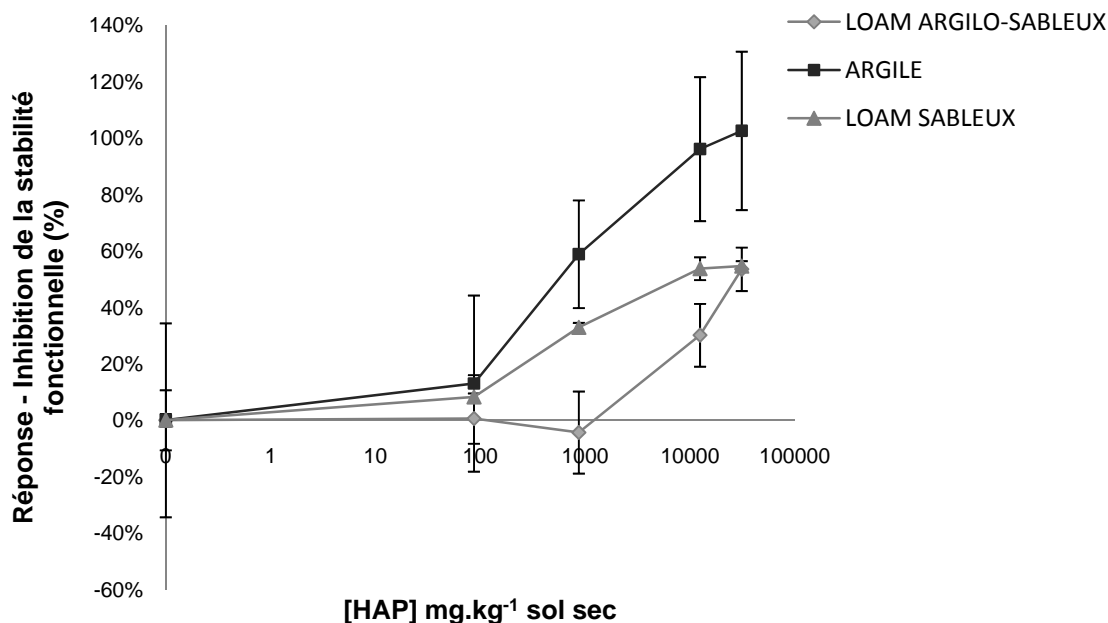


Figure A.5- 1 : Réponse de l'inhibition de l'outil RSSIr en fonction des niveaux de contamination de créosote; l'axe des abscisses a été transformé en échelle logarithmique.

ANNEXE 6 – Étapes de calculs et incertitudes

A6-1. Étape 1 : Les potentiels d'activités enzymatiques

Les potentiels d'activités enzymatiques sont exprimées en concentrations normalisées et sont déterminés, à partir de valeurs d'absorbance, et normalisés selon deux heures d'incubation et la quantité de sol sec, comme précisé dans les protocoles expérimentaux (voir Annexe 2, Sections A2-6, A2-7 et A2-8).

Équation A6-1 : Calcul du potentiel d'activité enzymatique

$$\frac{(S - C). D}{\% \text{ du poids sec}} = \mu g \text{ produit. } g \text{ sol sec}^{-1}. 2h^{-1}$$

Avec:

S	valeur moyenne des échantillons (μg produit ml^{-1})
C	valeur moyenne des contrôles (μg produit ml^{-1})
D	volume de l'extrait ml

Les incertitudes sur ces potentiels d'activités enzymatiques sont calculées par l'écart-type selon le nombre d'échantillons disponibles.

$$\Rightarrow AE_{\text{moyen}}, ECARTYPE(AE_1, AE_2, AE_3)$$

A6-2. Étape 2 : Calcul des aires sous les courbes

Les aires sous chacune des courbes de potentiel d'activité enzymatiques sont calculées par la méthode des rectangles. Celles-ci sont déterminées et calculées sur une même ligne correspondant à la position de l'échantillon lors des pratiques expérimentales de mesure de potentiel d'activités enzymatique (voir Tableau A-6.1).

$$\Rightarrow \text{Aires sous les courbes de suivi enzymatique}$$

A6-3. Étape 3 : Calcul des RSSI ou RSSIr

Suite aux calculs des aires, les valeurs de RSSI et RSSIr sont également calculées par ligne correspondant à la position de l'échantillon lors des pratiques expérimentales de mesure de potentiel d'activités enzymatique. La valeur de RSSI est obtenue en réalisant le ratio entre l'aire sous la courbe du sol perturbé avec celle sous la courbe du sol non perturbé. De manière similaire, la valeur de RSSIr est obtenue en réalisant le ratio entre l'aire sous la courbe du sol perturbé avec celle sous la courbe du sol de référence (non perturbé, non contaminé).

Équation A-6.2 : Calcul du RSSI par le ratio des aires

$$RSSI = \frac{\text{Aire sous la courbe du sol perturbé}}{\text{Aire sous la courbe du sol non perturbé}}$$

Équation A-6.3 : Calcul du RSSIr par le ratio des aires

$$RSSIr = \frac{\text{Aire sous la courbe du sol perturbé}}{\text{Aire sous la courbe du sol non perturbé}}$$

⇒ **RSSI, RSSIr**

Tableau A-6.1 : Exemple type de suivi (si 3 échantillons)

	Échantillon	Suivi du potentiel d'activité enzymatique						Aire sous la courbe	RSSIr
		Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 5	Jour 8	Jour 12		
Sol de référence (non contaminé, non perturbé)	1	AE ₁	AE ₁	AE ₁	AE ₁	AE ₁	AE ₁	Aire 1	-
	2	AE ₂	AE ₂	AE ₂	AE ₂	AE ₂	AE ₂	Aire 2	-
	3	AE ₃	AE ₃	AE ₃	AE ₃	AE ₃	AE ₃	Aire 3	-
Sol perturbé	1	AE-P ₁	AE-P ₁	AE-P ₁	AE-P ₁	AE-P ₁	AE-P ₁	Aire-P 1	RSSIr-1
	2	AE-P ₂	AE-P ₂	AE-P ₂	AE-P ₂	AE-P ₂	AE-P ₂	Aire-P 2	RSSIr-2
	3	AE-P ₃	AE-P ₃	AE-P ₃	AE-P ₃	AE-P ₃	AE-P ₃	Aire-P 3	RSSIr-3

A6-4. Étape 4 : Calcul de la moyenne des RSSI ou RSSIr et de l'incertitude relative sur ces moyennes

La moyenne de RSSI ou RSSIr est effectuée sur le nombre d'échantillons pour chacun des sols. Les incertitudes sur ces deux paramètres sont déterminées par le calcul de l'erreur relative sur les mesures.

Équation A-6.4 : Calcul des incertitudes (erreurs relatives) pour le RSSIr

$$RSSIr = \frac{Ecartype(Aire - P1; Aire - P2; Aire - P3)}{Moyenne (Aire - P1; Aire - P2; Aire - P3)} + \frac{Ecartype(Aire - 1; Aire - 2; Aire - 3)}{Moyenne (Aire - 1; Aire - 2; Aire - 3)}$$

⇒ **RSSI_{moyen}, ERREUR RELATIVE(RSSI₁, RSSI₂, RSSI₃)**

⇒ **RSSIr_{moyen}, ERREUR RELATIVE(RSSIr₁, RSSIr₂, RSSIr₃)**