

**Titre:** Spéciation, bioconcentration et toxicité du mercure dans des sols contaminés provenant d'usines chlore-alkali  
Title: contaminés provenant d'usines chlore-alkali

**Auteur:** Carmen-Mihaela Caras  
Author:

**Date:** 2003

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Caras, C.-M. (2003). Spéciation, bioconcentration et toxicité du mercure dans des sols contaminés provenant d'usines chlore-alkali [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/7235/>  
Citation:

## Document en libre accès dans PolyPublie

Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/7235/>  
PolyPublie URL:

**Directeurs de recherche:** Gérald J. Zagury, & Louise Deschênes  
Advisors:

**Programme:** Non spécifié  
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

SPÉCIATION, BIOCONCENTRATION ET TOXICITÉ DU MERCURE DANS  
DES SOLS CONTAMINÉS PROVENANT D'USINES CHLORE-ALKALI

CARMEN - MIHAELA CARAS  
DÉPARTEMENT DES GÉNIES CIVIL, GÉOLOGIQUE ET DES MINES  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE MINÉRAL)  
NOVEMBRE 2003



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* Votre référence

ISBN: 0-612-89187-9

*Our file* Notre référence

ISBN: 0-612-89187-9

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this dissertation.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the dissertation.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de ce manuscrit.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

# Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

SPÉCIATION, BIOCONCENTRATION ET TOXICITÉ DU MERCURE DANS  
DES SOLS CONTAMINÉS PROVENANT D'USINES CHLORE-ALKALI

présenté par : CARAS Carmen - Mihaela  
en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées  
a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

Mme MILLETTE Louise, Ph.D., présidente  
M. ZAGURY Gérald, Ph.D., membre et directeur de recherche  
Mme DESCHÈNES Louise, Ph.D., membre et codirectrice de recherche  
M. SAUVÉ Sébastien, Ph.D., membre

## CITATION

«L’homme compte sur le mercure pour améliorer son bien-être. Dans la manipulation et l’emploi du mercure ou de ses composés, il en a égaré des doses impressionnantes [...] À Minamata, au Japon, les hommes ont découvert avec stupeur que le mercure, sous sa forme organique, pouvait réduire les humains à l’état de loque et, bien souvent, les tuer. La maladie provoquée par le mercure organique porte désormais le nom de « Maladie de Minamata ».

L’omniprésence de la mort dans l’ère moderne nous a, d’une certaine manière, blindés contre cette réalité. Entre la mort naturelle et celles provoquées artificiellement par les hommes, on ne fait plus la différence. Outre la guerre, les humains ont introduit dans leur milieu d’autres sources d’anéantissement, comme la pollution par exemple. Et on a tenu pour acquis que cette nouvelle façon de mourir était aussi inévitable que la guerre ou les épidémies. Alors, le mercure, lui qui a laissé à peine un millier de cadavres « officiels » dans son sillage depuis le début du siècle ...

Pourtant il faut se secouer et ouvrir grand les yeux.»

(Dossier Mercure. De Minamata à Matagami, Elliott *et al.*, 1976)

## REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à adresser mes plus sincères remerciements à M. Gérald J. Zagury, qui est la personne avec laquelle, d'un point de vue professionnel, j'ai beaucoup appris. Il fut toujours prêt à partager son savoir, toujours disponible pour donner des suggestions constructives et il a consacré de nombreuses heures à l'élaboration du présent projet.

Mes remerciements vont également à ma codirectrice de recherche Mme Louise Deschênes pour son appui et ses commentaires toujours appréciés.

Je voudrais témoigner ma profonde reconnaissance à M. Réjean Samson pour la confiance qu'il m'a accordée et pour m'avoir permis d'étudier dans le cadre de la chaire en m'offrant la possibilité de réaliser ce travail.

J'aimerais exprimer mes vifs remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet et particulièrement à Manon, Lucie, Cécile et Geneviève pour m'avoir encadrée et soutenue tout au long de cette expérience tout aussi intéressante qu'enrichissante. À toutes les autres personnes de la chaire qui m'ont apporté leur aide ou leur soutien, je tiens à leur offrir toute ma gratitude.

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un projet industriel effectué en collaboration avec les compagnies Solvay, Belgique et Total Fina Elf, France. Je voudrais les remercier pour leur soutien financier qui a rendu possible la réalisation du présent projet.

Plusieurs analyses ont été réalisées dans divers laboratoires dont ceux de l'École Polytechnique. Je voudrais remercier surtout le laboratoire Philip Corporation et le Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec ainsi que tous les partenaires de la Chaire qui ont contribué à la réalisation de ce projet.

Je tiens à remercier énormément Silviu, mon mari, de m'avoir encouragée à étudier et de m'avoir offert un environnement propice à cela.

Enfin, je ne voudrais pas oublier les membres de ma famille ainsi que mes amis qui ont su m'encourager tout au long de ce travail.

## RÉSUMÉ

Le présent projet porte sur la spéciation et la toxicité du mercure (Hg) dans des sols prélevés à proximité d'usines chlore-alkali.

Le Hg est un métal particulier avec une toxicité redoutable. Comme c'est le cas pour d'autres métaux, sa toxicité est liée à sa spéciation. Sous la forme inorganique, généralement majoritaire dans une matrice, le  $Hg^{2+}$  a une toxicité similaire aux autres métaux traces bivalents. Par contre les composés organiques, dont les composés organiques alkylés les plus simples (méthyl-mercure et diméthyl-mercure), sont au moins d'un ordre de grandeur plus biodisponibles et donc plus toxiques. De plus, il est difficile de prédire le devenir du Hg et ses effets toxiques dans des sols contaminés, car sa spéciation est liée aux caractéristiques physico-chimiques du sol et au vieillissement de la contamination, rendant son comportement différent dans chaque type de sol.

Le problème de la détermination de la spéciation représente donc une des plus importantes étapes dans l'évaluation du potentiel毒ique d'un sol contaminé par le Hg. Mais à cause du fait qu'il n'y a pas encore de méthode standardisée, le problème n'est toujours pas résolu. De la même façon, la toxicité du Hg est connue pour certaines espèces chimiques prises individuellement (ex.  $HgCl_2$ ,  $CH_3HgCl$ ) mais elle est beaucoup plus difficile à évaluer pour des sols industriels contaminés.

Ainsi, les deux objectifs principaux de la présente étude sont de : 1) déterminer la spéciation du Hg dans des sols contaminés suite à l'activité d'usines chlore-alkali à l'aide d'exactions sélectives et d'une procédure d'extraction séquentielle appropriée et 2) évaluer la relation entre la spéciation du Hg dans le sol, la teneur dans les tissus des organismes exposés et la réponse écotoxicologique.

Pour répondre à ces objectifs, une revue de littérature a été réalisée, comprenant une revue des méthodes de détermination de la forme chimique et une sélection des organismes cibles pour les tests écotoxicologiques. Trois échantillons de sols contaminés au Hg ont été prélevés aux Pays-Bas, en Belgique et en France et fournis à la Chaire Industrielle CRSNG en Assainissement et Gestion des Sites Contaminés par les compagnies Solvay et Total Fina Elf. Ces sols ont d'abord été caractérisés pour leurs

propriétés physico-chimiques. En parallèle, une procédure d'extraction séquentielle (PES), adaptée de diverses techniques de la littérature, a été développée. La procédure, qui comprend quatre étapes, a été validée et appliquée afin de déterminer la forme chimique du Hg dans les trois sols à l'étude. Séparément, sur des échantillons frais du sol, les formes du Hg (Hg total, Hg volatil et méthyl-mercure) ont été déterminées.

La procédure servant à déterminer le fractionnement et la spéciation du Hg dans le sol comprend donc: 1) une analyse du Hg total (THg) 2) une analyse du Hg volatil ( $\text{Hg}^0$ ,  $\text{HgCl}_2$  et Hg lié à la matière organique) 3) une analyse du méthyl-mercure ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) et 4) une extraction séquentielle de 4 fractions, soit les composés solubles dans l'eau (F1), les composés échangeables (F2), les composés organiques (F3) et les composés résiduels (F4). Deux variantes de la PES, qui sont différentes au niveau des solvants utilisés pour l'extraction de la fraction F2 ont été testées: conditions alcalines en présence d'agents complexants (EDTA) – variante 1 de la méthode ou conditions acides avec des cations échangeables ( $\text{Ca}^{2+}$ ) – variante 2 de la méthode.

Afin d'évaluer le potentiel écotoxicologique et la biodisponibilité du Hg dans les sols, des tests d'inhibition de la germination et de la croissance de l'orge (*Hordeum vulgare*) et de mortalité de ver de terre (*Eisenia andrei*) ont été réalisés. Les effets toxiques ont été mesurés tout au long des tests sur l'orge (14j) et sur le ver de terre (21j) et à 7, 14 et 21j des échantillons ont été prélevés et analysés pour déterminer les concentrations du Hg dans les tissus. Les facteurs de bioconcentration du Hg (BCF) ont été calculés par le rapport entre la concentration du Hg des tissus et la concentration du Hg total dans le sol. Les paramètres de mesure des effets toxiques dont la  $\text{CE}_{50}$  à 14j (germination), la  $\text{CI}_{25}$  et la  $\text{CI}_{50}$  à 7 et 14j (longueur des tiges) et la  $\text{CI}_{25}$  et la  $\text{CI}_{50}$  à 7 et 14j (longueur des racines) pour l'orge, de même que la  $\text{CL}_{50}$  à 7, 14 et 21j pour le ver de terre ont été aussi calculés. Dans la troisième étape du projet, des corrélations spéciation – biodisponibilité - toxicité ont été établies à l'aide d'une matrice de corrélation.

La caractérisation physico-chimique des sols indique des sols sableux avec un pH alcalin (7,90-9,11), des concentrations élevées des chlorures (5-35 mg/kg) et des teneurs très faibles en matière organique (0-1,82%). Il est ressorti que sur les trois échantillons de sol

à l'étude, le Sol 3 présentait une concentration de Hg beaucoup plus élevée que les deux autres (11 500 mg/kg par rapport à 568 et 295 mg/kg pour les Sols 1 et 2 respectivement). De plus, la forme chimique du Hg dans les Sols 1 et 3 est très différente de celle du Sol 2 : dans les deux premiers, respectivement 88% et 98% du Hg total se trouve sous une forme volatile (éliminé par un simple chauffage à 180°C pendant 48 h), alors que dans le Sol 2, seulement 14 % du Hg présent est volatil. Enfin, de façon générale, les concentrations de méthyl-mercure ne représentaient qu'une petite fraction du Hg total (soit 9,49 µg/kg, 0,24 µg/kg et 19,3 µg/kg respectivement pour chacun des trois échantillons, ce qui représente 0,167%, 0,008% et 0,017% du Hg total).

Quant à la distribution des fractions, selon les résultats obtenus et dépendamment de la variante de la PES, les pourcentages les plus élevés de Hg mobile (soluble et échangeable) étaient retrouvés dans le Sol 1 (11,9-40,7%) par rapport à des valeurs moyennes (3,2-12,0%) pour le Sol 2 et les valeurs les plus faibles pour le Sol 3 (2,6-4,9%). Pour les deux variantes de la PES, la contribution la plus importante à la somme de ces deux fractions (F1+F2) était la deuxième extraction (F2) avec des résultats qui varient entre 11,1-39,6% (Sol 1), 3,1-12,0% (Sol 2), et 2,1-4,4% (Sol 3) du Hg total. La fraction échangeable et la somme des fractions soluble et échangeable étaient très bien corrélées avec le rapport des chlorures/Hg total. La fraction résiduelle est majoritaire allant de 65,6-70,8 % (Sol 3) à 87,7-106% (Sol 2) et 73,5-116 % (Sol 1). Cette fraction est peu stable pour certains sols à cause des forts pourcentages de Hg volatil. Globalement, la mobilité du Hg variait selon l'ordre suivant: Sol 1 > Sol 2 > Sol 3.

La procédure développée s'est avérée très satisfaisante du point de vue de la reproductibilité des résultats et du pourcentage de récupération des espèces (bilan de masse). En effet, le rapport de la somme des fractions récupérées par rapport à la concentration du Hg obtenue par digestion totale de l'échantillon (% de récupération) variait de 70,5±2,1 to 130±6% selon les échantillons.

Les résultats des tests écotoxicologiques ont indiqué des effets d'inhibition de la germination et de la croissance de l'orge en présence des concentrations plus élevées de mercure total. Très peu de variation sur l'inhibition de la germination des graines de l'orge

était observée dans les sols 1 et 2 avec respectivement 5,6% et 11% d'inhibition de la germination. En même temps (à 14j), une baisse importante de la germination (40%) était observée dans le Sol 3. Dans ce dernier sol, la germination a été totalement inhibée à 7j et des graves symptômes de stress causés par le Hg ont été observés à 14j (des plantes chlorotiques très peu développées). L'inhibition de la croissance (%) de l'orge comparativement au sol témoin à la fin des tests était différente, avec une toxicité plus faible du Sol 2 (15,2 pour les parties aériennes des plantes et 31,0 pour les racines), moyenne pour le Sol 1 (20,2 pour les parties aériennes des plantes et 63,7 pour les racines) et plus importante dans le Sol 3 (38,8 pour les parties aériennes des plantes et 92,2 pour les racines). Le Sol 1 était alors plus toxique que le Sol 2 mais moins toxique que le Sol 3. L'analyse du Hg dans les tissus indiquait des concentrations plus élevées dans l'orge du Sol 1 (4200 mg Hg/kg dans les parties aériennes des plantes et 6560 mg Hg/kg dans les racines) avec des BCF respectivement de 7,41 et 11,6 que dans le Sol 2 (21 mg Hg/kg ou 0,07 dans les parties aériennes des plantes et 510 mg Hg/kg ou 1,73 dans les racines) ou le Sol 3 (1750 mg Hg/kg ou 0,152 dans les parties aériennes des plantes et 2090 mg Hg/kg ou 0,182 dans les racines).

Les bioessais avec le ver de terre ont produit des résultats généralement en accord avec ceux de l'orge. Aucune mortalité n'était observée dans les sols 1 et 2 mais des forts pourcentages ont été enregistrés dans le Sol 3 (5%, 85%, et 100% à 7, 14, et 21j). Les concentrations du Hg dans les tissus des vers de terre à 21 jours de même que les BCF étaient plus élevés dans le Sol 1 (1410 mg Hg/kg ou 2,48) que dans le Sol 2 (178 mg Hg/kg ou 0,605). Pour les deux organismes l'analyse directe des concentrations du Hg dans les tissus des organismes s'est révélée un bon indicateur d'exposition au mercure avec les concentrations les plus élevées du Hg dans les tissus des organismes du Sol 1 après 21 jours. L'orge était l'organisme le plus sensible probablement à cause des BCF plus élevés (jusqu'à 7,41 dans les parties aériennes des plantes et 11,6 dans les racines) comparativement aux vers de terre (jusqu'à 2,48).

Des corrélations ont été établies entre le Hg mobile (la somme des fractions soluble et échangeable) dans le sol et la toxicité sur les deux organismes, entre le mercure mobile et

les concentrations du Hg dans les tissus des organismes après l'exposition, de même qu'entre la toxicité et les BCFs. Les effets toxiques sur l'orge sont significativement corrélés à la concentration du Hg mobile, tandis que les effets toxiques sur le ver de terre sont le mieux corrélés à la concentration du mercure total et à la concentration du mercure soluble dans l'eau. Cependant les teneurs du Hg dans les tissus de l'orge après 14 jours d'exposition et les BCF sont significativement corrélés au mercure mobile des sols, tandis que pour le ver de terre ils sont significativement corrélés à la concentration du mercure total et à la concentration du mercure soluble dans l'eau.

Basé donc sur les résultats des tests ecotoxicologiques, pour les sols 1 et 2, plus la concentration en Hg mobile est élevée, plus les concentrations du Hg dans les tissus sont élevées (aussi bien que le BCF) et plus la toxicité pour l'orge est élevée. Cependant, le Sol 3, avec la concentration la plus élevée du Hg mobile a manifesté la toxicité la plus élevée sur les deux organismes mais une bioconcentration limitée à 14 jours d'exposition pour l'orge suggérant l'existence d'un seuil dans l'assimilation du Hg.

L'étude indique que pour le mercure des sols contaminés suite à l'activité d'usines chlore-alcali, les concentrations du Hg mobile sont utiles pour l'estimation des effets toxiques sur l'orge, tandis que pour l'estimation des effets toxiques sur le ver de terre les concentrations totales et la concentration de Hg soluble dans l'eau sont des paramètres importants.

## ABSTRACT

This project focuses on the evaluation of Hg speciation and Hg toxicity in soils highly contaminated by emissions from chlor-alkali plants.

Hg is a non essential trace metal which is generally considered as very toxic in the environment. In nature, it is present in many chemical forms. The conversion between these forms controls its environmental distribution and its stability.

Hg speciation in soil is thus a very important factor influencing its transport in other media such as water, air and biota. The toxicity, bioaccumulation, and environmental mobility of Hg in soil depend on the species present.

The major fraction of the total Hg content of contaminated soils is composed of inorganic Hg(II) species, which have a similar toxicity with other trace heavy metals and are bioavailable and toxic if water soluble. The organomercury compounds however, even in very low concentrations (less than 2% of total Hg in soil) are more toxic and easily bioaccumulated because they are at least an order of magnitude more mobile than inorganic Hg compounds. Furthermore, it is difficult to predict the fate of Hg in contaminated soils, because its speciation is strongly influenced by the physicochemical characteristics of soils and by weathering.

The evaluation of Hg speciation is a very important stage in the assessment of potential hazards of a contaminated soil and is required to understand the behaviour of Hg. Nevertheless, there is no standardized method. In addition, the toxicity of Hg as alkyl mercury species (e.g. CH<sub>3</sub>HgCl) and as soluble inorganic species (e.g. HgCl<sub>2</sub>) is relatively well known but it is more difficult to evaluate Hg toxicity in real contaminated industrial soils.

The two main objectives of the present study are: 1) to determine the speciation of Hg in soils contaminated by emissions of chlor-alkali plants using single and sequential extractions and; 2) to correlate Hg speciation with toxic effects in a contaminated soil.

The study was performed with three soil samples impacted by Hg emissions from chlor-alkali plants in Europe. All samples were provided by the Solvay and Total Fina Elf companies. The physicochemical characteristics of the soils were examined to investigate

the factors responsible for Hg speciation. A four-step novel sequential extraction procedure (SEP) was developed and investigated in order to assess Hg partitioning in highly contaminated field soils. Total, volatile, and methyl Hg concentrations were also determined using single extractions.

The proposed procedure for the fractionation and speciation of the soil-Hg differentiates the Hg compounds into the following four fractions: F1: water-soluble; F2: exchangeable (2 alternative procedures were tested); F3: bound to organic matter, and F4: residual Hg. Two alternative SEPs have been tested that used two chemical extractants of the exchangeable fraction which was extracted under alkaline conditions with a complexing agent (0.5M NH<sub>4</sub>Ac-EDTA (pH = 8.4), (alternative 1) and under slightly acidic conditions with 1M CaCl<sub>2</sub> (pH = 5) (alternative 2).

In order to evaluate the toxicity of Hg-contaminated soils, germination and growth inhibition of barley (*Hordeum vulgare*) and mortality of earthworms (*Eisenia andrei*) were assessed. During the bioassays, toxic effects (germination and the grow inhibition for barley and mortality for earthworms) were observed on barley (14 days) and on earthworms (21 days) and 7-day, 14-day, and 21-day random samples were analyzed for Hg which were used to establish the biconcentration factors (BCFs). The BCFs were calculated as the ratio of body (earthworms) or specific tissue (aerial plants and roots of barley) and soil total Hg concentrations. The endpoints as EC<sub>50</sub> and IC<sub>25</sub> and IC<sub>50</sub> values for roots and shoot lengths of barley and LC<sub>50</sub> for earthworms were also calculated.

Toxic effects as well as BCFs were subjected to correlation analysis against the soil-Hg partitioning levels, total Hg, methylmercury and volatile Hg. All statistical treatments of the data were performed using the STATISTICA software.

The soil characterization revealed extremely contaminated ( $295 \pm 18.3$  to  $11500 \pm 457$  mg Hg/kg) coarse-grained sandy soils having an alkaline pH (7.90-9.11), high chloride concentrations (5-35 mg/kg) and very low organic carbon content (0-1.82%). Methyl Hg concentrations were low (from  $0.24 \pm 0.02$  to  $19.3 \pm 1.47$  µg/kg) in all soils. Sequential extractions indicated that the majority of the Hg was associated with the residual fraction (F4). In Soils 1 and 3, however, high percentages (88-98%) of the total Hg were present

as volatile Hg. Therefore, in these two soils, a high proportion of volatile Hg and hence, Hg<sup>0</sup>, was present in the residual fraction. The mobile fraction of mercury (sum of water soluble and exchangeable fractions) represents a low percentage of total Hg and was most abundant in Soil 1 (11.9-40.7%), compared with Soil 2 (3.2-12.0%) or Soil 3 (2.6-4.9%) for the 2 SEP alternatives respectively. For both alternatives, the most important contribution to the sum of these two fractions was the second extraction (F2) with the results varying for total Hg between 11.1-39.6% (Soil 1), 3.1-12.0% (Soil 2), and 2.1-4.4% (Soil 3). The exchangeable Hg fraction (F2) and the sum of water soluble and exchangeable Hg fractions (F1 + F2) were both strongly correlated with the ratio of chlorides to total Hg. In all soils, the largest Hg proportion was found within the residual fraction which ranged from 65.6-70.8 (Soil 3) to 87.7-106% (Soil 2) and 73.5-116% (Soil 1). In naturally occurring conditions, the residual fraction represents the least available form of Hg but in this specific case, this result is misleading due to the presence of very high concentrations of volatile Hg in certain soils. Indeed, the mobility of the Hg varies according to the order: Soil 1 > Soil 2 > Soil 3.

The developed SEP was reproducible and efficient for highly contaminated field samples with recovery (calculated as the sum of extracted Hg fractions divided by the independently determined total Hg concentration) between 70.5±2.1 to 130±6%.

Results of ecotoxicological tests indicated inhibition effects on germination and growth of barley in the presence of higher concentrations of total Hg. In non dilutes Soils 1 and 2, only minor germination inhibitions of 5.6 and 11% respectively, were observed. At the same time (14d), an important decrease in seed germination (40%) was observed in Soil 3. In this soil, the 7d germination was totally inhibited and morphological symptoms (plants became severely chlorotic with yellow leaves and stunted growth) appeared as characteristic stress features at 14d. The 14d growth inhibition of barley compared with the control sample was different in the three soils and showed the lowest toxicity in Soil 2 (15.2% for shoots and 31.0% for roots), average in Soil 1 (20.2% for shoots and 63.7% for roots) and the highest in Soil 3 (38.8% for shoots and 92.2% for roots). Soil 1 was therefore more toxic than Soil 2 but less toxic than Soil 3.

The tissue-Hg concentrations and BCFs revealed higher values in barley grown in Soil 1 (4200 mg Hg/kg or 7.41 in aerial plants and 6560 mg Hg/kg 11.6 in roots) than in Soil 2 (20.6 mg Hg/kg or 0.07 in aerial plants and 510 mg Hg/kg or 1.73 in roots) or in Soil 3 (1750 mg Hg/kg or 0.152 in aerial plants and 2090 mg Hg/kg or 0.182 in roots).

The bioassays with earthworms were generally consistent with those obtained with barley. No mortality was observed in Soils 1 and 2 but strong percentages were recorded in Soil 3 (5%, 85%, and 100% at 7, 14, and 21d). The tissue-Hg concentrations and the corresponding BCFs at 21 days were higher in Soil 1 (1410 mg Hg/kg or 2.48) than in Soil 2 (178 mg Hg/kg or 0.605). For both organisms, direct analysis of tissue-Hg concentrations was a good indicator of mercury exposure with the highest tissue-Hg concentrations found in Soil 1. However, barley was the most sensitive organism probably because of higher BCFs (up to 7.41 in aerial parts and 11.6 in roots) compared to earthworms (up to 2.48) which entailed higher toxicity.

Relationships were established between soil-extractable Hg and toxicity on two organisms, between the mobile mercury and the tissue-Hg concentrations after exposure, as well as between soil-extractable Hg and the BCFs. Toxic effects on barley were significantly positively correlated with the concentration of mobile Hg (water soluble and exchangeable fractions), while toxic effects on earthworms were significantly positively correlated with total mercury and with water soluble mercury concentrations. However, tissue-Hg concentrations in barley and the BCFs are most highly correlated to the fraction (%) of mobile mercury in soils, while for the earthworms better correlations were found with the total mercury concentrations and the soluble mercury concentrations.

Based on ecotoxicological results, in Soils 1 and 2, the higher the mobile Hg fraction the higher the tissue-Hg concentrations (as well as the BCFs) and the higher the toxicity. Soil 3, with the highest concentration of mobile Hg, had the highest toxicity but showed limited bioconcentration suggesting a threshold of toxicity for uptake.

The study indicates that for Hg contaminated soils in the vicinity of chlor-alkali plants, the mobile concentrations are useful for estimating toxic effects on barley, whereas for

estimation of toxic effects on earthworms, the total concentrations and the water soluble fraction are more important.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>CITATION .....</b>	<b>iv</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>v</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xi</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>xvi</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>xix</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>xx</b>
<b>LISTE DES ANNEXES.....</b>	<b>xxi</b>
<b>CHAPITRE I. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 Problématique .....	1
1.2 Hypothèse de recherche .....	4
1.3 Objectifs.....	4
<b>CHAPITRE II. REVUE DE LITTÉRATURE - LE MERCURE DANS L'ENVIRONNEMENT .....</b>	<b>6</b>
2.1 Sources.....	8
2.2 Composés.....	8
2.3 Spéciation.....	9
2.4 Propriétés du Hg .....	14
2.4.1 Solubilité.....	15
2.4.2 Volatilisation .....	16
2.4.3 Méthylation / déméthylation.....	17
2.4.4 Réactions redox .....	20
2.4.5 Précipitation / dissolution .....	20
2.4.6 Déposition humide / sèche.....	20
2.4.7 Sorption / désorption .....	21
2.4.8 Persistance des composés émis par usines chlore-alkali .....	22
2.4.9 Biodegradabilité .....	24
2.4.10 Biodisponibilité .....	24

2.4.11 Toxicité.....	27
<b>CHAPITRE III. MERCURY SPECIATION IN HIGHLY</b>	
<b>CONTAMINATED SOILS FROM CHLOR-ALKALI PLANTS</b>	
<b>USING CHEMICAL EXTRACTIONS .....</b>	
Titre du manuscrit .....	34
Auteur et co-auteurs .....	34
3.1 Abstract .....	34
3.2 Introduction.....	35
3.3 Materials and methods.....	37
3.3.1 Sampling and preservation .....	37
3.3.2 Soil characterization .....	37
3.3.3 Total Hg, Volatile Hg, and Methyl Hg.....	38
3.3.4 Sequential Extraction Procedure .....	39
3.4 Results and discussion .....	41
3.4.1 Soil Physicochemical Characteristics.....	41
3.4.2 Total Hg.....	42
3.4.3 Volatile Hg .....	42
3.4.4 Methyl Hg.....	43
3.4.5 Sequential Extraction Procedure .....	43
3.5 Conclusions.....	46
3.6 Acknowledgements.....	48
3.7 References.....	49
<b>CHAPITRE IV. MERCURY PARTITIONING,</b>	
<b>BIOCONCENTRATION, AND ECOTOXICITY IN HIGHLY</b>	
<b>CONTAMINATED SOILS FROM CHLOR-ALKALI PLANTS .....</b>	
4.1 Abstract .....	59
4.2 Introduction.....	59
4.3 Materials and methods .....	62
4.3.1 Soil sampling.....	62

4.3.2 Physicochemical characterization of contaminated soils .....	62
4.3.3 Extraction procedures.....	63
4.3.4 Bioassays .....	64
<i>Hordeum vulgare</i> germination and growth inhibition .....	64
<i>Eisenia andrei</i> mortality .....	65
4.3.5 Data analysis.....	66
Bioconcentration factors (BCFs) .....	66
Statistical analysis.....	66
4.4 Results.....	66
4.4.1 Physicochemical properties of soils .....	66
4.4.2 Hg speciation and partitioning in soils .....	67
4.4.3 Seed germination and growth inhibition of <i>H. vulgare</i> .....	68
4.4.4 Mortality of <i>E. andrei</i> .....	68
4.4.5 Tissue Hg concentrations and BCFs.....	69
4.4.6 Correlations .....	70
4.5 Discussion .....	71
4.6 Conclusions.....	76
4.7 Acknowledgements.....	78
4.8 References.....	79
<b>CHAPITRE V. DISCUSSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>92</b>
<b>CHAPITRE VI. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS .....</b>	<b>99</b>
6.1 Conclusions générales.....	99
6.2 Recommandations.....	101
<b>CHAPITRE VII. RÉFÉRENCES .....</b>	<b>102</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>114</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>126</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Caractéristiques physico-chimiques du mercure.....	7
Tableau 3.1 Physicochemical characteristics of soils obtained in the vicinity of chlor-alkali plants .....	53
Tableau 3.2 Total Hg, volatile Hg and methyl Hg content of soils .....	54
Tableau 3.3 Hg partitioning in Soil 1 using the proposed sequential extraction procedure.....	55
Tableau 3.4 Hg partitioning in Soil 2 using the proposed sequential extraction procedure.....	56
Tableau 3.5 Hg partitioning in Soil 3 using the proposed sequential extraction procedure.....	57
Tableau 4.1 Hg partitioning in Soil 1, Soil 2 and Soil 3 using a four step sequential extraction procedure.....	84
Tableau 4.2 Inhibition concentrations (mg Hg/kg dry mass) for barley ( <i>Hordeum vulgare</i> ) in the soils.....	85
Tableau 4.3 Earthworms fragmentation and mortality in Soil 3.....	86
Tableau 4.4 Concentrations of Hg in soils and in barley ( <i>H. vulgare</i> ) and earthworms ( <i>E. andrei</i> ) during the bioassays .....	87
Tableau 4.5 Correlation for barley ( <i>Hordeum vulgare</i> ) toxicity and earthworms ( <i>Eisenia andrei</i> ) mortality with soil extract Hg concentrations for the soils .....	88

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Sources des émissions du mercure des usines chlore-alkali.....	5
Figure 4.1 Bioconcentrated Hg in roots and aerial plants of barley ( <i>H. vulgare</i> ) after harvest from chlor-alkali contaminated soils.....	90
Figure 4.2 Bioconcentrated Hg in the whole earthworms ( <i>E. andrei</i> ) after exposure in chlor-alkali contaminated soils .....	91

## **LISTE DES ANNEXES**

Annexe 1: Protocoles Expérimentaux .....	127
Annexe 2: Résultats Expérimentaux.....	158

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

#### 1.1 Problématique

Le Hg est encore de nos jours utilisé dans différentes activités industrielles. Parmi les principaux utilisateurs et par conséquent, générateurs du Hg dans l'environnement, se trouve l'industrie chimique productrice de soude caustique et de chlore, secteur important de l'industrie chimique minérale depuis longtemps. La fabrication des produits caustiques et de chlore à partir des solutions concentrées de chlorure de sodium (ou en moindre mesure de potassium) utilise trois procédés : l'électrolyse à diaphragme, l'électrolyse à Hg et l'électrolyse à membrane échangeuse d'ions. Les procédés d'électrolyse à diaphragme (cellule de Griesheim, 1885) et d'électrolyse à Hg (cellule de Castner-Kellner, 1892) ont été introduits à la fin du 19<sup>e</sup> siècle. La technique de la cellule à membrane échangeuse d'ions a été mise au point beaucoup plus récemment (1970). Chacun des trois procédés cités fait appel à une méthode différente pour séparer le chlore qui se forme à l'anode, de la soude caustique et de l'hydrogène qui sont produits, directement ou indirectement, à la cathode. La répartition géographique des procédés d'électrolyse utilisés dans le monde est assez diversifiée :

- ✓ en Europe Occidentale, l'électrolyse à Hg représentait en juin 2000 55% de la capacité de production de chlore (22% pour l'électrolyse à diaphragme, 20% pour l'électrolyse à membrane échangeuse d'ions et 3% pour d'autres procédés);
- ✓ aux États-Unis, l'électrolyse à diaphragme représente 75% de la capacité de production de chlore;
- ✓ au Japon, l'électrolyse à membrane échangeuse d'ions représente plus de 90% de la capacité de production de chlore (AIDA Industrie, 2002).

Le principal problème posé par la technique à diaphragme est celui de l'amiante. La technique à membrane échangeuse d'ions présente des avantages écologiques intrinsèques (pas d'amiante, pas de Hg, meilleur rendement énergétique). Cependant cette technique a été très peu utilisée pour l'instant en Europe à cause des équipements et

installations de la plupart des usines existantes, installés dans les années 70, qui ont une durée de vie de 40-60 ans et à cause de l'absence d'une nouvelle capacité de production. Dans les usines chlore-alkali utilisant des cathodes de Hg liquide, le Hg forme un amalgame avec sodium, amalgame qui dans la réaction avec de l'eau produit l'hydroxyde de sodium (NaOH) et l'hydrogène gazeux ( $H_2$ ), selon la réaction suivante:



Durant le processus de fabrication, le Hg empêche la réaction de l'hydrogène dégagé avec le chlore, le sodium et l'eau, réaction qui tendrait à former de l'eau de javel indésirable. Le  $\text{Hg}^0$  est ensuite récupéré et réutilisé dans le procédé. Cependant, les hautes températures impliquées, l'évaporation continue des cellules électrolytiques et les limitations inhérentes à la technologie font en sorte que la récupération n'est pas totale (Calasans et Malm, 1997).

Les usines chlore-alkali qui utilisent des cathodes de Hg liquide représentent ainsi une source majeure de pollution pour l'environnement, en raison de leur perte de Hg (rejeté dans les déchets solides, liquides, dans l'atmosphère, par les fissures des murs, du plancher, de la tuyauterie ou à partir des produits). Globalement, les sources potentielles des émissions du Hg dans l'environnement suite à l'activité d'usines chlore-alkali à Hg sont présentées dans la Figure 1.1.

La contamination à proximité d'usines chlore-alkali utilisant le procédé d'électrolyse à Hg a été largement présentée dans la littérature (Bull et al., 1977; Linberg et Turner, 1977; Turner et Linberg, 1978; Baldi et Bargagli, 1984; Baldi et d'Amato, 1986; Maserti et Ferrara, 1991; Gonzales, 1991; Panda *et al.*, 1989, 1990 et 1992; Lodenius et Tulisado, 1984; Lodenius, 1998; Rule et Iwashchenko, 1998; Biester and Scholz, 1997; Biester and Nehrke, 1997; Biester *et al.*, 1999; Biester *et al.*, 2000; Biester *et al.*, 2002; Rémy *et al.*, 2003).

Plusieurs facteurs peuvent avoir un effet sur l'environnement, notamment:

- ✓ le comportement final des déchets liquides, solides ou gazeux (volatilisation, sorption);
- ✓ la dilution de l'effluent lors de son entrée dans les eaux en aval;

- ✓ l'entrée de l'effluent dans une source d'eau potable ou dans des eaux poissonneuses;
- ✓ les fluctuations de l'évacuation de polluants prioritaires à partir de sources industrielles (McBeath, 1985).

La contamination se produit principalement par des émissions contenant du Hg élémentaire,  $Hg^0$  (Masserti et Ferrara, 1991; Gonzales, 1991; Biester *et al.*, 2002; Rule et Iwaschenko, 1998 ; Lodenius, 1998). Sous cette forme, le Hg est extrêmement volatil, quasiment insoluble et peut réagir avec les oxydes métalliques et la matière organique. En raison de ses propriétés, il a tendance à se volatiliser ou à rester dans les horizons de surface du sol où se trouve la matière organique, ce qui le rend peu mobilisable dans le sol. En fonction de la composition du sol, le  $Hg^0$  peut aussi subir des réactions d'oxydation qui le transforment dans sa forme bivalente,  $Hg^{2+}$ . La forme  $Hg^{2+}$  est le précurseur nécessaire pour la formation de composés beaucoup plus solubles ( $HgCl_2$ ,  $Hg(OH)_2$ ) et par conséquent plus mobiles en fonction de la composition et des caractéristiques physico-chimiques des sols contaminés (Steinnes, 1990; Schuster, 1991; Yin *et al.*, 1996). Les composés du Hg peuvent être mobilisés jusqu'à la nappe phréatique, la contaminant. Le  $Hg^{2+}$  peut subir aussi d'autres réactions (méthylation et déméthylation) dont les produits de réaction sont des composés beaucoup plus dangereux tels le méthyl-mercure/éthyl-mercure, qui présentent une toxicité très élevée, même à très faibles concentrations. Ces réactions se produisent par l'entremise de bactéries anaérobies/aérobies ou parfois par voie chimique (Stein *et al.*, 1996, Davis *et al.*, 1997).

Les usines chlore-alkali faisant appel aux cathodes liquides ( $Hg^0$ ) seront remplacées surtout par des usines utilisant le procédé à membrane échangeuse d'ions. En Europe, même dans des conditions où seulement 5% de la pollution atmosphérique au Hg est générée par cette industrie, les gouvernements ont décidé de remplacer le procédé d'électrolyse au Hg d'ici 2010.

Cependant, la pollution reste en place et les sites environnants des usines chlore-alkali, qui ont reçu de grandes quantités de  $Hg(II)$  et  $Cl^-$  déchargés directement sur le sol, indiquent avec évidence que la plus grande partie du Hg est restée sous forme inorganique insoluble des décennies plus tard (Davis *et al.*, 1997).

Mais les composés organiques sont ceux qui posent les problèmes les plus alarmants. Cela signifie qu'il n'y a pas de corrélation directe entre la concentration totale du Hg dans une matrice contaminée et le risque que représente celle-ci mais plutôt une corrélation entre la concentration de certaines espèces et le risque impliqué (Hempel *et al.*, 1995). Il est donc d'une importance fondamentale d'évaluer la spéciation du Hg dans la phase solide dans la plupart des études environnementales.

### **1.2 Hypothèse de recherche**

L'hypothèse sur laquelle repose ce projet est que l'application d'une nouvelle variante d'extraction séquentielle permettra la séparation des fractions du Hg chimiquement disponibles (bioaccessibles). Ces fractions seront corrélées à la fraction biodisponible et aux effets toxiques observés lors de bioessais.

### **1.3 Objectifs**

Pour vérifier l'hypothèse du projet, ci-dessus mentionnée, les objectifs fixés ont été:

1. effectuer une caractérisation physico-chimique détaillée des échantillons de sols reçus, contaminés par les émissions des 3 usines chlore-alkali;
2. déterminer la spéciation du Hg dans les sols à l'aide d'une procédure d'extraction séquentielle appropriée;
3. évaluer la corrélation entre la spéciation du Hg et la réponse écotoxique obtenue d'un sol contaminé.

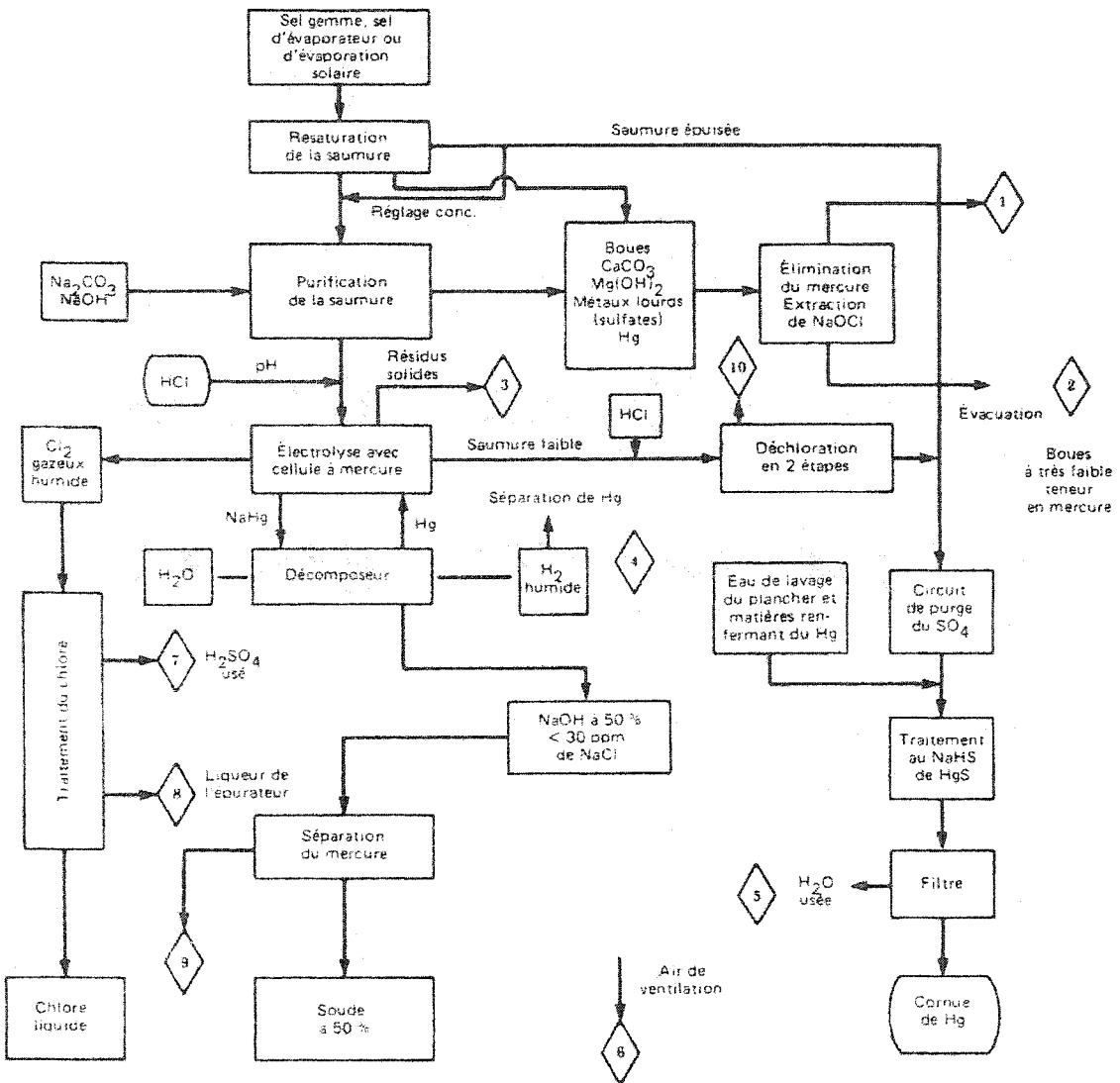


Figure 1.1 Sources des émissions du Hg provenant des usines chlore-alkali (McBeath, 1985)

## CHAPITRE II

### REVUE DE LITTÉRATURE - LE MERCURE DANS L'ENVIRONNEMENT

Le Hg est un métal naturellement présent dans l'écorce terrestre, dans les roches et les sols. En raison de sa couleur argentée et sa division en fines gouttelettes par simple agitation, son appellation courante est « argent vif » - « quicksilver ».

Selon la classification périodique de Mendeleïev, le Hg est un métal lourd situé dans le groupe des métaux transitionnels (IIB secondaire). Ses propriétés physicochimiques sont toutefois différentes des autres éléments naturels du même groupe, en étant un métal unique en ce sens qu'il est liquide à la température ambiante et le seul métal dont la température d'ébullition soit inférieure à 650° (357°) (Kerry et Alloway, 1998).

La terminologie « métaux lourds » a été extensivement utilisée par le passé pour décrire les métaux considérés comme polluants pour l'environnement. Pour n'importe quel métal, avoir une densité relative à l'eau plus élevée que cinq suffisait pour être qualifié de métal lourd. Récemment, cette terminologie a été remplacée par une nouvelle qui considère plutôt la chimie que la densité relative des métaux pour les classer d'ainsi. L'approche est plus logique parce qu'il y a des métaux qui ne sont pas lourds selon leur densité mais qui sont des polluants importants pour l'environnement (ex. Al, avec une densité relative de 1,5) (Walker *et al.*, 1996).

Le Hg est un métal lourd selon les deux classifications. Son cycle englobe le devenir, le comportement et le transport dans l'environnement. L'association des deux caractéristiques essentielles du Hg (sa haute pression de vapeurs et son long temps de vie en atmosphère) (Tableau 2.1) est responsable de sa distribution globale (Kerry et Alloway, 1998).

Tableau 2.1 Caractéristiques physico-chimiques du mercure (Pichard, 2000)

Paramètre	Type de composé mercuriel considéré	Valeur	Etendue	Référence
Masse molaire (g/mol)	élémentaire, $\text{Hg}^0$	200,59		HSDB (1998), MERCK (1989)
Point d'ébullition (°C)	élémentaire, $\text{Hg}^0$	356,7	356,6-356,9	HSDB (1998), INRS (1997), IPCS (1991), MERCK (1989), Pascal (1962)
	inorganique: $\text{HgCl}_2$	302	302-304	
Pression de vapeur (Pa)	élémentaire, $\text{Hg}^0$	0,17 à 20°C	0,16-0,27 20-25°C	HSDB (1998), Schroeder (1991, 1998)
	inorganique: $\text{HgCl}_2$	0,009 à 20°C		
	organique: $\text{CH}_3\text{HgCl}$	1,8 à 25°C		
Densité (mg/ml)	élémentaire, $\text{Hg}^0$	$13,546$ à 20°C		Lide (1998), Pascal (1962), Othmer (1981), MERCK (1989), Ullmann <sup>1</sup>
	inorganique: $\text{HgCl}_2$	5,4 à 20°C		
Tension superficielle (N/m)	élémentaire, $\text{Hg}^0$	$485 \times 10^{-3}$ à 25°C	$(484-485) \times 10^{-3}$ 25°C	HSDB (1998), IPCS (1991), Lide (1998)
Viscosité dynamique (Pa·s)	élémentaire, $\text{Hg}^0$	$1,55 \times 10^{-3}$ à 20°C	$1,52-1,55 \times 10^{-3}$ 20-25°C	IPCS (1991), Lide (1998)
Solubilité (mg/l)	élémentaire, $\text{Hg}^0$	$56,7 \times 10^{-3}$ à 20°C	$(49,6-63,9) \times 10^{-3}$	Helper (1975), Schroeder (1991, 1998), HSDB (1998), Sin (1983), MERCK (1989)
	inorganique: $\text{HgCl}_2$	69 000 à 20°C	66 000-72 000	
	organique: $\text{CH}_3\text{HgCl}$	6 000 à 25°C	5 000-6 000	
$K_{ow}$	élémentaire, $\text{Hg}^0$	4,2		Schroeder (1998), Mason (1995)
	inorganique: $\text{HgCl}_2$	0,5	0,5-3,3	
	organique: $\text{CH}_3\text{HgCl}$	2,5	1,7-2,5	
Coefficient de partage sol-eau: $K_d$ (l/kg)	Hg total	170	19-300	Bockting (1992), Buchter (1989)
Coefficient de partage matières en suspension-eau: $\log K_p$		5,23		Stortelder (1989)
Coefficient de partage sédiment-eau: $\log K_p$		5,5 5,05	Milieu marin Eau douce	Coquery et al. (1995) Stortelder (1989)
Constante de Henry (atm.m <sup>3</sup> /mol)	élémentaire, $\text{Hg}^0$	$7,2 \times 10^{-3}$ à 20°C	$7,1 \text{ à } 7,7 \times 10^{-3}$ 20-25°C	Schroeder (1998)
	inorganique: $\text{HgCl}_2$	$3,6 \times 10^{-10}$ à 20°C	$3,6 \text{ à } 7,1 \times 10^{-10}$ 20-25°C	USEPA (1997), Iverfeldt (1985)
	organique: $\text{CH}_3\text{HgCl}$	$6,6 \times 10^{-7}$ à 25°C	$4,6 \text{ à } 6,6 \times 10^{-7}$ 25°C	
Coefficient de diffusion dans l'air (cm <sup>2</sup> /s) à 25°C	élémentaire, $\text{Hg}^0$	$3,07 \times 10^{-2}$		USEPA (1996)
	organique: $\text{CH}_3\text{HgCl}$	$5,4 \times 10^{-2}$		
Coefficient de diffusion dans l'eau (cm <sup>2</sup> /s) à 25°C	élémentaire, $\text{Hg}^0$	$6,3 \times 10^{-6}$		USEPA (1996, 1997)
Perméabilité cutanée (cm/h)	élémentaire, $\text{Hg}^0$ (adsorption cutanée de vapeur)	1,2	0,8-1,5	Hursch (1989)
	Inorganique: $\text{HgCl}_2$ (dissous dans l'eau)	$10^{-3}$	$9 \times 10^{-4}-3 \times 10^{-3}$	USEPA (1992), Friberg (1961), Skog (1964)
	Organique: $\text{CH}_3\text{HgDCD}$ (dissous dans l'eau)	$3 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-3}-4 \times 10^{-3}$	

HgCl<sub>2</sub> – chlorure de mercure, CH<sub>3</sub>HgCl – chlorure de méthyl-mercure, CH<sub>3</sub>HgDCD – méthyl-mercure dicyandiamide

## 2.1 Sources

Les sources du Hg dans l'environnement sont naturelles et anthropogéniques. Parmi les sources naturelles (70% des émissions) on peut citer les roches, le sol, l'eau et la poussière volcanique. Les plus importantes sources anthropogéniques (10-30% des émissions) proviennent de divers processus industriel tels que les activités minières de séparation de l'or de l'argent de leurs minéraux, exploitation du cinabre ( $HgS$ ), la combustion des combustibles fossiles, l'activité d'usines chlore-alkali, les centrales thermiques alimentées au charbon, les incinérateurs, etc. (Stein *et al.*, 1996). Les concentrations maximales de Hg dans l'environnement se trouvent dans les zones à proximité de sites industriels tels que les usines chlore-alkali (Panda *et al.*, 1990). Les déchets solides d'usines chlore-alkali, disposés en surface ou enterrés, constituent l'une des principales sources de Hg terrestre (Panda *et al.*, 1989).

## 2.2 Composés

Du point de vue chimique, le Hg existe dans trois états de valence: 0 (élémentaire), +1 (mercureux) et +2 (mercurique) sous forme de composés inorganiques et organiques. L'interconversion entre ces formes donne la mobilité de Hg dans l'environnement (Hamasaki *et al.*, 1995).

Le Hg se combine très facilement avec d'autres molécules, que ce soit des métaux (amalgames), des molécules inorganiques (sels) ou organiques (carbone).

Les plus importants *composés inorganiques* du Hg sont : sulfure de Hg ( $HgS$ ), oxyde de Hg ( $HgO$ ), chlorure de Hg ( $HgCl_2$ ), iodure de Hg ( $HgI_2$ ) et nitrate de Hg ( $Hg(NO_3)_2$ ).

Parmi les *composés organiques*, les groupes les plus importants sont:

- ✓ alkoxyalkylés :  $CH_3OC_2H_4HgOCOCH_3$  (acétate de méthoxy éthyle Hg) et  $CH_3OC_2H_4HgCl$  (chlorure de méthoxy éthyle Hg);
- ✓ arylés :  $C_6H_5HgOH$  (hydroxyde de phényle Hg) et  $C_6H_5HgOCOCH_3$  (acétate de phényle Hg);
- ✓ alkylés :  $Hg(CH_3)_2$  (diméthyl-mercure),  $Hg(C_2H_5)_2$  (diéthyl-mercure) et le chlorure de méthyl-mercure/éthyl-mercure ( $ClHgCH_3$  ou  $ClHgC_2H_5$ ) (Picot et Proust, 1998 et 2000).

Dans le sol, le Hg peut se présenter sous les formes suivantes :

- ✓ dissout (ion libre ou complexe soluble);
- ✓ lié par des forces électrostatiques (adsorption non spécifique);
- ✓ lié par des forces covalentes (adsorption spécifique);
- ✓ lié aux substances organiques;
- ✓ précipité (le sulfure, le carbonate, l'hydroxyde, le phosphate) (Schuster, 1991).

### 2.3 Spéciation

#### *Concept*

L'introduction du concept de "spéciation" a révolutionné l'analyse élémentaire et date d'il y a 30 ans, mais la notion est omniprésente actuellement en chimie de l'environnement, en écotoxicologie et en toxicologie. Il s'agit de créer des méthodes d'analyse permettant de remplacer la mesure de la concentration totale d'un élément dans un échantillon par sa spéciation, c'est-à-dire la séparation, l'identification et le dosage individuel des "formes" de l'élément dans l'échantillon (Michalke et Schramel, 1999; Ure et Davidson, 2002). Par extension, la spéciation peut aussi décrire l'approche analytique des espèces chimiques et la distribution de ces espèces dans un échantillon ou dans l'environnement.

La distribution du Hg dans l'environnement, comme c'est le cas pour d'autres métaux est fonction de sa spéciation. Celle-ci dépend des formes physiques et chimiques, des interactions entre ces formes, entre ces formes et d'autres composés et c'est elle qui détermine le transport, la transformation et les mécanismes d'enlèvement (stabilisation dans des sédiments, déposition atmosphérique humide ou sèche) (Picot et Proust, 1995).

Selon Bernhard *et al.* (1986), la spéciation réfère généralement aux formes moléculaires d'un élément ou d'un groupe d'atomes de différents éléments dans une matrice donnée.

Ainsi le terme spéciation peut comprendre :

- ✓ la distribution parmi les entités, au niveau moléculaire dans une matrice donnée;
- ✓ les processus responsables d'une distribution observable (la distribution des espèces);
- ✓ les méthodes analytiques utilisées (l'analyse des espèces).

La spéciation est aussi définie par les aspects suivants :

- ✓ processus d'identification et de quantification des différentes espèces, formes ou phases présentes dans un matériel ou
- ✓ description des quantités et du type des espèces, formes ou phases (Michalke et Schramel, 1999).

Dans les deux cas, les espèces, les formes ou les phases sont définies comme : 1) fonctionnelles, 2) opérationnelles ou 3) des composés chimiques spécifiques ou des états d'oxydation.

1) La spéciation fonctionnelle est définie par la fonction des composés, par exemple les composés disponibles pour les plantes. Les techniques pour l'analyse sélective d'un extrait du sol peuvent permettre d'identifier et de quantifier les espèces disponibles pour les plantes ou plus généralement d'identifier et de quantifier les espèces corrélées avec les concentrations retenues dans les tissus des plantes, en fonction de la croissance, le développement ou l'état de santé.

2) La spéciation opérationnelle est définie à l'aide des procédures de fractionnement physique ou chimique, appliquées aux échantillons, pour isoler les fractions séparées en vue de les mesurer. Généralement, les techniques chimiques utilisées pour déterminer la spéciation opérationnelle sont des procédures d'extraction séquentielles (PES). Les techniques physiques concernent la séparation de l'échantillon solide en fractions de différentes granulométries ou la séparation de la solution du sol par filtration, centrifugation ou la dialyse.

Les procédures chimiques visent l'analyse d'une seule fraction ou de plusieurs fractions.

La fraction unique peut être : la concentration totale du métal déterminée par une digestion forte, la concentration pseudo totale du métal déterminée avec de l'eau régale (la concentration maximale mobilisable du métal), la concentration du métal retenu dans les tissus des plants ou la concentration du métal mobilisée par un lavage en colonne (la somme des fractions les plus mobiles).

La PES est la méthode la plus utilisée pour la séparer plusieurs fractions en simulant l'enlèvement des «réservoirs» du métal potentiellement mobile suite à des possibles modifications dans l'environnement du sol (pH, Eh).

3) La troisième forme de la spéciation est définie en fonction des composés ou les formes chimiques précises d'un élément déterminés par des techniques très sensibles et surtout très sélectives. Il s'agit du type de spéciation le plus difficile à réaliser quantitativement (Ure et Davidson, 2002).

Picot et Proust (1995) parlent aussi d'une spéciation biologique, qui concerne la formation d'une nouvelle espèce à partir d'une autre (grâce au processus dynamique de l'évolution) et d'une spéciation chimique, qui regroupe des aspects distincts de nature statique (identifier et quantifier les espèces chimiques) et dynamique (passer une espèce chimique à une autre espèce par un processus réactionnel).

#### *Facteurs influençant la spéciation*

Généralement, les plus importants ayant de l'influence sur la spéciation du Hg dans les sols contaminés sont :

- ✓ les caractéristiques physico-chimiques du Hg;
- ✓ la composition et les caractéristiques physico-chimiques du sol;
- ✓ la source et le vieillissement de la contamination.

#### *Analyse*

À présent, il est généralement reconnu que l'évaluation de la spéciation des métaux lourds représente une étape critique dans le processus d'assainissement et d'évaluation de la biodisponibilité et du danger potentiel pour l'environnement (Sauvé, 2003).

Malgré d'importants progrès faits pendant les 30 dernières années au niveau des techniques pour mesurer la spéciation des métaux, il y a encore beaucoup du travail à faire dans ce domaine parce que la plupart des méthodes disponibles offrent surtout une évaluation opérationnelle de la spéciation (Filella *et al.*, 2002). Les futures recherches devront s'orienter dans le sens de la standardisation des schémas de détermination de la spéciation et du développement des nouvelles méthodes analytiques permettant de corrélér directement la spéciation à la biodisponibilité.

Pour instant il n'y a pas encore une méthode standardisée pour évaluer la spéciation des métaux. Cependant la procédure d'extraction séquentielle (PES) est un outil intéressant

pour déterminer la spéciation des éléments mineurs (polluants métalliques) et des composés majeurs, cristallisés ou non (Ure et Davidson, 2002).

Bien que les extractions séquentielles soient, d'une façon générale, sujettes à de nombreuses critiques (définies de façon opérationnelle, manque de sélectivité, changement de spéciation pendant les extractions, difficulté à relier les agents d'extractions à des fractions géochimiques bien définies), ce sont les techniques qui permettent de donner des indications sur le type d'association existant entre le métal et la matrice et sur la forme chimique du métal (Tessier et Campbell, 1988 et 1991; Ho et Evans, 2000; Sladek et Gustin, 2003).

Les PES permettent de savoir sous quelle forme chimique les métaux se retrouvent dans les sols (Wasay *et al.*, 1998; Zagury, 1997). Les métaux peuvent exister en solution dans l'eau des pores, adsorbés aux particules de sol par adsorption chimique (liaison covalente) ou par échange cationique, complexés par la matière organique, adsorbés ou inclus dans les carbonates et les oxydes ou enfin inclus à l'intérieur de la matrice cristalline des minéraux primaires et secondaires. Les PES utilisent une série d'agents d'extraction plus ou moins sélectifs, de façon à ce que les métaux lourds soient extraits des particules solides en détruisant le lien entre les métaux et les solides.

Pour évaluer la spéciation du Hg, dans la littérature on trouve plusieurs groupes de méthodes, dont les principales sont :

- ✓ les adaptations des PES traditionnelles (Di Giulio and Ryan, 1987; Lechler *et al.*, 1997; Wallschläger *et al.*, 1998) plus ou moins élaborées (Revis *et al.*, 1989 et 1990 ; Sakamoto *et al.*, 1992 et 1995 ; Tomiyasu *et al.*, 1996 et 2000)
- ✓ les techniques de désorption thermique (MTD, mercury-thermo-desorption) (Biester and Scholz, 1997; Biester and Nehrke, 1997; Biester *et al.*, 1999; Biester *et al.*, 2000)
- ✓ la spectroscopie d'absorption des rayons X (Kim *et al.*, 2000).

Toutefois chaque groupe de méthodes présente des limites dont les principales concernent les aspects suivants en relation avec la présente étude:

- ✓ les PES ont été appliquées sur des échantillons des sols ou des sédiments ayant une faible contamination au Hg ou dans lesquels le Hg était présent majoritairement sous une forme de HgS;

Ainsi, Di Giulio et Ryan (1986) ont appliqué une PES sur des sols organiques ( $40\text{-}193 \mu\text{g Hg/kg}$ ) et des sédiments ( $8\text{-}20 \mu\text{g Hg/kg}$ ). Lechler *et al.* (1997) ont travaillé sur des échantillons des résidus miniers, sols et sédiments avec  $< 5 \text{ mg Hg/kg}$ . Wallschläger *et al.* (1998) ont travaillé sur des sols et des sédiments avec des concentrations moyennes de  $3,56 \text{ mg Hg/kg}$  et  $0,34 \text{ mg Hg/kg}$  respectivement. Sakamoto *et al.* (1992 et 1995) et Tomiyasu *et al.* (1996 et 2000) ont appliqué des PES pour séparer le Hg total dans quelques fractions dont organique, inorganique et résiduelle pour des échantillons de sédiments avec des concentrations de Hg allant de  $0,086\text{-}257 \text{ mg/kg}$  mais qui était présent sous une forme majoritaire de HgS (38,4-96,1% du Hg total). Revis *et al.* (1989 et 1990) ont séparé certaines fractions de Hg telles que le Hg inorganique (HgS), organique et résiduel pour des sols contenant  $0,5\text{-}3000 \text{ mg Hg/kg}$ .

- ✓ les pourcentages de récupération du Hg total sont très variables mais généralement peu satisfaisants;

Ainsi, on trouve des variantes de PES ayant des pourcentages de récupération de Hg allant de  $10 \pm 6 \%$  jusqu'à  $181 \pm 14 \%$  (Di Giulio et Ryan, 1987; Wallschläger *et al.*, 1998). Wallschläger *et al.* (1998) suggèrent la possibilité de perte des composés volatiles du Hg (qui n'ont pas été analysés dans leur étude) pour expliquer les faibles pourcentages de récupération du Hg ( $65,8 \pm 26,4\%$  du Hg total pour les sols et  $44,1 \pm 26,4$  du Hg total pour les sédiments), tandis que Di Giulio et Ryan (1987) essaient d'expliquer leur très élevés pourcentages de récupération (allant jusqu'à 181%) par des possibles erreurs d'analyse au niveau de chaque fraction extraite ce qui devient une erreur cumulée à la fin de l'analyse.

- ✓ les échantillons de sol ou de sédiments ont été chauffés (à  $180^\circ\text{C}$  pendant 48 h) avant de commencer l'application de la PES et la fraction résiduelle n'a pas été analysée mais obtenue par différence entre la concentration du Hg total et la somme des autres fractions séparées antérieurement (Lechler *et al.*, 1997);

- ✓ les PES ont été généralement appliquées sur des échantillons de sols ou de sédiments avec une provenance de plusieurs activités industrielles (surtout l'activité minière de séparation de cinabre ou des métaux précieux dont l'or et l'argent) mais pas d'usines chlore-alkali probablement à cause de fortes concentrations des composés volatiles, dont  $Hg^0$  et qui rendent difficilement l'application de la technique;
- ✓ le manque d'estimation de la mobilité du Hg dans la phase liquide.

Les résultats obtenus par les méthodes de désorption thermique (Biester and Scholz, 1997; Biester and Nehrke, 1997; Biester *et al.*, 1999; Biester *et al.*, 2000) donnent seulement des informations sur la stabilité thermique du Hg et de ces principaux composés et sur les émissions potentielles en fonction de la température.

- ✓ la nécessité de coupler les résultats de spéciation obtenus à l'aide de la méthode de spectroscopie d'absorption des rayons X (Kim *et al.*, 2000) avec d'autres techniques de détermination de la spéciation pour évaluer la solubilité, la réactivité et la mobilité potentielle du Hg.

En conclusion aucune procédure de la littérature n'a été trouvée suffisamment adaptée pour être appliquée sans modification sur les trois sols à l'étude.

## 2.4 Propriétés du Hg

Les plus importantes réactions ou processus qui contrôlent la distribution des composés du Hg dans l'environnement sont : la volatilisation, la méthylation / déméthylation, les réactions redox, la précipitation/ dissolution et la sorption/ désorption, dépendamment de la complexion (Stein *et al.*, 1996). Les sols et les sédiments peuvent affecter la distribution du Hg dans l'environnement en agissant comme source de dispersion du Hg dans le milieu environnant (par la volatilisation dans l'air, le lessivage du sol par l'eau, l'ingestion du Hg par la flore et la faune à partir du sol ou des sédiments) et comme lieu de déposition pour le Hg de l'atmosphère ou de l'eau (Schuster, 1991). Ce sont surtout les sols qui peuvent agir comme source à très long terme de pollution terrestre à cause de leur tendance à retenir les métaux lourds (Panda *et al.*, 1989). La tendance du Hg à s'associer avec plusieurs ligands ( $OH^-$ ,  $Cl^-$ ,  $S^{2-}$ ), fait en sorte qu'une fois introduit dans l'environnement, on peut le retrouver dans le sol sous la forme de chlorure de Hg

(HgCl<sub>2</sub>), d'hydroxyde de Hg (Hg(OH)<sub>2</sub>) ou de sulfure de Hg (HgS). Les solubilités de HgCl<sub>2</sub> et de Hg(OH)<sub>2</sub> sont élevées par rapport à celles des composés du Hg et leur présence entraîne un effet d'augmentation de la mobilité du Hg. Quant au soufre, à cause de la forte affinité du Hg pour les ligands faibles (S<sup>2-</sup>, SH), le composé qui en résulte (HgS) est très peu soluble et extrêmement stable (Schuster, 1991).

D'autres paramètres du sol sont importants pour le devenir du Hg dans un sol contaminé dont : le pH, le contenu en matière organique et le contenu en argile (Yin *et al.*, 1996; Rule et Iwaschenko, 1998).

Il est difficile de prédire le devenir du Hg dans des matrices contaminées parce que sa spéciation est fortement liée aux caractéristiques physico-chimiques du sol contaminé, à la source et au vieillissement de la contamination, rendant son comportement différent dans chaque type de sol. Des changements dans l'environnement du sol au cours du temps, tels que la dégradation de la matière organique, la modification du pH, du potentiel redox peuvent modifier la mobilité des métaux. L'étendue de la contamination est donc un problème spécifique au site (McLean et Bledsoe, 1992).

#### 2.4.1 Solubilité

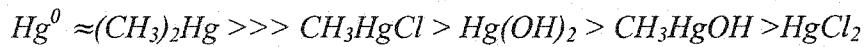
Les principales propriétés de mercure de même que celles des ses principaux composés sont présentées dans le Tableau 2.1. La solubilité du Hg de même que celle de ses composés est très bien corrélée à la structure chimique. Les sels mercureux Hg (I) sont ainsi peu solubles dans l'eau, tandis que les sels mercuriques Hg (II) sont les plus solubles, notamment le chlorure (HgCl<sub>2</sub>) et l'hydroxyde (Hg(OH)<sub>2</sub>) sont les plus solubles (au moins 10<sup>5</sup> fois plus solubles que le Hg<sup>0</sup>) (Lindberg et Stratton, 1998). Le sulfate de Hg et le nitrate de Hg sont solubles en milieu acide et s'hydrolysent par dilution en sels basiques. L'iodure (HgI<sub>2</sub>) et le sulfure (HgS) sont presque insolubles. Cependant la solubilité du HgS ( $10^{-54}$  mol<sup>2</sup>/l<sup>2</sup>) dans l'eau est augmentée par un facteur de 3.6\*10<sup>7</sup> par une solution 1M de chlorures (environ 35000 µg Cl/g), tandis que la solubilité de Hg(OH)<sub>2</sub> est augmentée de 10<sup>5</sup> fois dans les mêmes conditions (Schuster, 1991). Le radical méthyl-mercure peut former des liaisons avec des ligands minéraux et/ou organiques. La liaison du méthyl-mercure avec des ligands minéraux aboutit à la

formation des dérivés organomercuriels avec des anions ( $\text{OH}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\Gamma$ ,  $\text{S}^{2-}$ ), qui sont plus ou moins hydrosolubles et liposolubles. La liaison du méthyl-mercure avec des ligands organiques permet la formation des dérivés organiques qui sont insolubles dans l'eau et volatils comme le diméthyl-mercure qui lui, par contre, est totalement liposoluble. Le méthyl-mercure peut être insoluble, liposoluble ou hydrosoluble dans différents milieux (Picot et Proust, 1998). D'après Kerry et Alloway (1998), la solubilité aqueuse des composés du Hg variant selon la relation, le plus soluble étant le  $\text{HgCl}_2$  :

$$\text{Hg}^0 < \text{Hg}_2\text{Cl}_2 < \text{CH}_3\text{HgCl} < \text{HgCl}_2.$$

#### 2.4.2 Volatilisation

Le Hg volatilisé du sol provient de trois sources principales : (1) le dépôt de surface (déposition sèche ou humide), (2) les gisements exploités (à cause de l'oxydation et des précipitations) et (3) le Hg géogénique incorporé dans la matrice du sol et libéré à cause des changements climatiques. Selon Schlüter (2000), la volatilité des composés du Hg varie selon la séquence suivante, le  $\text{HgCl}_2$  étant le moins volatile:



Donc, le  $\text{Hg}^0$  et le  $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}^+$  sont de loin les formes les plus volatiles. Selon le même auteur, les autres formes du Hg sont moins volatiles (la constante de distribution air/eau est au moins 500 fois plus faible). Elles peuvent toutefois s'évaporer du sol par co-distillation avec l'eau évaporée (Schlüter, 2000).

Les facteurs qui influencent la volatilisation du Hg sont: les caractéristiques physico-chimiques du sol, la capacité de sorption, les concentrations totales de Hg, la spéciation, l'acidité du sol (le pH), les conditions météorologiques, la température du sol et de l'air et la végétation présente (Gustin *et al.*, 1997; Schlüter, 2000; Grigal, 2002). La volatilisation du Hg augmente avec la diminution du contenu en matière organique soluble et le contenu en argile, avec l'augmentation du pH et de l'humidité du sol (jusqu'à 1/3 bars de la capacité de rétention au champ) (Schlüter, 2000). Elle est aussi inversement corrélée avec la capacité d'adsorption d'un sol et elle est une fonction directe de la spéciation du Hg. La volatilisation est plus élevée quand le sol contient des composés solubles ( $\text{HgCl}_2$  ou le  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ ), que quand le sol contient des composés

moins solubles ( $\text{HgO}$ ) ou presque insolubles ( $\text{HgS}$ ) (McLean et Bledsoe, 1992; Schlüter, 2000).

Selon Zhang et Lindberg (1999), la volatilisation repose sur un processus en trois étapes : la réduction du  $\text{Hg(II)}$  en  $\text{Hg(0)}$ , la diffusion ou le transport du  $\text{Hg(0)}$  à la surface du sol et la diffusion ou le transport du  $\text{Hg(0)}$  à travers la couche qui sépare le sol de l'atmosphère. La réduction du  $\text{Hg(II)}$  en  $\text{Hg(0)}$  peut suivre une voie biotique ou abiotique. Quand la forme de rejet dans le sol est la forme élémentaire (ex. les usines chlore-alkali), le Hg se retrouve directement dans le sol sous une forme gazeuse, en solution, ou adsorbé.

Conformément aux résultats de l'étude de Grigal (2002) sur le bilan du Hg dans les sols boréaux et tempérés, la plus importante voie de dispersion du Hg est la volatilisation (qui compte pour environ 80% des taux des pertes annuelles), tandis que la séquestration dans la matrice du sol et les pertes par le lixiviat du sol comptent pour le reste (environ 20%).

Les taux de volatilisation du Hg des sols naturels sont généralement  $< 0,2 \text{ } \mu\text{g/m}^2/\text{h}$  (Schlüter, 2000). Les émissions du Hg des sols contaminés varient de 30 à 160  $\text{ng/m}^2/\text{h}$  et peuvent atteindre jusqu'à 2000  $\text{ng/m}^2/\text{h}$  (Lindberg *et al.*, 1991, Gustin *et al.*, 1991).

La volatilisation du Hg des sols contaminés par les émissions d'usines chlore-alkali varie de 12-991  $\text{ng/m}^3$  (Lindberg et Turner, 1977) à 1000  $\text{ng/m}^3$  (or  $36 \pm 4 \text{ kg/an}$ ) (Rule et Iwashchenko, 1998).

#### **2.4.3 Méthylation / déméthylation**

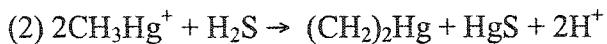
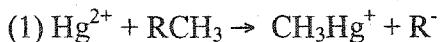
Le Hg est un métal lourd redoutable dont la toxicité augmente sous forme organique des composés méthylés extrêmement toxiques (Picot et Proust, 1995). Ce sont surtout les composés de type alkyle Hg qui causent le plus de préoccupations en raison de leur toxicité, de leur potentiel de bioaccumulation et de leur nature rémanente. Il est capital alors de comprendre quelles sont les variables qui influent sur la formation du méthyl-mercure.

La méthylation s'effectue principalement dans des environnements aquatiques à pH faible avec des concentrations élevées en matière organique (Horvat *et al.*, 1999).

Dans les sols, le pH joue un rôle important sur le contrôle du processus d'adsorption des diverses formes de Hg sur l'argile ou sur les particules de matière organique, et donc influence la disponibilité des ions mercuriques. La décomposition de la matière organique, surtout dans les sols très riches (ex. marécages et tourbières) peut favoriser la croissance des populations microbiennes, réduire les niveaux d'oxygène, et par conséquent rendre le milieu anoxique et ainsi favoriser la biométhylation et la production du méthyl-mercure (Grigal, 2003 et 2003). Le taux de ce processus augmente avec la température qui favorise la productivité biologique, et diminue pendant l'hiver. Les bactéries sulfato-réductrices sont aussi considérées comme responsables de la méthylation du Hg (Morel *et al.*, 1998 ; Grigal, 2003) surtout à la surface du sol.

Pour la formation des composés organiques à partir de la forme inorganique du Hg, quelques hypothèses ont été avancées dont : une voie biologique (pour le méthyl-mercure/éthyl-mercure), le transport latéral ou vertical de l'eau de surface ou l'eau souterraine contaminée ou une voie chimique (réaction entre des polluants organiques et le Hg) (Hempel *et al.*, 1995). Selon Hamasaki *et al.* (1995), le méthyl-mercure peut être le produit de l'activité des microorganismes par une méthylation biologique (les conditions non aérobies sont les plus favorables) et/ou une méthylation non biologique soit la méthylation chimique (photochimique et non photochimique). Une grande variété de microorganismes participe à la conversion de  $\text{Hg}^{2+}$  en méthyl-mercure dans certaines conditions anaérobies que l'on trouve, par exemple, dans des zones humides et des sédiments de rivière, ainsi que dans certains types de sol.

Selon Nriagu (1979), la méthylation biologique du Hg est favorisée dans des conditions anaérobies et dans une moindre mesure dans des conditions aérobies, conformément aux réactions suivantes :



La proportion du méthyl et diméthyl-mercure formés dépend de la concentration du Hg total et du pH du système. Ainsi la formation du méthyl-mercure (équation 1) est favorisée par des conditions acides et des concentrations élevées de Hg. La formation du

diméthyl-mercure (équation 2) est favorisée par des conditions neutres ou alcalines, des faibles concentrations de Hg et en présence d'agents de complexation forts tel que  $\text{H}_2\text{S}$ . Le méthyl-mercure peut être le résultat de la méthylation bactérienne du Hg inorganique présent dans l'atmosphère, dans l'eau, dans le sol ou de l'activité des bactéries présentes dans les branchies/intestins des poissons. Le composé est présent partout où il y a du Hg inorganique. Cependant la plupart des données sur les sites contaminés au Hg concernent les concentrations de Hg total, à cause de très faibles concentrations du méthyl-mercure. Récemment Bloom *et al.* (2003) ont trouvé des taux nets de méthylation pour tous les composés du Hg (incluant le  $\text{HgS}$  pur, un composé presque insoluble et considéré très peu disponible biologique/chimique), une fois déchargés dans l'eau.

Aucune évidence expérimentale n'indique la formation du  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  dans les sols naturels non contaminés ou dans l'eau (Schlüter, 2000).

Dans les sols contaminés par contre, le méthyl-mercure est habituellement présent à des concentrations de 0.01-2% du Hg total, tandis que le diméthyl-mercure est présent à des concentrations  $10^3$  fois moins élevées. C'est une raison pour laquelle ce dernier composé est en général, ignoré (Davis *et al.*, 1997). De plus, le diméthyl-mercure est moins毒 que le méthyl-mercure et la plupart des méthodes analytiques communes ne peuvent pas le déceler à cause de très faibles concentrations dans une matrice contaminée. De plus, comme il est extrêmement volatil, sa volatilisation peut se produire pendant n'importe quelle étape de l'analyse (échantillonnage, réservation d'échantillon, homogénéisation, digestion de la matrice, extraction) (Puk et Weber 1994; Kerry et Alloway, 1998).

Selon Grigal (2003), les teneurs en méthyl-mercure dans le sol peuvent représenter jusqu'à plus de 5% du Hg total mais plus de 70% des observations identifient des teneurs <1% avec une moyenne de 0,6%. D'après d'autres sources, la proportion de méthyl-mercure peut varier dans le lixiviat du sol entre 0,15 et 15% (Grigal, 2002).

Les taux de méthylation ne peuvent pas être mesurés en temps réel. On dispose surtout de valeurs des taux nets de méthylation à cause des difficultés inhérentes dues au changement continu du rapport production/ consommation (Kerry et Alloway, 1998).

#### 2.4.4 Réactions redox

La distribution des espèces du Hg dans le sol est fonction du son pH et de son potentiel redox. Dans des conditions oxydantes (350–400 mV), telles que les conditions normales dans les sols, le Hg peut se retrouver sous des formes très solubles à cause de sa forte tendance à s'associer avec des ions hydroxyle et chlorure. L'oxydation peut se produire dans l'eau, dans le sol et dans les sédiments par réactions abiotiques ou biotiques (Stein *et al.*, 1996). Des conditions moyennement réductrices (100 à -100 mV) peuvent causer la précipitation du Hg sous la forme de sulfure, HgS. Dans des conditions réductrices fortes (-100 à -300 mV), les composés organiques et inorganiques du Hg peuvent être dégradés en sa forme élémentaire, Hg<sup>0</sup> ou, à des pH élevées en un composés très stable (HgS<sub>2</sub><sup>2-</sup>) (Schuster, 1991).

#### 2.4.5 Précipitation / dissolution

Le Hg sous ses formes Hg mercureux (Hg<sub>2</sub><sup>2+</sup>) et mercurique (Hg<sup>2+</sup>) peut être immobilisé dans le sol par la formation de précipités. Le Hg mercureux précipite avec les chlorures, le phosphate, le carbonate et l'hydroxyde. Aux concentrations de Hg généralement trouvées dans les sols naturels non contaminés (< 0.2 mg Hg/kg), seuls les phosphates sont stables. Le Hg mercurique s'hydrolyse dans un intervalle de pH de 2 à 6 et Hg(OH)<sub>2</sub> se forme aux alentours de pH 6. À des concentrations de Hg(II) qui dépassent 107 mg/kg, l'hydroxyde peut précipiter. Dans des conditions normales de pH dans le sol (faiblement acides), la distribution du Hg(II) est donc une fonction de la solubilité du Hg(OH)<sub>2</sub> (Schuster, 1991; Grigal, 2002). Selon McLean et Bledsoe (1992), Hg(II) dans les sols alcalins précipite avec les carbonates et l'hydroxyde pour former des phases solides stables. Hg(II) peut aussi former des complexes solubles avec la matière organique dissoute. À pH acide et en présence de concentrations élevées de chlorures, le chlorure de Hg va se former. La présence d'autres composés tels que le chlorure, l'hydroxyde et les complexes solubles avec la matière organique dissoute peuvent contribuer à l'augmentation de la mobilité du Hg dans le sol.

#### 2.4.6 Déposition humide / sèche

Le Hg<sup>0</sup> peut quitter l'atmosphère sous forme de dépositions humides ou sèches (Lodenius, 1984; Lodenius, 1998). Selon les résultats obtenus, la déposition sèche semble

une voie plus importante pour la sortie du Hg<sup>0</sup> de l'atmosphère que la déposition humide et les dépositions nettes de Hg de l'atmosphère en provenance d'usines chlore-alkali varient de 1200 µg/m<sup>2</sup>/an (humide + sèche) à 11160 µg/m<sup>2</sup>/an (humide) et 200320 µg/m<sup>2</sup>/an (sèche).

#### 2.4.7 Sorption / désorption

Un autre mécanisme de rétention du Hg dans le sol, à part la précipitation, est l'adsorption, considérée comme le plus important processus impliqué dans le devenir du métal sous la forme des traces dans le sol (Yin *et al.*, 1996). Le contenu en Hg adsorbé par un sol est fonction de la capacité d'échange cationique (CEC) du sol, qui varie en fonction du contenu et le degré de décomposition de la matière organique et les proportions relatives des différents minéraux dans la fraction minérale du sol (Kerry et Alloway, 1998). En effet, la matière organique est la principale source de la CEC d'un sol, contribuant pour plus de 200 meq/ 100 g de matière organique dans les sols minéraux de surface. Cependant, la matière organique diminue avec la profondeur du sol, et les constituants minéraux du sol deviennent une surface plus importante de sorption en profondeur. L'adsorption est corrélée avec la matière organique et le contenu d'argile du sol (McLean et Bledsoe, 1992). Dans les sols industriels contaminés par les usines chlore-alkali, la présence de matière organique peut être ainsi une indication d'un très long temps de résidence du Hg dans les environs (Rule et Iwashchenko, 1998). Des paramètres comme le pH (Rule et Iwashchenko, 1998; Schlüter, 2000; Biester *et al.*, 2002) et les concentrations de chlorures (Schuster, 1991; Yin *et al.*, 1996) interfèrent avec l'adsorption du Hg par la matière organique. Le contenu en matière organique dissoute augmente d'une manière significative avec l'augmentation du pH, ce qui entraîne une augmentation de la mobilité du Hg dans les sols riches organiques et avec un pH alcalin, sous la forme des complexes solubles. Une concentration très élevée de Hg(II) peut toutefois causer une diminution de l'adsorption à cause d'une surface d'adsorption disponible limitée de la matière organique (Yin *et al.*, 1996). Une inhibition de la mobilité des complexes solubles formés par le Hg avec la matière organique dans des sols contenant à la fois beaucoup de matière organique et de l'argile a été trouvé par

Biester *et al.* (2002b), ce qui suggère une adsorption entre les charges positives des cations métalliques des complexes organo-minéraux et les surfaces chargées négativement des argiles.

Le Hg(II) se comporte différemment que la plupart des métaux lourds dans le sens où son adsorption est plus élevée en milieu acide (Yin *et al.*, 1996). Ainsi, dans les sols naturels moyennement acides ( $\text{pH} < 4,5$  à 5), la matière organique représente le matériel adsorbant effectif pour le Hg inorganique, tandis que dans les sols avec un pH neutre, les oxydes de Fe et les minéraux argileuse deviennent plus efficaces pour l'adsorption (Schuster, 1991). Une adsorption maximale (86-98%) du Hg(II) par la matière organique dans un domaine de pH de 3 à 5 a été mise en évidence par Yin *et al.* (1996) pour 15 sols différents ainsi qu'une diminution considérable de l'adsorption pour un  $\text{pH} > 5$  (à cause de l'augmentation de la solubilisation de la matière organique). Dans les sols minéraux par contre, l'adsorption semble réduite à des valeurs de pH faibles soit à cause d'une affinité plus prononcée du Hg pour la matière organique que pour les composés inorganiques du sol, soit à cause d'une surface spécifique d'adsorption moins étendue. Cependant Biester *et al.* (2002b) ont trouvé qu'il existait une inhibition de la mobilité des complexes solubles du Hg par les argiles même dans les sols avec des contenus élevés de la matière organique. Les chlorures, qui sont présents dans tous les systèmes naturels peuvent représenter un agent de complexion très mobile et persistant pour le Hg. De plus, la plupart des résultats expérimentaux suggèrent que la présence des chlorures réduit l'adsorption surtout dans les sols minéraux. Toutefois, le pH influence la concentration des complexes de  $\text{HgCl}_2$  formés. Ainsi, la concentration des chlorures nécessaires pour la mobilisation partielle ou totale du Hg(II) augmente avec le pH, résultant dans la compétition du  $\text{OH}^-$  et de  $\text{Cl}^-$ , ce qui entraîne une diminution de l'adsorption (Schuster, 1991).

#### 2.4.8 Persistance des composés émis par usines chlore-alkali

La forme de rejet la plus importante d'usines chlore-alkali dans l'atmosphère est la forme élémentaire ( $\text{Hg}^0$ ). À part cette forme qui est la plus volatile et la plus répandue, dans l'atmosphère existent d'autres composés du Hg dont le Hg inorganique ( $\text{Hg}^{2+}$ ), dans des

composés tels que  $\text{HgCl}_2$  et  $\text{Hg(OH)}_2$  et le Hg organique sous la forme du méthyl-mercure et du diméthyl-mercure peuvent être retrouvés (Stein *et al.*, 1996). Le diméthyl-mercure, qui lui aussi est volatil, est très instable et rapidement dégradé en  $\text{Hg}^0$  avec un temps de résidence allant de quelques jours à quelques semaines. Le  $\text{Hg}^0$ , ayant une durée de vie entre 2 mois et 3 ans, peut rester dans l'atmosphère pendant très longtemps (Pichard, 2000). Ainsi, il peut alimenter le circuit du Hg dans la nature par dépositions humide ou sèche (Lodenius, 1994 et 1998).

Dans le sol, les formes les plus stables du Hg sont la forme élémentaire ( $\text{Hg}^0$ ) et la forme bivalente ( $\text{Hg}^{2+}$ ) (Kerry et Alloway, 1998).  $\text{Hg}^0$  est très peu soluble (environ 50  $\mu\text{g/L}$ ) et ainsi très peu mobilisable. Il a alors la tendance à rester dans les horizons de surface du sol, étant adsorbé par les oxydes métalliques et la matière organique (Schuster, 1991; Yin *et al.*, 1996). Dans les sols contaminés par les émissions d'usines chlore-alkali, le  $\text{Hg}^0$  peut se volatiliser, surtout durant les périodes de températures élevées (Lindberg et Turner, 1977; Rule et Iwashchenko, 1998) et même à température ambiante (Baldi et Bargagli, 1984; Bloom *et al.*, 2003). Le temps pendant lequel le Hg se volatilise des sols contaminés par les usines chlore-alkali est encore inconnu mais des données de sites contaminés corrélées avec des données thermodynamiques suggèrent qu'il est plus long que 100 ans (Lindberg et Turner, 1977). Les formes monovalente ( $\text{Hg}_2^{2+}$ ) et divalente ( $\text{Hg}^{2+}$ ) se retrouvent liées à des radicaux inorganiques et organiques.  $\text{Hg}_2^{2+}$  est très peu stable dans des conditions oxydantes et se transforme rapidement en  $\text{Hg}^{2+}$ . Le  $\text{Hg}^{2+}$  trouvé dans les rejets liquides d'usines chlore-alkali est surtout  $\text{HgS}$ , un composé très stable et très persistant. Mais des réactions ultérieures dans le sol font en sorte que le Hg peut se retrouver aussi sous une forme organique dont le méthyl-mercure et l'éthyl-mercure et/ou une forme inorganique dont  $\text{HgCl}_2$  et  $\text{Hg(OH)}_2$ . Contrairement au  $\text{Hg}^0$ , sous ces formes, le Hg est plus mobile à cause d'une solubilité plus élevée et par conséquent moins persistant dans le sol. Il peut être transporté dans les eaux de surface et souterraines où il peut se bioaccumuler et bioconcentrer dans les organismes vivants. Ces concentrations se bioamplifient au long de la chaîne trophique (Kerry et Alloway, 1998).

#### **2.4.9 Biodegradabilité**

À l'instar des autres familles de contaminants (ex. contaminants organiques), les métaux lourds, dont le Hg, ne sont pas biodégradables parce qu'ils ne peuvent pas être décomposés en des produits moins toxiques par les microorganismes. La détoxification par les organismes consiste à «cacher» la forme active du métal dans une protéine comme la métallothionéine (des liaisons covalentes avec le soufre) ou phytochélatine, ou en la «déposer» à long terme sous une forme des particules (insolubles). Les métaux essentiels pour la croissance ont une concentration requise pour assurer le développement et la reproduction normale des organismes. Les métaux non essentiels comme le Hg ne l'ont pas, et en plus de leur toxicité, ils peuvent également affecter les organismes par l'induction de déficiences de métaux essentiels en compétitionnant pour des sites libres dans la structure des molécules biologiques importantes (Walker *et al.*, 1996).

#### **2.4.10 Biodisponibilité**

Selon Sauvé (2003), la biodisponibilité exprime d'une manière générale «disponible pour les organismes vivants». Elle peut référer soit à l'ingestion ou à l'assimilation d'une substance par certains organismes vivants soit à des effets toxiques avec/ sans l'assimilation simultanée de la substance.

La biodisponibilité est définie comme la fraction absorbée par un organisme par ingestion, inhalation ou contact dermique suite à l'exposition au contaminant (Dock *et al.*, 1998) ou la fraction d'un composé présent qui, une fois émis dans l'environnement, peut être absorbée par un organisme et causer un effet biologique (Stein *et al.*, 1996).

La biodisponibilité peut être évaluée par différentes techniques, soit :

- ✓ chimiques en évaluant la fraction la plus mobile (soluble et échangeable) d'un contaminant et supposée la plus accessible pour un organisme cible;
- ✓ biologiques en évaluant soit les effets toxiques soit les concentrations retenues dans les tissus après l'exposition au contaminant.

Ces dernières techniques utilisent des biomarqueurs, des bioindicateurs et des biomonitorateurs, termes utilisés souvent comme synonymes (Kerry et Alloway, 1998).

Selon Kelsey et Alexander (1997) l'évaluation de la biodisponibilité par une approche biologique est réalisable à l'aide d'une méthode utilisant:

- ✓ un microorganisme capable de biodégrader le contaminant ou;
- ✓ n'importe quel organisme capable de présenter un effet toxique manifeste lorsqu'exposé au contaminant ou d'assimiler le contaminant jusqu'à un niveau où il peut entraîner un effet toxique.

Les différents effets, allant de la biodégradation à la réponse toxique ou la bioaccumulation, sont toujours une mesure de la fraction biodisponible mais associées à deux fractions distinctes du contaminant : une fraction facilement mobilisable (soluble dans l'eau et échangeable) (premier cas) ou une fraction intrinsèque (la somme des fractions extractibles à l'aide des solvants) (deuxième cas).

Pour prédire la biodisponibilité du Hg, Davis *et al.* (1997) indiquent les tests 1) *in vivo*, réalisées avec un organisme vivant et 2) *in vitro*, réalisées sans récepteur cible mais en laboratoire simulant la dissolution des composés du Hg pendant le passage le long du tractus digestif d'un animal choisi.

La plupart des tests *in vivo* étudient parallèlement les effets d'un composé soluble ( $\text{HgCl}_2$ ) et d'un composé insoluble (HgS) parce que la cinétique de dissolution entraîne différentes biodisponibilités et bioconcentrations. Dans des études réalisées sur des souris, Sin *et al.* (1983) ont trouvé une bioaccumulation 10 fois plus élevée de  $\text{HgCl}_2$  que de HgS, tandis que Revis *et al.* (1990) ont rapporté une absorption intestinale de 2,1% de dose administrée de  $\text{HgCl}_2$  par rapport à 0,4% pour celle de HgS.

Dans le contexte de l'étude de la biodisponibilité du Hg, des termes tels que la bioaccumulation, la bioconcentration et la bioamplification sont très importants.

La bioaccumulation signifie l'absorption d'un composé par un organisme et c'est une première indication de la biodisponibilité du composé. Les différents organismes peuvent retenir les métaux dans des concentrations variables en fonction de la biodisponibilité du métal, de l'organisme considéré et du niveau de la contamination. La bioaccumulation est exprimée par le facteur de bioaccumulation (BAF), calculé par le rapport des concentrations de la substance dans les tissus de l'organisme et la concentration de la substance dans la nourriture plus l'environnement (l'eau, l'air, le sol).

La *bioconcentration* est exprimée par le facteur de bioconcentration (BCF) qui est calculé par le rapport des concentrations de la substance dans les tissus de l'organisme et la concentration de la substance dans l'environnement (l'eau ou l'air ou le sol) (Walker *et al.*, 1996; Sandoval *et al.*, 2001).

La *Bioamplification* est le processus par lequel le prédateur concentre une substance à un niveau supérieur de celui où il se trouve dans sa proie (Cossa et Ficht, 1999).

Le Hg inorganique et le méthyl-mercure sont bioconcentrés par les organismes vivants. Il existe des variations relativement importantes aux niveaux des effets toxiques pour une même espèce d'organisme, le plus souvent dues à la différence d'âge ou de régime alimentaire. Mais de plus fortes variations existent entre les différentes espèces (Lodenius, 1994). Dans le cas du méthyl-mercure il s'agit surtout d'une bioamplification qui commence par un individu et continue par le transfert entre individus. Les concentrations augmentent ainsi au fur et à mesure que l'on progresse dans la chaîne trophique pouvant aboutir de  $10^5$ - $10^7$  fois plus élevées par rapport à la concentration ambiante (e.g. poissons).

La biodisponibilité des métaux a été corrélée à leur concentration totale et à l'activité de l'ion libre dans le lixiviat du sol, à la fraction échangeable, à la fraction assimilée par les organismes vivants, et plus récemment à la fraction qui cause la réponse toxique (Naidu, 2003).

Généralement, la PES donne des informations sur la partition du métal dans la matrice solide et offre une estimation des fractions plus ou moins chimiquement accessibles et donc la possibilité de prédire la mobilité potentielle des contaminants. Toutefois les résultats de la PES ne sont pas suffisants pour évaluer la biodisponibilité. La fraction bioaccumulée est corrélée à ces fractions (surtout à la somme des fractions soluble dans l'eau et échangeable) mais elle est une fonction de la fraction biodisponible. La bioaccumulation est un mécanisme spécifique de rétention des contaminants pour les plantes et les invertébrés, dérivant de leur système d'alimentation. La proportion de fraction biodisponible, qui dans des conditions données (pH acide ou basique, sur le tractus digestif, métabolisme spécifique) peut entraîner un effet toxique reste toujours

une inconnue. Cette corrélation n'est pas facile à établir parce que la fraction bioaccumulée peut être potentiellement毒ique, sans avoir, nécessairement, une réponse毒ique manifeste.

#### 2.4.11 Toxicité

Le Hg est un métal lourd naturel non essentiel pour les organismes vivants. Contrairement à beaucoup d'autres éléments minéraux, le Hg est toxicque sous presque toutes ses formes, tant inorganiques qu'organiques, et la spéciation prend ici toute son importance (Picot et Proust, 1998). Sa toxicité vient de son extrême volatilité, de sa relative solubilité dans l'eau et les graisses, et de sa capacité à se lier avec d'autres molécules qu'il va modifier ou dont il va transformer les fonctions. Sous sa forme inorganique, généralement majoritaire dans une matrice, le Hg a une toxicité moindre. En effet, les composés inorganiques n'ont pas la capacité d'être bioconcentrés. Par contre, d'une manière générale, tous les composés organiques sont plus dangereux (au moins un ordre de grandeur plus biodisponibles et donc plus toxiques) que les composés inorganiques, surtout les composés alkylés car ils sont plus volatils, plus stables dans les milieux biologiques et plus toxiques (Hempel *et al.*, 1995; Picot et Proust, 2000; Boening, 2000). Parmi les composés organiques, les composés alkylés sont plus toxiques que les composés arylés, le poids plus élevé des derniers limitant leur mobilité à travers les membranes biologiques. De plus, les composés alkylés sont plus stables que ceux arillés, qui peuvent facilement être transformés en Hg inorganique. Parmi les plus toxiques, on compte les ions méthyl-mercure et diméthyl-mercure qui sont de loin les plus toxiques composés du Hg et peuvent être créés à partir d'espèces minérales moins toxiques. Le méthyl-mercure est généralement présent dans de très faibles concentrations dans une matrice contaminée (moins de 1% du Hg total) (Revis *et al.*, 1989, 1990; Hempel *et al.*, 1995; Hamasaki *et al.*, 1995). Malgré ce fait, sa grande capacité de bioaccumulation dans les tissus adipeux fait en sorte qu'il représente un danger potentiel pour l'écosystème à cause de sa forte bioaugmentation dans les organismes vivants (Davis *et al.*, 1997).

La toxicité des composés organiques varie selon Hempel *et al.* (1995) dans l'ordre:

*Méthyl-mercure > Ethyl-mercure, Phényl-mercure > Nitromesol, Tolyl-Hg<sup>+</sup> > Hg<sup>2+</sup>.*

La toxicité du méthyl-mercure est aussi différente en fonction du composé dans lequel il se retrouve. Ainsi la toxicité du chlorure de méthyle-mercure ( $\text{CH}_3\text{HgCl}$ ) est deux fois supérieure à celle du hydroxy méthyle-mercure ( $\text{CH}_3\text{HgOH}$ ) (Kungolos *et al.*, 1999).

Pour les microorganismes, le Hg représente un risque majeur, même à de très faible concentration. Par exemple, le Hg inorganique produit des effets toxiques à une concentration d'environ 5 µg/l dans le milieu de culture alors que des concentrations de Hg organique 10 fois moins élevées peuvent exercer les mêmes effets. Pour les microorganismes et les organismes plus évolués, plusieurs mécanismes de protection sont disponibles contre les effets toxiques du Hg. Ceux-ci augmentent la résistance à l'action du Hg en rendant l'ion incapable de perturber l'activité normale de la cellule. Les plus importants sont : (1) élimination par désassimilation, (2) réduction enzymatique de métal à la forme élémentaire, une forme moins毒ique, (3) formation de complexes avec des polymères enzymatiques (ex. métallothionéine), (4) liaisons entre le Hg et la surface de la cellule, (5) précipitation de complexes inorganiques insolubles (des sulfures et des oxydes) à la surface de la cellule et (6) biométhylation et transport ultérieur par diffusion à travers la membrane cellulaire rendant ainsi le Hg plus toxique pour les organismes consommateurs (Wood, 1984).

Sur les récepteurs aquatiques, les effets toxiques du Hg varient en fonction de la concentration et commencent à partir de 1 mg/l Hg inorganique dans l'eau et à des concentrations beaucoup plus faibles de Hg organique (pour les plantes aquatiques). Parmi les invertébrés, la susceptibilité est variable. Les organismes les plus sensibles sont les organismes en stage larvaire (Boening, 2000). Une étude réalisée sur des oiseaux adultes a relevé que la concentration moyenne de Hg dans leurs tissus variait selon leur position dans la chaîne trophique. Ainsi les plus faibles concentrations de Hg étaient contenues dans les oiseaux végétariens (6,64 mg/kg, p/p), puis dans les oiseaux se nourrissant d'invertébrés (12,4 mg/kg), puis dans les omnivores (26,6 mg/kg), dans les oiseaux se nourrissant de poissons (40,2 mg/kg) et finalement dans les nécrophages (54,4 mg/kg) (Zillioux *et al.*, 1993). Les effets sur les récepteurs terrestres sont différents mais

avec quelques exceptions, les plantes terrestres sont généralement insensibles aux effets toxiques des composés du Hg.

Chez l'homme, les effets toxiques du méthyl-mercure sont diversifiés variant du manque de coordination à une affectation des organes vitaux et jusqu'à la mort. C'est le cas de la ville de Minamata au Japon, où les émissions du Hg dans les eaux usées d'une usine d'acétaldéhyde (utilisant comme catalyseurs des composés inorganiques du Hg, à savoir des sulfates et des chlorures) entre 1956 et 1968 ont entraîné des concentrations extrêmement élevées du Hg dans les poissons et conséquemment l'ingestion de doses fatales de Hg par la population des pêcheurs de la zone.

Il n'existe pas encore un test universel pour évaluer d'une manière appropriée la toxicité de tous les contaminants, à cause d'une très large variété d'effets toxiques produits. Cependant, l'utilisation d'une batterie des tests avec des organismes appartenant à plusieurs niveaux trophiques faisant intervenir différentes routes d'ingestion du Hg semble une option raisonnable (Hempel *et al.*, 1995; Castillo *et al.*, 2000).

Les organismes vivants jouent un rôle important dans le processus d'identification des facteurs qui contrôlent la toxicité du Hg et sa biodisponibilité, et peuvent même être utilisés pour évaluer le potentiel écotoxicologiques des sols (Hinton et Veiga, 2001). Parmi les groupes d'organismes utilisés pour étudier les effets toxiques en corrélation avec la forme du Hg et les concentration retenues dans les tissus, on trouve des plantes dont l'ail *Allium* (Panda *et al.*, 1989, 1990 et 1992) et l'orge *Hordeum vulgare* (Davis *et al.*, 1978; Panda *et al.*, 1992) et des invertébrés dont le ver de terre *Eisenia fetida* (Cocking *et al.*, 1994; Hinton et Veiga, 2001).

L'étude de Lodenius (1994) présente l'assimilation du Hg par les organismes terrestres et fait ressortir une plus forte accumulation du Hg par les jeunes plantes et surtout du Hg inorganique que du Hg organique. Une excrétion effective du Hg par plusieurs invertébrés semble inhiber la bioaccumulation dans leurs tissus. Des concentrations de Hg allant de 0,5 à 5 mg/ kg peuvent entraîner la mortalité et des taux plus élevés de reproduction du ver de terre. Les concentrations dans les tissus semblent diminuer avec

l'âge, et les espèces plus petites assimilent et excrètent plus vite que les plus grandes. L'assimilation est favorisée par de basses températures du sol et des pH faibles.

Plantes. Dans le monde végétal, en fonction de l'espèce, le Hg absorbé se trouve principalement dans les racines ou dans les feuilles. En règle générale, les plantes concentrent peu de Hg (Picot et Proust, 1998).

Selon Stein *et al.* (1996), l'assimilation du Hg par les plantes terrestres implique trois routes : l'absorption directe des vapeurs du Hg par les feuilles, la déposition atmosphérique et l'absorption par les feuilles et l'assimilation par les racines.

Toutefois dans la littérature, on trouve des résultats vraisemblablement contradictoires. Ainsi, dans certaines études l'accumulation du Hg dans les parties aériennes des plants a été observée mais sans attribuer clairement la provenance de la contamination (de l'atmosphère ou du sol) (Suszczynsky and Shann, 1995; Grigal, 2002) ou supposant une source exclusivement atmosphérique (Gaggi *et al.*, 1991 ; Fleck *et al.*, 1999). Dans d'autres études, l'assimilation du Hg du sol a été attribuée aux racines qui ont retenu la plupart du Hg bioconcentré par la plante en agissant comme d'importantes barrières contre le transport du métal vers les parties aériennes de la plante (Panda *et al.*, 1992; Edwards *et al.*, 1998).

Lindberg *et al.* (1992) ont trouvé par contre que le Hg absorbé est transféré majoritairement aux parties aériennes de la plante et conséquemment, que le feuillage concentre quelques fois plus de Hg que les racines. Par ailleurs, il y a des études où une réémission du Hg par les plantes a été trouvée (Lindberg, 1998; Lodenius *et al.*, 2003). Schwesig et Krebs (2003) justifient ces résultats par le fait que la plupart des études ont été réalisées avec des niveaux de contamination spécifiques aux sols contaminés et dans une moindre mesure aux sols non contaminés. Dans leur étude, ils trouvent des concentrations de Hg plus élevées dans les racines que les parties aériennes (et donc un transfert est possible et même une réémission du Hg).

Boening (2000) indique l'accumulation du Hg dans les tissus des plantes comme une fonction du type de sol (par exemple un sol organique va diminuer l'assimilation du Hg) et de la concentration du Hg dans le sol.

Plusieurs organismes ont été utilisés pour évaluer la pollution causée suite à l'activité d'usines chlore-alkali. Les concentrations du Hg ont été analysées dans l'herbe, le ver de terre et les petits mammifères (Bull *et al.*, 1977) et dans trois types de conifères (Maserti et Ferrara, 1991), à proximité d'usines chlore-alkali. Les résultats ont indiqué des concentrations significativement plus élevées dans tous les tissus des organismes à proximité de l'activité industrielle (0,5 km). Gonzales (1991) a échantillonné des plantes (*Mimosa pudica*) autour d'une usine de chlore-alkali (0,5 km) et a trouvé que c'était un bioindicateur très approprié pour le suivi de la pollution atmosphérique par le Hg.

Parmi les plantes, les plus forts concentrateurs de Hg du sol sont les lichens et les bryophytes (e.g. mousses) à cause de leur grande capacité de rétention du Hg provenant d'usines chlore-alkali (par déposition humide ou sèche), ce qui peut être expliqué par des valeurs élevées de la CEC de ces plantes (Calasans et Malm, 1997; Lodenius, 1994 et 1998; Fernandez *et al.*, 2000; Rea *et al.*, 2000; Rea *et al.*, 2001).

Le principal but du choix de l'orge comme organisme cible pour l'évaluation des effets toxiques du Hg dans le présent travail est le potentiel d'introduction du mercure dans la chaîne alimentaire via les produits agricoles. Comme pour d'autres plantes, le Hg retenu dans les racines peut être transféré dans le temps aux parties aériennes et même aux graines de l'orge (Davis *et al.*, 1978; Panda *et al.*, 1992). La capacité de bioconcentration du Hg dans les tissus de l'orge permet également d'obtenir une indication sur la concentration du métal biodisponible dans le sol (Panda *et al.*, 1992).

Ver de terre. En ce qui le concerne le ver de terre, son rôle est mieux connu dans la mesure où il est un invertébré simple et très étudié en raison de sa présence partout dans le monde, de son mode simple de vie et du fait qu'il constitue la source de nutrition pour plusieurs organismes supérieurs (les insectes, les poissons, les oiseaux, les reptiles et de petits mammifères). Il représente un organisme approprié pour l'étude des écosystèmes terrestres du fait de sa situation de récepteur direct des polluants et de sa représentativité biologique pour l'étude de l'accumulation du Hg dans la chaîne alimentaire. Sa tolérance est différente de celle des plantes, il est plus résistant parce qu'il possède des mécanismes de désintoxication et d'élimination spécifiques et, par conséquence, il concentre moins de

Hg dans ses tissus (Lodenius, 1994). Les essais de survie du ver de terre *Eisenia fetida* (Abasi et Soni, 1983; Edwards *et al.*, 1998; Sandoval *et al.*, 2001; Hinton et Veiga, 2002), la reproductibilité, l'incorporation et l'élimination du Hg (Fischer et Koszorus, 1992), la bioconcentration du Hg (Cocking *et al.*, 1994) ont été utilisés pour évaluer la toxicité des sols contaminés. L'accumulation du Hg a été trouvée plus importante dans les sols faiblement acides que dans les sols neutres. Dans la plupart des études, les sols industriels contaminés étudiés contenaient des concentrations de Hg relativement faibles allant de 0.422-2.43 mg/kg (Edwards *et al.*, 1998) à 28,6-33,1 mg/kg (Cocking *et al.*, 1994).

Toutefois dans une étude réalisée sur des sols artificiellement contaminés avec des concentrations du Hg plus élevées (250-500 mg HgCl<sub>2</sub>/kg), une meilleure tolérance par rapport à d'autres études a été trouvée pour le ver de terre *Eisenia fetida* (Fischer et Koszorus, 1992). Leurs résultats n'indiquent aucune mortalité pendant 8 semaines pour une contamination avec 500 mg HgCl<sub>2</sub>/ kg introduite dans le sol 2 semaines avant d'y mettre les vers.

## **CHAPITRE III**

### **MERCURY SPECIATION IN HIGHLY CONTAMINATED SOILS FROM CHLOR-ALKALI PLANTS USING CHEMICAL EXTRACTIONS**

Le chapitre III reproduit le contenu d'un article soumis le 18 septembre 2003 à la revue « Journal of Environmental Quality ». Après le titre original, les auteurs, le résumé et la problématique de la contamination des sols par le Hg provenant d'usines chlore-alkali, l'importance de la spéciation du Hg est abordée et les principales méthodes d'évaluation de la spéciation sont présentées. La partition et la spéciation du Hg dans des sols industriels de chlore-alkali fortement contaminés sont encore mal documentées, ce qui nous amène au but de cette étude. La section suivante présente la méthodologie appliquée avec des détails sur la composition et la caractérisation physico-chimique des sols, les extractions simples des différentes espèces de Hg (Hg total, méthyl-mercure, Hg volatil) et les deux variantes d'une nouvelle procédure d'extraction séquentielle mise au point lors de l'étude. Pour les analyses effectuées, des détails supplémentaires sont offerts dans les protocoles utilisés qui sont disponibles dans l'Annexe I. Les principaux résultats obtenus et leur interprétation permettent d'établir une corrélation entre certaines caractéristiques des sols et la spéciation du Hg (qui sont différentes de la littérature dans la mesure où l'on a travaillé avec des sols possédant des caractéristiques très particulières et des niveaux extrêmes de contamination), de suggérer les principales voies de dispersion du Hg à court terme et d'y introduire quelques éléments spéculatifs concernant le devenir du Hg dans les sols étudiés à long terme. À la fin, sont présentées des conclusions concernant ce chapitre du projet.

**Titre du manuscrit**

Mercury speciation in highly contaminated soils from chlor-alkali plants using chemical extractions

**Auteur et co-auteurs**

Carmen-Mihaela Caras<sup>1,2</sup>, Gérald J. Zagury<sup>1,2</sup> et Louise Deschênes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Département de génie civil, géologique et mines, École Polytechnique de Montréal

<sup>2</sup>Chaire industrielle CRSNG en Assainissement et Gestion des Sites Contaminés,  
Département de génie chimique, École Polytechnique de Montréal

**3.1 Abstract**

A four-step novel sequential extraction procedure (SEP) was developed and investigated in order to assess Hg partitioning in three highly contaminated soils from chlor-alkali plants. Total, volatile, and methyl Hg concentrations were also determined using single extractions. The physicochemical characteristics of the soils were examined to investigate the factors responsible for Hg speciation. Hg was separated into four geochemical fractions defined as water soluble (F1), exchangeable (F2) (two chemical extractants were tested), organic (F3) and residual (F4). The soil characterization revealed extremely contaminated ( $295 \pm 18.3$  to  $11500 \pm 457 \text{ mg Hg kg}^{-1}$ ) coarse-grained sandy soils having an alkaline pH (7.90 - 9.11), high chloride concentrations ( $5\text{-}35 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and very low organic carbon content ( $0\text{-}18.2 \text{ g kg}^{-1}$ ). Methyl Hg concentrations were low (from  $0.24 \pm 0.02$  to  $19.3 \pm 1.47 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ) in all soils. Sequential extractions indicated that the majority of the Hg was associated with the residual fraction (F4). In Soils 1 and 3, however, high percentages (88-98%) of the total Hg were present as volatile Hg. Therefore, in these two soils, a high proportion of volatile Hg and hence,  $\text{Hg}^0$ , was present in the residual fraction. The non-residual fraction (sum of F1, F2, and F3) was most abundant in Soil 1 (14 - 42%), suggesting a higher availability of Hg in this soil. The exchangeable Hg fraction (F2) and the sum of water soluble and exchangeable Hg fractions (F1 + F2) were both strongly correlated with the ratio of chlorides to total Hg. The developed SEP was reproducible and efficient for highly contaminated samples. Recovery (calculated as the

sum of extracted Hg fractions divided by the independently determined total Hg concentration) ranged between  $70.5 \pm 2.1$  to  $130 \pm 6\%$ .

**Abbreviations:** SEP, sequential extraction procedure; CAPs, chlor-alkali plants;

### 3.2 Introduction

Chlor-alkali plants (CAPs) which use metallic Hg for the electrolytic production of chlorine and caustic soda are potential sources of Hg pollution. Extensive research on the role of CAPs in global and regional Hg cycling has concluded that their contribution may be of limited importance on a global scale but are of particular concern to local and regional areas (Maserti and Ferrara, 1991; Rule and Iwashchenko, 1998). However, until very recently, little has been reported about the binding and mobility of soil Hg derived from emissions of CAPs (Biester et al., 2002). Furthermore, mercury binding forms and speciation in highly contaminated soils from CAPs has not yet been reported.

The contamination of soils in the vicinity of a CAP is due to emissions containing elemental Hg ( $Hg^0$ ) which is almost insoluble and can react with metallic oxides and organic matter (Schuster, 1991; Stein et al., 1996). Therefore, its mobilization in the soil is generally of minor importance although it can be reemitted in the atmosphere especially during periods of high temperature (Rule and Iwashchenko, 1998) or can be oxidized under acidic conditions and transformed into its bivalent form,  $Hg^{2+}$  (Hempel et al., 1995). Divalent Hg is a necessary precursor for the formation of compounds with increased solubility and mobility like  $HgCl_2$  and  $Hg(OH)_2$  or increased bioavailability such as methyl Hg or ethyl Hg. Therefore, as for other metals, Hg speciation is essential because it controls its solubility, volatility, reactivity, bioavailability, and finally, its toxicity (Stein et al., 1996). The toxicity of Hg is well known for some species (ex.  $HgCl_2$ ,  $CH_3HgCl$ ) but it is much more difficult to assess in real samples from contaminated sites. Furthermore, differences in the solubility of the various species of Hg affect the concentration of Hg available to the exposure pathway. The determination of speciation is an important step in the evaluation of the toxicity potential of Hg-contaminated soils from CAPs, and a strong need exists for appropriate solid phase speciation schemes.

Published groups of methods for the determination of Hg speciation include sequential extraction procedures (SEPs) (Di Giulio and Ryan, 1987; Lechler et al., 1997; Wallschläger et al., 1998; Bloom et al., 2003), short extraction techniques (Tomiyasu et al., 2000), pyrolytic extractions usually called mercury-thermo-desorption techniques (MTD) (Biester and Nehrke, 1997; Biester and Scholz, 1997), a combination of MTD with a partial sequential extraction (leaching test) (Biester et al., 2002) or x-ray absorption spectroscopy (XAS) (Kim et al., 2000).

Despite some criticism (technique validation, operational definition, limited selectivity and possible redistribution of metals) dealing with the interpretation of SEPs (Nirel and Morel, 1990), their use has continued to be recognized as a valuable tool, provided they are used with discrimination and caution (Tessier and Campbell 1991, Bloom et al. 2003, Sladek and Gustin 2003). SEPs yield pragmatic information on the possible behaviour of Hg in the soil environment by using extractions with chemical reagents which destroy the binding agent between the metal and the soil solids.

Along with its strengths, each speciation scheme also has its limitations; available SEPs for Hg are sometimes incomplete because they do not assess the volatile Hg fraction, nor were they tested on highly contaminated ambient soil samples (Di Giulio and Ryan, 1987; Wallschläger et al., 1998); The shorter published SEPs (Tomiyasu et al., 2000) were used to investigate Hg partitioning in contaminated sediments with low concentrations of Hg ( $0.086\text{-}3.46 \text{ mg kg}^{-1}$ ). As for pyrolytic extractions, they have limitations because they don't give information about Hg species in soil leachates (Biester and Scholz, 1997; Biester and Nehrke, 1997).

Although the inherent SEPs limitations remain, here we present a refined, novel Hg-specific solid phase speciation scheme, developed to be easily implemented by most heavy metal laboratories and tested on highly contaminated ambient soil samples obtained from CAPs. It consists of four steps for estimating the distinct fractions of Hg removed in specific environments (neutral, slightly acidic with exchangeable cations, alkaline with complexing extractants, strongly alkaline and strongly acidic). In addition to the sequential extractions, total, volatile, and methyl Hg concentrations were

determined on separate soil samples using single extractions. The proposed SEP was very precise and yielded satisfactory recovery percentages.

### 3.3 Materials and methods

#### 3.3.1 Sampling and preservation

The experiments were performed with three Hg-contaminated soil samples obtained from CAPs in The Netherlands, Belgium and France. Sample 1 was collected from a heap consisting of soil that had been excavated under the cell house of a CAP and stored outside for approximately three years. Sample 2 was collected in-situ from the upper soil layer (0-30 cm) after removal of aboveground vegetation, in the vicinity of a CAP. Sample 3 is a mixture of various mercury contaminated alluvial deposits and solid wastes. Upon reception in the laboratory, all samples were homogenized, stored in HDPE containers and refrigerated at 4°C. This temperature was selected in order to limit Hg volatilization (Maserti and Ferrara, 1991; Sakamoto et al., 1995). All analyses were performed in triplicate (at least) with wet soils, after removal of particles larger than 2 mm with a No.10 mesh sieve. The reported results were corrected for moisture contents.

#### 3.3.2 Soil characterization

Soil samples were characterized for pH, water content, cation exchange capacity (CEC), chlorides, total sulphur, total carbon, total inorganic carbon, total volatile solids, and particle-size distribution. The pH was measured in deionized water using a solid: liquid ratio of 1:1 according to Method D 4972-95a (American Society for Testing and Materials, 1995) using an Accumet model AR 25 pH meter and an Accumet 13-620-285 combination Ag/AgCl electrode. Moisture content was determined at 45°C to minimize Hg volatilization during drying (Maserti and Ferrara, 1991; Sakamoto et al., 1995). CEC was determined using the sodium acetate method (pH 8.2) according to Chapman (1965) and chlorides determination was performed on an aqueous soil extract, by ion chromatography separation (Dionex model DX-100) and electrochemical (conductivity) detection according to standard method 4110 (Clesceri et al., 1998). Volatile solids were determined at 550°C according to Karam (1993). Total carbon and total sulphur were measured by combustion with an induction furnace (LECO Corporation, 1975). A

phosphoric acid treatment followed by an infrared determination of CO<sub>2</sub> evolved was performed to determine total inorganic carbon (Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec, 1996). Organic carbon was calculated by the difference between total carbon and total inorganic carbon. The samples were classified as gravel (> 2 mm), sand (2 mm-75 µm), and silt and clay (< 75 µm) according to Method D 2487-83 (American Society for Testing and Materials, 1985).

### 3.3.3 Total Hg, Volatile Hg, and Methyl Hg

The total concentration of Hg in contaminated soils ( $n = 5$ ) was determined following an acid digestion scheme adapted from Akagi and Nishimura (1991). One gram of soil was accurately weighed and placed in a 100-mL volumetric flask and 14 mL of 1 HNO<sub>3</sub>:5 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:1 HClO<sub>4</sub> were added. The digestion was performed at 250°C on a hot plate (Corning PC 320 model) for one hour, and allowed to cool to room temperature. The digest was filtered (0.45 µm), and diluted with deionized water to 100 mL. Total Hg was measured by cold vapor atomic absorption spectrometry (CVAAS) (CETAC Tech. model M-6000A). The detection limit for Hg in the liquid phase was 0.1 µg L<sup>-1</sup>. Accuracy and precision of the digestion procedure for total Hg analysis were verified using a standard reference soil material (CRM 025-050). The reference value was 99.8 ± 31.7 mg kg<sup>-1</sup>, with a prediction interval (P.I.) of 31.3 - 168 mg kg<sup>-1</sup>. The average concentration ( $n = 5$ ) was 138 ± 8.9 mg kg<sup>-1</sup> and each value was within the P.I. The precision was satisfactory and, as expected, our average value was higher than the reported reference value because our digestion procedure is stronger than the aqua regia extraction (1 HNO<sub>3</sub>: 3 HCl) used in the USEPA 7471A standard method for pseudo-total Hg analysis. Hg concentrations in procedure blanks and in all reagents were always below the detection limit.

Volatile Hg was analyzed using a separate extraction by the loss of Hg vapors after the soil was heated ( $n = 5$ ). A 5-g soil sample was accurately weighed, thinly spread onto an aluminum tray, and placed into a continuously aerated oven (1400 Thermolyne model FB 1415M) at 180°C for 2 days. One gram of each heated sample was then digested using the same procedure as for total Hg determination. Volatile Hg concentration was calculated as the difference between total Hg in the sample before and after heating.

Because pyrolytic extraction of Hg at a temperature > 80°C has the potential to remove Hg from water soluble species such as HgCl<sub>2</sub> (Sladek and Gustin, 2003), volatile Hg determination was not incorporated in the sequential extraction scheme but was determined on a separate sample split.

Methyl Hg (CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>) analysis (*n* = 4) was performed by gas chromatography separation and cold vapor atomic fluorescence spectroscopy detection (GC/CVAFS) after aqueous phase ethylation, according to Liang et al. (1994). The absolute detection limit was 0.6 pg as Hg.

### 3.3.4 Sequential Extraction Procedure

Following an extensive literature review covering the determination of Hg speciation in solid samples, a novel SEP was developed, based partially on the work of Di Giulio and Ryan (1987), Lechler et al. (1997) and Wallschläger et al. (1998). The proposed SEP provides differentiation of Hg compounds into the following four fractions: F1: water-soluble; F2: exchangeable (2 alternative procedures were tested); F3: bound to organic matter, and F4: residual Hg.

In practical terms, the fractions can correspond to the following behaviors in natural conditions: F1: fraction of Hg that can be easily released, such as Hg immediately available following a simple leaching by rainwater; F2: potentially available Hg fraction under alkaline conditions (pH = 8.4) in the presence of a complexing agent (alternative 1) or under acidic conditions (pH = 5) with exchangeable cations (alternative 2); F3: Hg fraction that is available under acidic (pH = 3) or alkaline (pH = 13) conditions and; F4: Hg fraction considered to be weakly soluble and which can only be released by a strong attack of the matrix.

The sequential extractions were performed using 2 g of accurately weighed soil sample mixed with 20 mL of solvent in a 50-mL polypropylene centrifuge tube. The tubes were thoroughly shaken for 2 hours at 20 ± 2°C using a mechanical wrist-action shaker (Burrell model 75). Between each of the successive extractions and rinses, the supernatant was obtained by centrifuging (Beckman model J2-21) at 12,000 g for 15-25 minutes at 10°C. Rinsing steps consisted of washing the leached residues twice with deionized water (20

and 10 mL) for 15 min. The rinses were then added to the solvent extract from the same sample. The combined supernatant was analyzed for Hg by CVAAS. The solid residue was used in the next extraction step.

#### F1 - water-soluble compounds

The water-soluble fraction extractions were carried out in at least triplicate samples, for each of the two alternative procedures. The extraction procedure was conducted as described above using deionized water as solvent. After the rinse steps, the residue was saved for the next extraction.

#### F2 - exchangeable compounds

Panda and al. (1990) investigated three chemical extractants to assess the bioavailability of Hg (10%  $\text{HNO}_3$ , 0.025M  $\text{NH}_4\text{COOCH}_3$ /0.02M EDTA and 0.1 or 0.05M  $\text{CaCl}_2$ ) and they found that  $\text{CaCl}_2$  was the best predictor of bioavailable Hg. McLaughlin et al. (2000) also reported that  $\text{CaCl}_2$  and 0.5M  $\text{NH}_4\text{Ac}$ -EDTA were good predictors of phytoavailable metal in soils but they warned that rigorous comparisons with other procedures over a wide range of soil types were lacking. Therefore, in the present work, two chemical extractants were tested. The exchangeable fraction was extracted under alkaline conditions with a complexing agent (0.5M  $\text{NH}_4\text{Ac}$ -EDTA (pH = 8.4), (alternative 1) and under slightly acidic conditions with 1M  $\text{CaCl}_2$  (pH = 5) (alternative 2). Each method was performed on 3-4 replicates while respecting the same working conditions as described above. To prepare the 0.5M  $\text{NH}_4\text{Ac}$ -EDTA,  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  (38.54 g) and EDTA (186.12 g) were accurately weighted and separately dissolved in two 500-mL pyrex beakers using a minimal amount of deionized water in order to dissolve the crystals. For the EDTA dissolution, the pH was adjusted at 8.0 with 28 % (w/v) ammonium hydroxide. The two solutions were mixed into a standard volumetric flask ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  solution was added in first) and the volume made up to 1000 mL with deionized water.

#### F3 - organic compounds

This fraction was separated by successive extractions using 0.2 M NaOH and  $\text{CH}_3\text{COOH}$  4 % (v/v). After recuperation of the first extract (0.2 M NaOH),

$\text{CH}_3\text{COOH}$  was added. Finally, two rinses with deionized water were performed (20 and 10 mL) and then added to the  $\text{CH}_3\text{COOH}$  extract. The 0.2 M NaOH supernatant and the combined  $\text{CH}_3\text{COOH}$  supernatant were analyzed for Hg by CVAAS. The solid residue was used in the next extraction step.

#### F4 - residual compounds

Residual Hg was extracted by adding the same reagents as for total Hg to the soil pellet directly in the original 50-mL centrifuge tube. The sample was then transferred into a 100-mL standard volumetric flask. The digestion was performed using the same procedure as previously described for total Hg.

All laboratory ware utilized during the analytical procedures was cleaned sequentially with a phosphate-free detergent, soaked in 10 % (v/v) nitric acid for 24 hours, then in distilled water and finally rinsed three times with deionized water (18.2 Mohms). Unless otherwise stated, all reagents were of analytical grade (ACS) or better. Statistical treatment of data was performed using STATISTICA software (5.1 version; Statsoft, 1997).

### 3.4 Results and discussion

#### 3.4.1 Soil Physicochemical Characteristics

Table 3.1 presents the physicochemical characteristics of the three contaminated soils as well as their particle size distribution. All soils had an alkaline pH due to the former activity of CAPs. Hempel et al (1995) also reported alkaline pH values ranging from 8.6 to 9.2 in 46 soil samples collected around former caustic soda plants in East-Germany. Volatile solids ranged between  $25.4 \pm 6.7$  to  $73.7 \pm 7.1 \text{ g kg}^{-1}$ , suggesting the presence of organic matter or other volatile compounds (Hg) but organic carbon content of all soils was very low (below  $20 \text{ g kg}^{-1}$ ). The deficient organic matter content of soils and the alkaline pH should create unfavorable conditions for bivalent Hg to be sorbed (Schuster, 1991; Yin et al., 1996). Chloride concentrations were especially high in Soils 1 and 3, since naturally occurring chloride concentration in soils is about  $3.5 \text{ mg kg}^{-1}$  (Schuster, 1991). CEC was low in Soil 3 and slightly higher in Soils 1 and 2 consistent with the particle-size distribution. In general, the CECs were typical of coarse-grained inorganic

soils as the CEC of any soil is considered to arise from organic matter and clay fractions (Balasoiu et al., 2001). The percentage of particles having a diameter higher than  $75\text{ }\mu\text{m}$  was 91.1, 90.8, and 86.1 % for soils 1, 2, and 3, respectively. Soils 1 and 2 were classified as sandy soils and Soil 3 as gravelly sand with fines. The physicochemical properties of the study soils (coarse-grained sandy soils with alkaline pH, low organic carbon content and high chlorides concentrations) suggest that Hg retention should not be significant, especially for Soils 1 and 3.

### **3.4.2 Total Hg**

All soils were highly contaminated (Table 3.2), with total Hg concentrations 1 475 to 57 500 times higher than the Quebec's level A criteria (background concentration in soils) of  $0.2\text{ mg Hg kg}^{-1}$  (Ministère de l'Environnement du Québec, 1999). Compared to other published studies dealing with chlor-alkali contaminated soils, the three soil samples under study are also much more contaminated ( $80.5\text{-}104\text{ mg Hg kg}^{-1}$  (Maserti and Ferrara, 1991) and  $0.47\text{-}4.2\text{ mg Hg kg}^{-1}$  (Biester et al., 2002)). However, Bloom et al. (2003) reported a total Hg concentration of  $73\text{ }300\text{ mg kg}^{-1}$  in a surface soil sample collected under the cell house of an abandoned mercury cell CAP. For discussion purposes, the study soils will be categorized as moderately ( $295\text{ mg kg}^{-1}$  – Soil 2), highly ( $568\text{ mg kg}^{-1}$  – Soil 1), and extremely ( $11\text{ }500\text{ mg kg}^{-1}$  – Soil 3) contaminated. The small standard deviations shown in Table 3.2 highlight the good homogeneity of the soil samples and the fine reproducibility of the analytical digestion procedure.

### **3.4.3 Volatile Hg**

The highest concentrations of volatile Hg were found in Soils 1 and 3, representing 88 and 98 % of total Hg respectively (Table 3.2). The undisturbed surface Soil 2 had a lower concentration of volatile Hg ( $42.4 \pm 19.1\text{ mg kg}^{-1}$ ). The results suggest the presence of very high concentrations of  $\text{Hg}^0$  in Soils 1 and 3. Soil 3 in particular, seems to be the most hazardous from a storage or treatment perspective, with  $11\text{ }300\text{ mg Hg kg}^{-1}$  in the volatile form. Such levels are unusual, but are not odd, since Hg is used in the elemental form as a cathode in caustic soda productions. Biester and Nehrke (1997) reported that on the average, 30% of all Hg occurred as  $\text{Hg}^0$  in a highly contaminated soil by emissions

from a CAP. In a recent study (Biester et al., 2002), however, the same author reported undetectable Hg<sup>0</sup> in somewhat contaminated soils (< 4.2 mg Hg kg<sup>-1</sup>) collected in the vicinity of CAPs. It should be noted that the pyrolytic extraction applied at 180°C for 2 days simultaneously leads to the evaporation of HgCl<sub>2</sub> and Hg bound to organic matter (Biester and Scholz, 1997; Bloom et al., 2003). Therefore the result of the pyrolytic extraction should be taken as an overestimation of elemental Hg.

#### 3.4.4 Methyl Hg

Methyl Hg concentrations (Table 2) were low (from 0.24 to 19.3 µg kg<sup>-1</sup>) compared to published soil values (from 670 to 10 000 µg kg<sup>-1</sup>) used in screening, cleanup or monitoring of contaminated sites (American Petroleum Institute, 2000). No significant correlation was found between total Hg and the methyl Hg fraction. The higher organic carbon content of Soil 2 (18.2 g kg<sup>-1</sup>) did not entail a high proportion of methyl Hg (0.008 % of total Hg). Hempel et al. (1995) and Bloom et al. (2003) reported methyl Hg concentrations of 400 µg kg<sup>-1</sup> (< 0.04 % of total Hg) and 10 µg kg<sup>-1</sup> (< 0.0001% of total Hg) respectively, in polluted soils near chlor-alkali plants, stressing the site-dependent aspect of the methyl Hg fraction.

#### 3.4.5 Sequential Extraction Procedure

The precision of the developed SEP (two alternatives) was very satisfactory as reflected by the small standard deviations obtained using 3-4 replicates (Tables 3.3, 3.4, and 3.5). Recoveries (defined as the sum of extracted Hg fractions divided by the independently determined total Hg concentration) ranged from 70.5 ± 2.1 to 130 ± 6 %. The best recovery percentages were found in Soil 2 (100 ± 7 % and 110 ± 3 %). Recoveries lower than 100 % (Soil 3) might be explained by the loss of volatile Hg species during the manipulations. Recoveries higher than 100 % (typically observed for alternative 2) are explained by an increase in Hg recovered in fraction F4.

SEP results indicate that the sum of fractions F1 (water soluble), F2 (exchangeable) and F3 (organic) represent low percentages of total Hg (below 42 %, 12 %, and 5 % (method alternative 1) and below 14 %, 4 %, and 3 % (method alternative 2) for soils 1, 2 and 3, respectively. For both alternatives, the most important contribution to the sum of these

three fractions was the second extraction (F2) with results varying between 11.1-39.6 % (Soil 1), 3.1-12.0 % (Soil 2), and 2.1 - 4.4 % (Soil 3) of total Hg. In contrast, fraction F3 (Hg associated to organic matter) was very low, with percentages of total Hg ranging from 0.1 to 2.0 %, regardless of the extraction scheme. These results are consistent with the low organic carbon content of the three study soils. The Hg speciation pattern obtained in this study is, however, very different from the one found in much less contaminated organic soils around CAPs ( $< 4.2 \text{ mg Hg kg}^{-1}$ ) where  $\text{Hg}^0$  was undetectable and Hg was predominately bound to organic matter (Biester et al., 2002).

Although the water soluble fraction (F1) only accounts for at most 1.1 % of total Hg (Soil 1), this fraction is recognized as very important from an environmental risk point of view due to its easy availability in environmental weathering conditions (Wallschläger et al., 1998; Bloom et al., 2003). Moreover, even these small percentages should be treated with caution because they represent in fact very significant Hg concentrations. In the case of Soil 3, for example, although the water soluble fraction is lower than 0.5 % of total Hg, it still represents more than  $50 \text{ mg Hg kg}^{-1}$ . Such a concentration exceeds Quebec's background concentration in soils (level A) and the ecological soil criteria of Finland and Sweden (De Vries and Bakker, 1998) by a factor of 250. One explanation for the varying values obtained for the mobile fractions (F1 and F2) in the different soils may be in the ratio of chlorides/ total Hg which was positively correlated with exchangeable Hg (F2) ( $r=0.99, P=0.02$  for the SEP alternative 1, and  $r=0.99, P=0.09$  for the SEP alternative 2) and with the sum of water soluble and exchangeable Hg (F1+ F2) ( $r=0.99, P=0.03$  for the SEP alternative 1, and  $r=0.98, P=0.11$  for the SEP alternative 2). This suggests that Hg mobility increases with the ratio of chlorides/ total Hg rather than with the chloride level in soils, as previously reported (Schuster, 1991; Yin et al., 1996). The number of samples is, however, too limited to provide broad geochemical interpretation, but the observed correlations reflect the needs of future research in this area.

In all soils, the largest Hg proportion was found within the residual fraction which ranged from 65.6-70.8 % (Soil 3) to 73.5-116 % (Soil 1) of total Hg. In naturally occurring conditions, the residual fraction represents the least available form of Hg, depending on

the matrix under study and the source of contamination (Wallschläger et al., 1998; Bloom et al., 2003). In the case of Soils 1 and 3, however, this result should be interpreted in a different way due to the presence of very high concentrations of volatile Hg. Therefore, in these two soils, a high proportion of volatile Hg and hence,  $Hg^0$ , was present in the residual fraction. There is also reason to believe that for all soil samples, trace amounts of elemental Hg are present in every fraction extracted (Biester and Scholz, 1997) because it has a water solubility of approximately  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  (Bloom et al., 2003). Furthermore, the relatively lower recovery percentages for the SEPs conducted on Soil 3 ( $70.5 \pm 2.1\%$  and  $73.7 \pm 0.9\%$ ) suggest the loss of volatile Hg species during the manipulations. Volatilization of  $Hg^0$  was given as a possible explanation by Wallschläger et al. (1998) when they reported low average recoveries ( $65.8 \pm 26.4\%$  for floodplain soils and  $44.1 \pm 26.4\%$  for sediments) following their five-step extraction procedure.

Tables 3.3, 3.4, and 3.5 reveal that the exchangeable fraction obtained with 0.5M  $\text{NH}_4\text{Ac}$ -EDTA was significantly higher than that obtained with 1M  $\text{CaCl}_2$ . In the presence of alkaline conditions and EDTA, the proportion of Hg extracted was 3.5, 4, and 2 times higher for Soils 1, 2, and 3 respectively, than the proportion extracted in the presence of slightly acidic conditions and calcium chloride. Apparently the only difference between the two alternative SEPs lies in the quantity of Hg extracted in the F2 fraction. That being said, after F2 extraction, fraction F3 underwent a slight change whereas fraction F4 underwent a significant increase especially in Soils 1 and 2. This change affected the sum of fractions and consequently the recovery percentages.

Globally, Soil 1 showed the highest percentages of mobile (water soluble and exchangeable) Hg (12 or 42 % of total Hg depending on the alternative). Once again, even though the F1 fraction appears to be relatively low in terms of percentages (about 1%), it nevertheless represents a significant portion in terms of concentration (about  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ). This concentration crosses the limit that separates a safe soil for agricultural use from an unsafe one according to Panda et al. (1992). Moreover, its grain-size distribution (sandy soil) entails a high hydraulic conductivity. Hence, mobile Hg in this soil could easily migrate to deeper soil layers and disperse via pore water.

Soil 2 had the lowest concentration of total Hg ( $295 \pm 18.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and appeared to be much less dangerous in terms of volatility. This may be due to possible Hg<sup>0</sup> re-emission. The Hg from chlor-alkali plant-contaminated soils volatilizes easily, especially during seasons with elevated temperatures (Rule and Iwashchenko, 1998). The amount of Hg that may undergo mobilization in the short and medium term (F1 + F2) was relatively lower in this soil (9.5 or 35.5 mg kg<sup>-1</sup> at the most) and most Hg extracted was residual (extracted with a mixture of HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and HClO<sub>4</sub>) under the form of non-volatile weakly available Hg. A long-term contamination and a lower chloride concentration (HgCl<sub>2</sub> has approximately a water solubility of 69 000 mg L<sup>-1</sup>) could explain the extremely small fractions of water soluble Hg in this soil (0.1 % compared to 0.7-1.1 % and 0.4-0.5 % for Soils 1 and 3). Nevertheless, the Hg found in this soil remains potentially phytoavailable.

Soil 3 was extremely contaminated ( $11\,500 \pm 457 \text{ mg kg}^{-1}$ ) with 98 % of total Hg in the volatile form. According to the SEP results, the proportion of easily leachable Hg (F1+F2) was the lowest for this soil (2.6-4.8 % of total Hg), while the majority of Hg was in the residual fraction, suggesting relatively lower potential Hg mobility via pore water. However, as previously mentioned, such percentages should be treated carefully since total Hg concentration is very high in Soil 3. As a consequence, the water soluble and the exchangeable fractions actually represent important Hg concentrations (300-557 mg kg<sup>-1</sup>). Furthermore, even though the concentration of methyl Hg is relatively low ( $19.3 \pm 1.47 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), compared to values ranging from 10 to 9850  $\mu\text{g kg}^{-1}$  in various contaminated soils, sediments and tailings (Bloom et al., 2003), this species is still potentially toxic at such a concentration primarily due to its bioconcentration potential.

### **3.5 Conclusions**

In order to assess Hg partitioning in highly contaminated soils affected by the activity of CAPs, a novel four-step sequential extraction procedure was developed. Total, volatile, and methyl Hg concentrations were also determined using separate single extractions. The soil characterization revealed moderately to extremely contaminated (295-11 500 mg Hg kg<sup>-1</sup>) coarse-grained sandy soils having an alkaline pH, variable chloride

concentrations and very low organic carbon content. Methyl Hg concentrations were relatively low (from 0.24 to 19.3  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) in all soils but very high concentrations of volatile Hg were found in the highly and extremely contaminated soils (500 and 11 300  $\text{mg kg}^{-1}$ ). These results suggest the presence of very high concentrations of  $\text{Hg}^0$  in these soils. No significant correlations were found between total Hg and the methyl Hg fraction.

The developed extraction procedure distinguished water soluble (F1), exchangeable (F2) (two chemical extractants were tested), organic (F3), and residual (F4) Hg. Both extraction alternatives gave the same Hg partitioning pattern, but higher percentages in the exchangeable fraction were obtained using 0.5 M  $\text{NH}_4\text{Ac-EDTA}$ . Sequential extractions indicated that the majority of the Hg was associated with the residual fraction which ranged between 65.6-70.8 % (Soil 3) to 73.5-116 % (Soil 1) of total Hg. The residual fraction generally represents the least available form of Hg. In Soils 1 and 3, however, high percentages (88-98%) of the total Hg were present as volatile Hg. Therefore, in these two soils, a high proportion of volatile Hg and hence,  $\text{Hg}^0$ , was present in the residual fraction.

Soil 1 showed the highest percentages of mobile (water soluble and exchangeable) Hg (up to 41 % of total Hg depending on the alternative) whereas mobile Hg percentages were much lower in the two other soils. The mobile Hg (F1+F2) and the exchangeable Hg (F2) fractions were strongly and positively correlated with the chlorides/ total Hg ratio. In all soils, Hg associated with organic matter (F3) was very low, with percentages of total Hg ranging from 0.1 to 2.0 %. These results were in agreement with the low organic carbon content of the study soils. Nevertheless, it should be noted that for Soil 3, the low percentages of water soluble, exchangeable and organic-bound Hg represent in fact very significant concentrations due to its extremely high total Hg content, which for the most part, is in a volatile form.

The proposed SEP was very precise for all Hg-contaminated soils tested with satisfactory recovery percentages ranging from  $70.5 \pm 2.1$  to  $130 \pm 6$  %. Knowledge of Hg speciation in soils impacted by emissions from chlor-alkali plants yields information about the

potential Hg mobility and environmental impact but is also important in defining the decontamination strategy if one is needed. The very high total Hg concentrations in all study soils, as well as the results of Hg speciation and partitioning suggest a potential ecotoxicity. In order to confirm the likely uptake of the various Hg species by organisms and plants, bioassays were also performed on the Hg-contaminated soils using earthworm (*Eisenia andrei*) and barley (*Hordeum vulgare*). These results are expected to be published in the near future.

### **3.6 Acknowledgements**

This research was supported by Solvay and Total Fina Elf. The authors gratefully acknowledge the assistance provided by Mr. Roger Jacquet and Ms. Patricia De Bruycker of Solvay, and Dr. Frédéric Périé of Total Fina Elf. The authors also wish to thank Ms. Sandra Estrela for her help during the manuscript preparation.

### 3.7 References

- AKAGI, H. et NISHIMURA, H. (1991). Speciation of mercury in the environment. In Advances in Mercury Toxicology. Plenum Press, New York, USA, 53-76.
- AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE. BIOMONITORING TASK FORCE. (2000). A critical review of methods for developing ecological soil quality guidelines and criteria. Prepared by Ecological Planning and Toxicology, Inc., 1220 L Street, Northwest, Washington, DC 20005-4070.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. (1985). Volume 04.08. Section D2487-83: Classification of Soils for Engineering Purposes. In Annual book of ASTM standards, ASTM, Philadelphia, PA, p. 395-408.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. (1995). Volume 04.08. Section D4972-95a: Standard test method for pH of soils. In Annual book of ASTM standards, ASTM, Philadelphia, PA, p. 27-28.
- BALASOIU, C.F., ZAGURY, G.J. et DESCHÈNES, L. (2001). Partitioning and speciation of chromium, copper, and arsenic in CCA-contaminated soils: influence of soil composition. The Science of the Total Environment, 280, 239-255.
- BIESTER, H. et NEHRKE, G. (1997). Quantification of mercury in soils and sediments—acid digestion versus pyrolysis. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 358, 446-452.
- BIESTER, H. et SCHOLZ, C. (1997). Determination of mercury binding forms in contaminated soils: mercury pyrolysis versus sequential extractions. Environmental Science and Technology, 31, 233-239.
- BIESTER, H., MÜLLER, G. et SCHÖLER, H.F. (2002). Binding and mobility of mercury in soils contaminated by emissions from chlor-alkali plants. The Science of the Total Environment, 284, 191-203.
- BLOOM, N.S, PREUS, E., KATON, J. et HILTNER, M. (2003). Selective extractions to assess the biogeochemically relevant fractionation of inorganic mercury in sediments and soils. Analytica Chimica Acta, 479, 233-248.

- CHAPMAN, H.D. (1965). Cation-exchange capacity. In C.A. Black (ed.) Methods of soils analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. American Society of Agronomy, Madison, WI, p. 891-901.
- CLESKERI, L.S., GREENBERG, A.E. et A.D. EATON. (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- DE VRIES W. et BAKKER, D.J. (1998). Manual for calculating critical loads of heavy metals for terrestrial ecosystem: Guidelines for critical limits, calculation methods and input data. TNO Institute of Environmental Sciences, Energy Research and Process Innovation, Den Helder, The Netherlands.
- DI GIULIO, R.T., ET RYAN, E.A. (1987). Mercury in soils, sediments, and clams from a North Carolina peatland. Water, Air, and Soil Pollution, 33, 205-219.
- HEMPEL, M., WILKEN, R.D., GEILHUFÉ, C. et RICHTER-POLITZ, I. (1995). Transformation of elemental mercury to organic mercury species at sites of former caustic soda plants in East-Germany. In W.J. van den Brink, R. Bosman, and F. Arendt (eds) Contaminated Soils. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 505-506.
- KARAM, A. (1993). Chemical properties of organic soils. In M.R. Carter (ed) Soil sampling and methods of analysis. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, p. 459-471.
- KIM, C.S., BROWN, G.E. et RYTUBA, J.J. (2000). Characterization and speciation of mercury-bearing mine wastes using X-ray absorption spectroscopy. The Science of the Total Environment, 261, 157-168.
- LECHLER, P.J., MILLER, J.R., HSU, L.C. et DESILETS, M.O. (1997). Mercury mobility at the Carson River Superfund Site, west-central Nevada, USA: interpretation of mercury speciation data in mill tailings, soils, and sediments. Journal of Geochemical Exploration, 58, 259-267.

- LIANG, L., HORVAT, M. et BLOOM, N.S. (1994). An improved speciation method for mercury by GC/CVAFS after aqueous phase ethylation and room temperature precollection. Talanta, 41, 371-379.
- MASERTI, B.E. et FERRARA, R. (1991). Mercury in plants, soil and atmosphere near a chlor-alkali complex. Water, Air, and Soil Pollution, 56, 15-20.
- MCLAUGHLIN, M.J., ZARCINAS, B.A., STEVENS, D.P. et COOK, N. (2000). Soil testing for heavy metals. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 31, 1661-1700.
- MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT DU QUÉBEC. (1999). Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés. Les publications du Québec, Québec, QC, Canada.
- MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT ET DE LA FAUNE DU QUÉBEC. (1996). Solides – Détermination du carbone inorganique total, dosage par spectrophotométrie IR. Méthode MA.410C 1.0. Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec, QC, Canada.
- NIREL, P.M.V. et MOREL, F.M.M. (1990). Technical note. Pitfalls of sequential extractions. Water Research, 24, 1055-1056.
- PANDA, K.K., LENKA, M. et PANDA, B.B. (1990). Monitoring and assessment of mercury pollution in the vicinity of a chloralkali plant. I. Distribution, availability and genotoxicity of sediment mercury in the Rushikulya Estuary, India. The Science of the Total Environment, 96, 281-296.
- PANDA, K.K., LENKA, M. et PANDA, B.B. (1992). Monitoring and assessment of mercury pollution in the vicinity of a chloralkali plant. II Plant-availability, tissue-concentration and genotoxicity of mercury from agricultural soil contaminated with solid waste assessed in barley (*Hordeum vulgare* L.). Environmental Pollution, 76, 33-42.
- RULE, J.H. et IWASHCHENKO, M.S. (1998). Mercury concentrations in soils adjacent to a former chlor-alkali plant. Journal of Environmental Quality, 27, 31-37.

- SAKAMOTO, H., TOMIYASU, T. et YONEHARA, N. (1995). The content and chemical forms of mercury in sediments from Kagoshima Bay, in comparison with Minamata Bay and Yatsushiro Sea, southwestern Japan. Geochemical Journal, 29, 97-105.
- SLADEK, C. et GUSTIN, M.S. (2003). Evaluation of sequential and selective extraction methods for determination of mercury speciation and mobility in mine waste. Applied Geochemistry, 18, 567-576.
- STEIN, E.D., COHEN, Y. et WINER, A.M. (1996). Environmental distribution and transformation of mercury compounds. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 26, 1-43.
- SCHUSTER, E. (1991). The behavior of mercury in the soil with special emphasis on complexation and adsorption processes-a review of the literature. Water, Air, and Soil Pollution, 56, 667-680.
- STATSOFT, INC. (1997). STATISTICA for Windows (Computer program manual). 2300 East 14th Street, Tulsa, OK, USA.
- TESSIER, A. et CAMPBELL, P.G.C. (1991). Comment on " Pitfalls of sequential extractions". Water Research, 25, 115-117.
- TOMIYASU, T., NAGANO, A., YONEHARA, N., SAKAMOTO, H., RIFARDI, ŌKI, K. et AKAGI, H. (2000). Mercury contamination in the Yatsushiro Sea, south-western Japan: spatial variations of mercury in sediment. The Science of the Total Environment, 257, 121-132.
- WALLSCHLÄGER, D., DESAI, M.V.M., SPENGLER, M. et WILKEN, R.D. (1998). Mercury speciation in floodplain soils and sediments along a contaminated river transect. Journal of Environmental Quality, 27, 1034-1044.
- YIN, Y., ALLEN, H.E., LI, Y., HUANG, C.P. et SANDERS, P.F. (1996). Adsorption of mercury(II) by soil: effects of pH, chloride, and organic matter. Journal of Environmental Quality, 25, 837-844.

Table 3.1 Physicochemical characteristics of soils obtained in the vicinity of chlor-alkali plants

Soil Sample	pH†	Water content†	Volatile solids†	Total carbon	Organic carbon	Total sulphur	Chlorides	CEC‡	Particle-size distribution (%)		
									g kg⁻¹	mg kg⁻¹	cmol kg⁻¹
									> 75 µm	≤ 2 mm	≤ 75 µm
Soil 1	7.90 ± 0.05	122 ± 0.6	25.4 ± 6.7	5.80	2.40	0.63	35	12.1 ± 0.98	22.3	68.8	8.98
Soil 2	7.92 ± 0.04	47.9 ± 0.6	63.0 ± 0.8	21.5	18.2	0.51	5	10.6 ± 0.61	14.6	76.2	9.17
Soil 3	9.11 ± 0.03	98.4 ± 0.8	73.7 ± 7.1	13.9	0.00	0.27	26	5.90 ± 0.58	42.6	43.5	13.9

† Mean values and SE are calculated from 4 different determinations.

‡ Mean values and SE are calculated from 5 different determinations.

Table 3.2 Total Hg, volatile Hg and methyl Hg content of soils

Soil Sample	Total Hg† mg kg <sup>-1</sup>	Volatile Hg† %	Methyl Hg‡ μg kg <sup>-1</sup>		%¶
			%§	μg kg <sup>-1</sup>	
Soil 1	568 ± 24.2	500 ± 25.5	88.1 ± 4.5	9.49 ± 0.36	0.167
Soil 2	295 ± 18.3	42.4 ± 19.1	14.4 ± 6.5	0.24 ± 0.02	0.008
Soil 3	1.15 x 10 <sup>4</sup> ± 457	1.13 x 10 <sup>4</sup> ± 457	97.9 ± 4.0	19.3 ± 1.47	0.017

† Mean values and SE are calculated from 5 different determinations.

‡ Mean values and SE are calculated from 4 different determinations.

§ Calculated as: (volatile Hg/ total Hg) x 100.

¶ Calculated as: (methyl Hg/ total Hg) x 100.

Table 3.3 Hg partitioning in Soil 1 using the proposed sequential extraction procedure†

Soil	Total Hg mg kg <sup>-1</sup>	Fraction 1		Fraction 2		Fraction 3		Fraction 4		Sum of fractions mg kg <sup>-1</sup>	Recovery# %
		Water soluble mg kg <sup>-1</sup>	Exchangeable %	Water soluble mg kg <sup>-1</sup>	Exchangeable %	Organic mg kg <sup>-1</sup>	Residual %	mg kg <sup>-1</sup>	%		
1. A <sub>1</sub> ‡	6.46 ± 0.78	1.1 ± 0.1	225 ± 14.4	39.6 ± 2.5	7.01 ± 0.23	1.2 ± 0.0	417 ± 53.1	73.5 ± 9.4	655 ± 50.9	115 ± 9	
1. A <sub>2</sub> §	568 ± 24.2	4.08 ± 0.95	0.7 ± 0.2	63.3 ± 2.10	11.1 ± 0.4	11.5 ± 2.37	2.0 ± 0.4	661 ± 32.1	116 ± 6	740 ± 35.9	130 ± 6

† Mean values and SE are calculated from 4 different determinations for each extraction scheme.

‡ SEP alternative 1: 0.5M NH<sub>4</sub>Ac-EDTA for fraction 2.§ SEP alternative 2: 1M CaCl<sub>2</sub> for fraction 2.

|| Calculated as: (Hg extracted in concerned fraction/ total Hg) × 100.

# Calculated as: (sum of extracted Hg fractions / total Hg) × 100.

Table 3.4 Hg partitioning in Soil 2 using the proposed sequential extraction procedure†

Soil	Total Hg mg kg <sup>-1</sup>	Fraction 1		Fraction 2		Fraction 3		Fraction 4		Sum of fractions mg kg <sup>-1</sup>	Recovery# %
		Water soluble %	Exchangeable mg kg <sup>-1</sup>		Organic %		Residual mg kg <sup>-1</sup>				
2. A <sub>1</sub> ‡	295 ± 18.3	0.22 ± 0.01	0.1 ± 0.0	35.3 ± 0.45	12.0 ± 0.2	0.99 ± 0.03	0.3 ± 0.0	259 ± 21.7	87.7 ± 7.4	295 ± 21.8	100 ± 7
2. A <sub>2</sub> §		0.27 ± 0.01	0.1 ± 0.0	9.20 ± 0.32	3.1 ± 0.1	1.43 ± 0.06	0.5 ± 0.0	314 ± 7.30	106 ± 2	325 ± 7.55	110 ± 3

† Mean values and SE are calculated from 3 different determinations for each extraction scheme.

‡ SEP alternative 1: 0.5M NH<sub>4</sub>Ac-EDTA for fraction 2.§ SEP alternative 2: 1M CaCl<sub>2</sub> for fraction 2.

¶ Calculated as: (Hg extracted in concerned fraction/ total Hg) × 100.

# Calculated as: (sum of extracted Hg fractions / total Hg) × 100.

Table 3.5 Hg partitioning in Soil 3 using the proposed sequential extraction procedure†

Soil	Total Hg mg kg <sup>-1</sup>	Fraction 1		Fraction 2		Fraction 3		Fraction 4		Sum of fractions mg kg <sup>-1</sup>	Recovery# %
		Water soluble mg kg <sup>-1</sup>	%	Exchangeable mg kg <sup>-1</sup>	%	Organic mg kg <sup>-1</sup>	%	Residual mg kg <sup>-1</sup>	%		
3. A <sub>1</sub> ‡	1.15x10 <sup>4</sup> ± 457	50.6 ± 2.66	0.4 ± 0.0	506 ± 32.5	4.4 ± 0.3	6.31 ± 2.05	0.1 ± 0.0	7.52 x 10 <sup>3</sup> ± 236	65.6 ± 2.1	8.09 x 10 <sup>3</sup> ± 240	70.5 ± 2.1
3. A <sub>2</sub> §		53.4 ± 1.59	0.5 ± 0.0	246 ± 18.4	2.1 ± 0.2	35.3 ± 4.17	0.3 ± 0.0	8.12 x 10 <sup>3</sup> ± 125	70.8 ± 0.9	8.45 x 10 <sup>3</sup> ± 108	73.7 ± 0.9

† Mean values and SE are calculated from 4 different determinations for each extraction scheme.

‡ SEP alternative 1: 0.5M NH<sub>4</sub>Ac-EDTA for fraction 2.§ SEP alternative 2: 1M CaCl<sub>2</sub> for fraction 2.

|| Calculated as: (Hg extracted in concerned fraction/ total Hg) x 100.

# Calculated as: (sum of extracted Hg fractions / total Hg) x 100.

## CHAPITRE IV

### MERCURY PARTITIONING, BIOCONCENTRATION, AND ECOTOXICITY IN HIGHLY CONTAMINATED SOILS FROM CHLOR-ALKALI PLANTS

Le chapitre IV est présenté sous la forme d'un article préparé en vue d'être soumis dans le futur. Sa structure respecte celle du chapitre III. Le résumé est suivi par la présentation de la problématique de la toxicité et de la biodisponibilité du Hg pour certains organismes exposés aux sols contaminés. Des essais d'association de la spéciation du Hg aux effets toxiques et à sa biodisponibilité dans le sol contaminé ont été trouvés dans la littérature. Toutefois aucune procédure d'extraction séquentielle n'a été appliquée directement aux sols fortement contaminés par les émissions d'usines chlore-alkali. De plus, les résultats des procédures développées n'ont pas été significativement corrélés à la toxicité et à la bioaccumulation du Hg dans les organismes vivants. Les corrélations entre les fractions du Hg dans le sol, telles que celles obtenues par les extractions séquentielles, et leur biodisponibilité restent donc un problème non solutionné, manque qui justifie le travail présenté. La section de méthodologie présente les essais d'inhibition de la germination et la croissance de l'orge (*Hordeum vulgare*) et de mortalité du ver de terre (*Eisenia andrei*) réalisés dans les laboratoires de CEAEQ et insiste sur des détails concernant les conditions de travail, l'observation des effets toxiques du Hg tout au long des tests et l'échantillonnage en vue de l'analyse du Hg bioconcentré dans les tissus des organismes exposés. Les protocoles utilisés pour certaines analyses effectuées sont disponibles dans l'Annexe I. L'interprétation des résultats à l'aide du logiciel STATISTICA confirme l'existence de corrélations significatives entre la concentration totale du Hg et les effets toxiques, de même qu'entre la partition et la spéciation du Hg et les facteurs de bioconcentration (BCF). Les conclusions concernant ce chapitre sont présentées à la fin du mémoire.

#### 4.1 Abstract

Mercury partitioning, speciation, bioconcentration, and ecotoxicity were investigated in three highly contaminated soils from chlor-alkali plants. Single extractions and a four-step sequential extraction scheme were used in order to assess Hg speciation and partitioning. Total, volatile, and methyl Hg concentrations were determined. Hg was then separated in fractions defined as water soluble (F1), exchangeable (F2), organic (F3) and residual (F4). In order to evaluate the toxicity of Hg-contaminated soils, germination and growth inhibition of barley (*Hordeum vulgare*) and mortality of earthworms (*Eisenia andrei*) were assessed. Results revealed highly (295-11500 mg Hg/kg) contaminated soils but extracted fractions indicated relatively low mobility of Hg. The highest mobile fraction (F1+F2) was found in Soil 1 (12 % of total Hg) whereas the lowest mobile fraction was found in Soil 3 (2.6% of total Hg). Tissues Hg concentrations of exposed organisms (roots and aerial parts for barley and whole organism for earthworms) were determined to establish bioconcentration factors (BCFs). BCFs were higher in barley (up to 7.41 in aerial parts and 11.6 in roots) compared to earthworms (up to 2.48). Additionally, highest BCFs were found in Soil 1 where Hg was more mobile. Rigorous and detailed relationships have been established between soil extractable Hg and tissues-Hg. The toxic effects and BCFs in barley were positively correlated with easily extractable Hg, while in earthworms both were correlated with total and mobile mercury.

**Keywords:** Hg speciation, bioconcentration, toxicity, barley, earthworms, chlor-alkali contaminated soil

#### 4.2 Introduction

Hg is a mobile and persistent heavy metal that becomes more concentrated as it passes through the food chains of ecosystems [1]. It is a non-essential element with no known physiological significance and, therefore, is not metabolized by most organisms [2]. As a consequence, even low concentrations may result in serious toxicity for human beings and ecosystems. Its toxicity will vary depending on the chemical structure and the solubility of the species [3]. Therefore, its bioavailability and toxic effects are not only dependent upon total Hg concentrations but are largely influenced by speciation [4, 5, 6].

Interest in Hg speciation in soils has increased in last decades because prediction of metal mobility is essential for impact assessments [7]. Depending on the reagents used, chemical extractions will yield total Hg concentrations or give indications regarding the mobility and potential bioavailability. Biological organisms are however necessary to accurately assess Hg bioavailability. Bioassays should be considered as a complement to chemical extractions and not as a replacement for them [8]. Given its toxicity and its capacity to bioaccumulate along the food chain, Hg often poses a high ecotoxicological risk for terrestrial organisms such as plants and invertebrates. Direct analysis of tissues from organisms exposed to specific or laboratory conditions can provide evidence of Hg bioavailability [6]. Bioaccumulation in biota depends on the metal bioavailability for uptake by the organisms and is influenced by soil chemical factors, exposure routes for uptake and characteristics of the organisms [8,9]. Thus, ecotoxicological assessments of Hg contaminated soils are currently based on toxicity tests with a set of various species from different trophic levels, with different exposure routes [2]. Concordance of the results among bioassays can be used to categorize potential risk of the soils.

A few studies has been carried out to asses the extent of Hg pollution using plants [10, 11, 12]. Due to its phytotoxicity even in low concentrations in the soil solution, toxic effects on the roots are mainly determined by the amount of soluble Hg. In this sense the total Hg concentration should be less important than the soluble fraction [4]. Crop plants such as Barley (*Hordeum vulgare*) are appropriate for Hg-uptake study because they represent a direct link for transportation from soil to humans. Furthermore, it is easy to grow and to sample in the laboratory, and it has been successfully used in experiments to assess plant-availability and tissue-concentration of Hg [10, 11]. Terrestrial invertebrates have also been used as indicators of lethal toxicity. Hg has been shown to be toxic to terrestrial biota over a broad range of concentrations [13]. Earthworms are particularly suitable as important organisms of many ecosystems in terms of biomass, as food for many animals, and thus providing a route through which contaminants may be transferred to higher trophic levels. Moreover, they are easily grown in the laboratory, intensively

studied and approved for use in toxicity testing [14]. Substantial evidences indicate that they accumulate Hg from contaminated soils [15, 16, 12].

Despite the widespread knowledge that Hg binding forms and speciation are key factors for conducting ecotoxicological hazard assessments, very few attempts have been made in order to ascertain the relations between Hg fractionantion and speciation in contaminated soils and its uptake by biota. Furthermore, these scarce studies were conducted using slightly contaminated soils. Panda et al. (1992) [11] used barley to assess plant-availability and Hg tissue-concentration using an agricultural soil artificially contaminated with solid waste deposits of a chlor-alkali plant (CAP). Hg from contaminated diluted soils (21.9-103 mg Hg/kg) was extracted with 0.05M CaCl<sub>2</sub>, 0.025M NH<sub>4</sub>Ac/ 0.02M EDTA and 10% HNO<sub>3</sub>. Correlation analysis between extractable-Hg and tissue-Hg indicated that CaCl<sub>2</sub>-extractable-Hg was best correlated with 7-day-old shoot-Hg, whereas 10%HNO<sub>3</sub> extractable-Hg was best correlated with root-Hg. Assessment of Hg uptake in plants (*Urtica dioica*) growing naturally on Hg contaminated dredge spoil (0.84-7.42 mg Hg/kg) and in earthworms (*Eisenia fetida*) grown on similar soil (2.48 mg Hg/kg) under laboratory conditions, was recently studied in relation with soil extractable Hg [12]. Sequential extractions (with 0.005 M DTPA and with 10% HNO<sub>3</sub>) were conducted to determine the most suitable sequential extraction scheme for predicting plant tissues-Hg. A good correlation between total Hg in soil and root-Hg was obtained, but no correlation could be established between soil extractable Hg and plant-tissue concentration with the chemical extractants used in the study. Calasans and Malm (1997) [17] evaluated atmospheric Hg<sup>0</sup> contamination in a chlor-alkali industrial facility by the use of a transplanted moss species (*Tillandsia usneoides*). They found that plants promptly and efficiently accumulated Hg present in the environment. However, to date, a strong need exists to predict Hg biota uptake and potential toxic effects in the vicinity of industries such as CAPs, based on knowledge of Hg partitioning and speciation in contaminated soils.

The present study is a continuation of an earlier paper where partitioning and speciation of Hg was evaluated in extremely contaminated soils collected nearby three CAPs [18].

In the first part of the study, the order of potential Hg mobility in the soils was ascertained based on the results of a novel four-step Hg-specific sequential extraction procedure (Soil 1>Soil 2>Soil 3). The second part of the study focuses on Hg toxicity evaluation in relation to total Hg content, partitioning and speciation, and metal uptake. In order to evaluate the toxicity of Hg-contaminated soils, germination and growth inhibition of barley (*Hordeum vulgare*) and mortality of earthworms (*Eisenia andrei*) were assessed. Tissues Hg concentrations of exposed organisms (roots and aerial parts for barley and whole organism for earthworms) were determined to establish bioconcentration factors (BCFs). Correlations between total Hg, extractable Hg, BCFs, and toxic effects were investigated.

#### 4.3 Materials and methods

##### 4.3.1 Soil sampling

The experiments were performed with three Hg-contaminated soil samples obtained from CAPs in The Netherlands, Belgium and France. Sample 1 was collected from a heap consisting in soil that had been excavated under the cell house of a CAP and stored outside for approximately three years. Sample 2 was collected in the vicinity of a CAP from the upper soil layer (0-30 cm), after removal of aboveground vegetation. Sample 3 is a mixture of various mercury contaminated alluvial deposits and solid wastes. Upon reception in the laboratory, all samples were homogenized and stored at 4°C in HDPE containers.

##### 4.3.2 Physicochemical characterization of contaminated soils

Soil samples were characterized for pH, cation-exchange capacity (CEC), total carbon, total inorganic carbon and particle-size distribution. The pH was measured in deionized water using a solid: liquid ratio of 1:1 according to Method D 4972-95a of American Society for Testing and Materials [19] using an Accumet Model AR 25 pH meter and an Accumet 13-620-285 combination Ag/AgCl electrode. CEC was determined using the sodium acetate method at pH 8.2 [20]. Total carbon was measured by combustion with an induction furnace (LECO Corporation, 1975). A phosphoric acid treatment followed by an infrared determination of CO<sub>2</sub> evolved was performed to determine total inorganic

carbon [21]. Organic carbon was calculated by difference between total carbon and total inorganic carbon. The soil water content was determined by weighing the sample, drying it to constant mass at 45°C, and reweighing it. The samples were classified as gravel (> 2 mm), sand (2 mm-75 µm), and silt or clay (< 75 µm) according to Method D 2487-83 [22]. All analyses were performed on triplicate at least, with wet soils, after removal of particles larger than 2 mm with a No.10 mesh sieve. The results reported were corrected for moisture contents.

#### 4.3.3 Extraction procedures

*Soils.* In order to assess the more readily mobile fractions in soils, speciation and partitioning of Hg were carried out by single and sequential extractions. Total, volatile, and methyl Hg concentrations were determined by single extractions on separate soil samples. The total concentration of Hg in contaminated soils ( $n=5$ ) was determined following an acid digestion of one gram of fresh soil samples, accurately weighed in a 100 ml volumetric flask, with 14 ml of 1 HNO<sub>3</sub>: 5 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 1 HClO<sub>4</sub>. The digestion was performed at 250°C on a hot plate (Corning PC 320 model) for one hour, and allowed to cool to room temperature. The digest was filtered (0.45 µm), and diluted with deionized water to 100 ml. Total Hg was measured by cold vapor atomic absorption spectrometry (CVAAS) (CETAC Tech. model M-6000A). The detection limit for Hg in the liquid phase was 0.1 µg/l. Accuracy and precision of the digestion procedure for total Hg analysis were verified using a standard reference soil material (CRM 025-050). Volatile Hg concentration in soil was calculated as the difference between total Hg in the soil sample before and after heating at 180°C for 2 days. Methylmercury (CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>) analysis ( $n=4$ ) was performed by gas chromatography separation and cold vapor atomic fluorescence spectroscopy detection (GC/CVAFS) after aqueous phase ethylation, according to Liang et al. (1993) [23]. The detection limit was 0.6pg as Hg.

To better estimate the potential of Hg species migration and transport the metal was separated into fractions defined as water soluble (F1), CaCl<sub>2</sub> exchangeable (F2), organic (F3) and residual (F4). The extraction procedure was performed using a 1:10 (solid: liquid) ratio. After each solvent extraction, two rinsings with deionized water were

performed and the rinses were added to the solvent extract form the same sample. The water soluble fraction was extracted with deionized water, while for the exchangeable fraction separation solution of 1M $\text{CaCl}_2$  was utilised. The organic fraction was extracted in subsequent acidic (4%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , v/v) and alkaline (0.2M NaOH) conditions. The remaining Hg considered as residual was obtained by acid digestion. Residual Hg in digest and Hg concentrations in extracts were analysed by CVAAS. All the details regarding the developed extraction scheme are presented elsewhere [18].

*Barley and earthworms.* The same digestion procedure as the one described for total Hg determination in soil samples was performed for Hg-tissue analysis [11, 12, 16]. Dried samples of roots, aerial plants and earthworms were accurately weighted, placed in a 50 ml volumetric flask and digested in triplicate with 7 ml of a mixture of 1  $\text{HNO}_3$ : 5  $\text{H}_2\text{SO}_4$ : 1  $\text{HClO}_4$ . The digestion was performed at 250°C on a hot plate (Corning Model PC 320) for 1 hour. The extract was filtered (Whatman GF/F, 0.45 $\mu\text{m}$ ) and diluted with deionized water to 50 ml into a volumetric flask. Total Hg concentration was measured using CVAAS.

#### 4.3.4 Bioassays

##### *Hordeum vulgare* germination and growth inhibition

*Hordeum vulgare* germination and growth inhibition tests were conducted according to a modification of the standard procedure of the province of Québec's Ministry of the Environment [24]. Samples (15 g wet) of sieved (< 2mm) soil were transferred in 25ml sealed pots and maintained at 20% moisture content, in a culture room at 24±2°C. Seeds of *H. vulgare* (Coopérative régionale de Rivière-du-Loup, QC, Canada) were sown for germination under a photoperiod (light: dark cycle) of 16: 8 h at a light intensity of 4300±10% lux, for 14d. The pH and the conductivity of soils were kept approximately constant during the test. The experiments were conducted in triplicate with 6 pots per replicate and one seed per assay recipient. Plants were observed for visible response and the percentage of germination was recorded at 3 and 14d. On day 7 and day 14, randomly selected whole plants (in triplicate) were removed from the soil. Roots and shoots length were measured. All plants were sequentially washed thoroughly in running tap-water to

remove surficial deposits, followed by rinsing with distilled water. The different parts (roots and aerial plants) were separated and dried at 45°C for 48hrs, to constant weight, for analysis of tissue Hg concentrations in relation to the treatment levels at different stages of plant development. Uncontaminated experimental soil was used for the negative controls and treated similarly. The experiments were also conducted with diluted uncontaminated and contaminated soils in different ratios to give a range of concentrations. The intent was to mix the soils in order to obtain an intermediate soil Hg level. The performed dilutions were 100%, 75%, 56%, 42% and 32% (for soil 1 and soil 2) and 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.13%, 1.56% and 0.785 (for soil 3). The characteristics of the soil used for dilutions were: 5% kaolinite, 3% black humus from Sphagnum peat moss, 22% silt (20-75  $\mu\text{m}$ ) and 70% sand (106-250  $\mu\text{m}$ ). The pH of this soil was 6.8-7.0 and the holding capacity was 36%. Endpoints as EC<sub>50</sub> and IC<sub>25</sub> and IC<sub>50</sub> for roots and shoots length of barley were calculated using the Linear Interpolation (ICp) Method [25].

#### *Eisenia andrei* mortality

*Eisenia andrei* survival tests were carried out according to a modification of the standard procedure of the province of Québec's Ministry of the Environment [26]. Two hundred grams of sieved soil (< 2mm) were transferred in plastic pots and 10 organisms were added to each recipient. The experiments were performed in triplicate. *Eisenia andrei* were selected for testing on the basis of similarity in size and maturity, as evidenced by the presence of a fully developed clitellum. The bioassays were conducted at 20±2°C under the dark, for 21 day, at a soil moisture content of 95% of the water holding capacity. Soil moisture content was adjusted by replenishing weight loss with the appropriate amount of millipore water. As for barley, soil pH was constant during the test. The number of survivors was recorded weekly. After a specific time period (7, 14, and 21-day), randomly whole earthworms (in triplicates, for each soil) were removed from the soil and prepared for Hg-tissue analysis. The earthworms were washed with cold tap water, placed into glass finger bowls lined with Whatman filter paper, and allowed to naturally empty digestive tract. The filter paper was changed every 12 h over a 48hrs

period to facilitate elimination of Hg clinging to the earthworms. The earthworms were rinsed in deionized water and killed by deep freezing (-20°C). The frozen earthworms were then thawed at room temperature and dried at 45°C for 48hrs, to constant weight. Uncontaminated experimental soil was used for the negative controls. The experiments were also conducted with diluted uncontaminated and contaminated soils to give a range of concentrations. The same dilutions as in the plant assay were performed for soil 1 and soil 2, whereas for soil 3 the dilutions were 100%, 50%, 25%, 12.5%, and 6.25%. For this last soil, all the concentrations were tested with 2 replicates. Endpoint as LC<sub>50</sub> for earthworms was calculated with Probit Method [27].

#### 4.3.5 Data analysis

##### Bioconcentration factors (BCFs)

The tissues-Hg concentrations for living organisms were used to establish the BCFs. Hg bioavailability was evaluated by measuring tissues-Hg concentrations of the exposed organisms (barley and earthworms) and BCFs were calculated as the ratio of body- or specific tissue (aerial plants and roots of barley) and soil total Hg concentrations.

##### Statistical analysis

The endpoints (growth inhibition, IC<sub>25</sub> and IC<sub>50</sub> at 14d of roots for barley and mortality for earthworms) as well as BCFs were subjected to correlation analysis against soil-Hg partitioning levels, total Hg, volatile Hg and methyl Hg concentrations. Significance was determined at  $p < 0.05$ . All statistical treatments of the data were performed using STATISTICA 5.1 version software [28].

#### 4.4 Results

##### 4.4.1 Physicochemical properties of soils

Composition and physicochemical characteristics analysis revealed the soils had an alkaline pH with values of  $7.90 \pm 0.05$  (Soil 1), to  $7.92 \pm 0.04$  (Soil 2) and  $9.11 \pm 0.03$  (Soil 3). This pH range is typical of contaminated soils originating from CAPs. Organic carbon was very low in all soils with values of 0.00% (soil 3), 0.24% (soil 1), and 1.82% (Soil 2). Particle-size distribution analysis indicated sandy soils with the majority of particles having a diameter higher than 75  $\mu\text{m}$  (91.1 %, 90.8 %, and 86.1 % for soils 1, 2,

and 3 respectively). Soils 1 and 2 were classified as sandy soils although soil 2 showed traces of organic matter. Soil 3 was a gravelly sand with fines. The cation exchange capacities were 12.1 meq/ 100g (soil 1), 10.6 meq/ 100g (soil 2) and 5.9 meq/ 100g (soil 3). These values are typical of coarse-grained inorganic soils.

#### 4.4.2 Hg speciation and partitioning in soils

All soils were highly contaminated (Table 4.1), with total Hg concentrations 1 475 to 57 500 times higher than the Quebec's level A criteria (background concentration in soils) of 0.2 mg Hg kg<sup>-1</sup> [29]. The highest concentrations of volatile Hg were found in Soils 1 and 3, representing 88 and 98 % of total Hg respectively. The undisturbed surface Soil 2 had a lower concentration of volatile Hg (about 14% of total Hg). The concentrations of methyl Hg were low (0.24 (Soil 2), 9.49 (Soil 1), and 19.3 µg/Kg (Soil 3)), accounting for relatively low levels (0.008-0.167%) of total Hg. SEP results indicate that the sum of fractions F1 (water soluble), F2 (exchangeable) and F3 (organic) represent low percentages of total Hg (below 14 %, 4 %, and 3 % for soils 1, 2 and 3, respectively). The most important contribution to the sum of these three fractions was the second extraction (F2) with results varying between 11.1 % (Soil 1), 3.1 % (Soil 2), and 2.1 % (Soil 3) of total Hg. In contrast, fraction F3 (Hg associated to organic matter) was very low, with percentages of total Hg ranging from 0.3 to 2.0 % of total Hg. These results are consistent with the low organic carbon content of the three study soils. The water soluble fraction (F1) accounts for the lowest amounts (at most 0.7% of total Hg in Soil 1), but this fraction is very important from an environmental risk point of view due to its easy availability in environmental weathering conditions. Soil 1 showed the highest percentages of mobile (water soluble and exchangeable) Hg (12 % of total Hg). Soils 2 and 3 had lower fractions of mobile Hg (3.2%, and 2.6% respectively). However, such percentages should be treated carefully since total Hg concentration is very high in Soil 3. As a consequence, the water soluble and the exchangeable fractions actually represent important Hg concentrations (300 mg/kg) in this soil. In all soils, the largest Hg proportion was found within the residual fraction which ranged from 70.8 % (Soil 3) to 116 % (Soil 1) of total Hg. In naturally occurring conditions, the residual fraction

represents the least available form of Hg. But in the case of Soils 1 and 3, however, this result should be interpreted in a different way due to the presence of very high concentrations of volatile Hg.

The precision of the developed SEP was very satisfactory as reflected by the small standard deviations obtained using 3-4 replicates. Recoveries (defined as the sum of extracted Hg fractions divided by the independently determined total Hg concentration) ranged from  $73.7 \pm 0.9$  to  $130 \pm 6$  %. The best recovery percentages were found in Soil 2 ( $110 \pm 3$  %).

#### **4.4.3 Seed germination and growth inhibition of *H. vulgare***

Little variation of seed germination inhibition was observed in non diluted soils 1 and 2 with respectively 5.6% and 11% of germination inhibition. At the same time (14d), an important decrease in seed germination (40%) was observed in Soil 3. In this soil, the 7d germination was totally inhibited and morphological symptoms (plants became severely chlorotic with yellow leaves and stunted growth) appeared as characteristics features of stress at 14d. The shoots of barley appeared shorter and thinner with roots severing affected and little developed compared with control plants and those exposed to lower treatment levels (soil 1 and 2) was also observed. The 14d growth inhibition (%) of barley compared with control was different with in the three soils and showed increased toxicity from Soil 2 (15.2 for shoots and 31.0 for roots) to Soil 1 (20.2 for shoots and 63.7 for roots) and Soil 3 (38.8 for shoots and 92.2 for roots).

Dry mass of 14d roots of barley varied from  $33.0 \pm 3.6$  (control 1) to  $10.7 \pm 1.2$  mg (Soil 1), from  $24.9 \pm 8.6$  (control 2) to  $7.2 \pm 1.9$  mg (Soil 2), and from  $41.2 \pm 4.7$  (control 3) to  $15.3 \pm 1.0$  (Soil 3). The corresponding 14d dry mass of aerial plants of barley ranged from  $49.6 \pm 8.5$  to  $37.0 \pm 11.3$  mg (Soil 1), from  $39.6 \pm 4.4$  to  $24.3 \pm 21.3$  mg (Soil 2), and from  $49.0 \pm 9.3$  to  $50.8 \pm 3.9$  mg (Soil 3). The endpoints as  $IC_{50}$  and  $IC_{25}$  at 7 and 14d for both roots and shoots length were calculated (Table 4.2).

#### **4.4.4 Mortality of *E. andrei***

In order to evaluate Hg toxicity, survival of the worms was observed throughout the laboratory experiments. The results revealed 0% mortality in the control. No mortality

occurred also during the 21d incubation in the contaminated soils at concentrations of Hg of 295 mg/kg (Soil 2) and 568 mg/kg (Soil 1). At the highest tested concentration (Soil 3 - 11 500 mg/kg), the mortality was 5% (7d), 85% (14d), and 100% (21d). Distinct earthworm behavior, judged against the common pattern observed in control soil was noted in this soil, where divided worms were often observed. The fragmentation and survival of fragments is presented in Table 4.3. However, at the end of the test the number of entire worms was sufficiently high for LC<sub>50</sub> calculation. The 7d LC<sub>50</sub> was higher than test concentration (11 500 mg Hg/kg), whereas the 14d LC<sub>50</sub> was 7000 mg/kg and the 21d LC<sub>50</sub> was below 2000 mg/kg. The above fragmentation diminished with a soil dilution of 12.5% of total Hg (about 1430 mg/kg) and totally ceased for the soil dilution of 6.25% of total Hg (about 717 mg/Kg). All the parameters calculated for Soil 1 and Soil 2 (7, 14, and 21d LC<sub>50</sub>), as well as for Soil 3 revealed that the tested concentrations manifested non lethal effects on 50% of earthworms. At the end of the tests, the change in dry mass ranged from 159.7±38.2 (control 1) to 105.4±3.2 mg (Soil 1) and from 137.2±30.4 (control 2) to 143.3±8.7 mg (Soil 2). In Soil 3 measured dry mass variation was possible up to 7 day and was 137.9 mg compared with control (215.9±79.6 g) to 137.9 mg.

#### 4.4.5 Tissue Hg concentrations and BCFs

Barley *Hordeum vulgare*. The internal concentrations in roots and aerial plants increased progressively with the age of the plants, between 0 and 14 day but BCFs showed large variability among the soils (Figure 4.1). However, the tissues-Hg for barley showed very similar trend in Soils 1 and 2 relating tissues-Hg in barley to Hg concentrations in soils and duration of exposure (Table 4.4). In Soil 1 the 14d Hg concentrations raised up to 4200 mg/kg in aerial plants and up to 6560 mg/kg in roots, while in Soil 2 the same concentrations were only 20.6 mg/kg in aerial plants and 510 mg/kg in roots. The total inhibition of seed of barley germination at 7d in Soil 3 maybe allowed the lower 14d Hg tissues concentrations (1750 mg/kg and 2090 mg/kg in aerial plants and roots respectively) compared with Soil 1. However, as results showed, *H. vulgare* accumulated Hg at substantially higher levels in roots than in aerial plants and consequently roots to

aerial plants ratios were calculated. They varied from 1.56 (14d)-3.62 (7d) (Soil 1) to 19.4 (7d)-24.8 (14d) (Soil 2), and 1.19 (14d) (Soil 3). Furthermore, Hg enrichment factor (EF) in exposed organisms (%) from 7 to 14d, i.e. the ratio between the concentrations of Hg at 7d and at 14day, were 30.8 and 26.2 in roots, and 13.3 and 33.5 in aerial plants, for Soil 1 and Soil 2 respectively.

The 7d BCFs were 0.983 in aerial plants and 3.56 in roots (Soil 1), while the 14d BCFs were higher (7.41 and 11.6 respectively). In Soil 2, the correspondingly BCFs were lower in aerial plants (0.023 and 0.07), as well as in roots (0.453 and 1.73). In Soil 3, total seeds germination inhibition at 7d made the BCFs calculation not possible. Only the 14d BCFs were calculated with values of 0.152 in aerial plants and 0.182 in roots.

*Earthworm Eisenia Andrei.* As for barley, Hg concentrations in the body of earthworms increased progressively during the test with increased environmental Hg load (Figure 4.2). The same pattern emerged for Soils 1 and 2 (Table 4.4) with BCFs values varying from 0.85 to 2.48 (Soil 1), and from 0.321 to 0.605 (Soil 2). As for the Soil 3, the extremely high concentrations of Hg were too toxic for earthworms and strong percentages of mortality (5%, 85% and 100% at 7, 14 and 21d), with irrecoverable tissues that made impossible the digestion and thus, the 14 and 21d BCFs calculation. However, a very low 7d BCF (0.08) was found. A similar enrichment factors (EF, %) was calculated by the ratio of Hg concentration at 7 and 14d, and at the end of the test (21d). The values found were of 34.2 and 53.1 (at 7d) and 69.7 and 78.0%, for Soil 1 and Soil 2, respectively.

#### 4.4.6 Correlations

*Barley.* The influence of speciation and partitioning on Hg uptake was verified by comparison between the results of soils extractions, toxic effects and tissues-Hg concentrations which produced good correlations (Table 4.5). As results indicated, the shoots grow inhibition (%) was significantly positively correlated with exchangeable fraction (mg/kg) at 7d ( $r=0.999, p=0.021$ ) and at 14d ( $r=1.00, p=0.011$ ) and with sum of soluble and exchangeable fractions (mg/kg) at 7d ( $r=1.00, p=0.002$ ) and at 14d ( $r=1.00, p=0.008$ ). A good correlation was found also between the roots growth inhibition at 7d

(%) and the exchangeable fraction (mg/kg) at 7d ( $r=0.993, p=0.076$ ) and the sum of the soluble and exchangeable fractions (mg/kg) ( $r=0.989, p=0.095$ ). A less significant correlation was found between roots growth inhibition (%) and the exchangeable fraction (mg/kg) at 7d ( $r=0.942, p=0.218$ ) and with the sum of soluble and exchangeable fractions (mg/kg) at 14d ( $r=0.931, p=0.238$ ). BCFs in aerial plants and roots of barley, as measure of metal uptake were significantly correlated with the sum of water soluble and exchangeable fractions (%) at 14d ( $r=0.998, p=0.043$ ).

*Earthworms.* As for barley, comparison of soils extractions results with the concentrations of Hg in earthworms produced good correlations. The mortality (%) was significantly correlated with total Hg (mg/kg) ( $r=1.00, p=0.014$ ), as well as with soluble fraction (mg/kg) ( $r=0.998, p=0.041$ ). The BCFs were also the best correlated with the total Hg (mg/kg) at 14d ( $r=1.00, p=0.007$ ) and 21d ( $r=1.00, p=0.003$ ) and with water soluble fraction (mg/kg) at 14d ( $r=0.99, p=0.034$ ) and at 21d ( $r=0.99, p=0.030$ ).

#### 4.5 Discussion

Barley *H. vulgare*. Data indicated retarding effects on germination and growth in barley in the presence of higher concentrations of Hg. As previously mentioned, the plants grown in Soil 1 (with 568 mg Hg/kg) and Soil 2 (with 295 mg Hg/kg) exhibited no visible signs of Hg toxicity stress. Indeed, such concentrations are highly toxic to most plants. Yet, plants can be found growing in highly contaminated soils, as a result of the evolution of metal tolerance [30]. Therefore, for most elements, visual toxicity symptoms became apparently only in severely poisoned plants. Along the trophic chain, the toxicity of an ingested element depends of many factors including the amount eaten, the age and health of the organism, and the balance of other elements in the diet [30]. Hg in vegetation may have harmful effects on the plants themselves. But there is also a wider ecological aspect in that Hg can pass from the vegetation into the food-chains of the fauna. For animals, the critical levels of Hg in herbage appear to be lower than those for the barley plant itself, so animals may be poisoned by apparently healthy plants [10]. Since the shoot is the most easily harvestable part of the plant, the accumulation of high concentrations in above-ground biomass could be very hazardous for barley consumers.

The concentration in the body of an exposed organism may be a better and more useful indicator for the dose at the site of toxic action and may provide a more direct and toxicologically relevant estimate than the concentration of contaminant in soil [31].

Generally, Hg uptake is most efficient in young plants [4]. This was not observed in the present study, since tissues-Hg analysis, in Soil 2 (295 mg/kg) and Soil 1 (468 mg/kg), revealed increasing Hg bioaccumulated in barley, as exposure time and corresponding Hg concentrations in media increased, indicating bioconcentration of Hg [16]. Plants exposed in the contaminated Hg environment of chlor-alkali plants for 20-68 days also showed increasing Hg concentrations as exposure time increased [17]. However, the results were different from those of Panda et al. (1992) [11], which found decreasing Hg in aerial tissues of barley with age of the plant, from 7 to 80d.

In our study, strong uptake by barley was found within a short period of 14d with very high concentrations of Hg in the roots (510-6560 mg Hg/kg), as well as in the aerial plants (20.6-4200 mg Hg/kg) (Table 4.4). These levels were 495-13300 times (in roots) and 19.0-4430 times (in aerial plants) higher compared with control plants. After a short-term exposure time (15 days) in the electrolysis rooms of a chlor-alkali facility, Calasans and Malm (1997) [17] also found tissues-Hg concentrations in plants known as highly Hg bioaccumulators (Spanish moss) varying from 1 to 10400 mg/kg, with levels up to 13 500 times higher compared to control plants.

Based on Hg partitioning results, the Soil 1 showed the highest fraction (%) of potentially mobile Hg (sum of soluble and exchangeable fractions) and this result was very well correlated with the tissues-Hg analysis. At the end of exposure time, the plants in Soil 1 exhibited the highest concentrations of Hg in the aerial plants (4200 mg Hg/kg), as well as in the roots (6560 mg Hg/kg), with corresponding BCFs of 7.41 and 11.6. The lower tissues-Hg concentrations were found in Soil 2 (20.6 mg Hg/kg in aerial plants and 510 mg Hg/kg in roots), with BCFs of 0.453 and 1.73, respectively. Even though there was no germination of seeds of barley at 7d the corresponding tissues-Hg concentrations were also very high in Soil 3 (1750 mg Hg/kg in aerial plants and 2090 mg Hg/kg in roots). Nevertheless, the lowest BCFs were found (0.152 in aerial plants and 0.182 in roots) in

Soil 3. These results suggest that a simple association between Hg retained in the organism tissues and Hg concentration in soil is not sufficient when the substrate is extremely contaminated. This is in agreement with a similar observation on Hg contaminated soils from mining activity [6]. In our study, the extremely high Hg concentrations in Soil 3 entailed the strongest toxic effects in non diluted soils, but the highest BCFs were found in Soil 1. It must however, be kept in mind that the above BCFs referred to very different Hg concentrations in soils. Thus, the barley BCFs in Soil 3 are lower (up to 0.182) but the tissues-Hg concentrations were very high (up to 2090 mg/kg). The toxicity estimation based of BCFs order of magnitude in this specific case of Soil 3 seems less accurate and underlines the importance of considering also the tissues Hg concentrations for a more appropriate evaluation.

Significant correlations ( $r=0.998, p=0.043$ ) found between Hg partitioning in soil extracts and its uptake by barley confirm that the higher the mobile fraction (%) (soluble and exchangeable fractions), the higher is the bioconcentrated Hg. Yet, Hg speciation dictated its toxicity, as indicated by the significant positive correlations found between the 7d inhibition (%) of shoots and roots length and the mobile fraction of Hg (mg/kg) ( $r=1.00, p \leq 0.008$ ) (Table 4.5).

The enrichment factor in Soil 1 showed that the bioconcentration of about one third (30.8%) of total Hg in roots occurred in the first week and much more (69.2%) in the second week. The aerial plants were bioconcentrated also most of Hg (86.7%) between 7 and 14d. The barley comported relatively similar in Soil 2 and 73.8% of total bioconcentrated Hg in roots and 66.5% in aerial plants were found for the second week. Thus, in the roots as well as in the aerial plants, Hg uptake was substantially higher in the second week.

The comparison between roots and aerial plants provided some interesting observations. The Hg found in aerial plants was generally mainly accumulated in roots, and in agreement with data reported in the literature [10, 11], indicating Hg absorption into roots tissues and with time its translocation to the aerial parts of plants. However, as mentioned before, the ratios of Hg concentrations in roots and aerial plants varied from 1.19 to 3.62

(for soils 1 and 3) and up to 24.8 (Soil 2) suggesting also a potential absorption of volatile Hg by the aerial plants of barley (in soils 1 and 3 because of very strong percentages of volatile Hg in these soils with 88 and 98% of total Hg respectively) due to specific conditions of the present work (sealed pots). The absorption of the volatile Hg by the aerial parts of plants has also been found for tobacco *Nicotiana miersii* grown in a specially designed sealed chamber system [2].

Earthworms *E. andrei*. Generally, the bioassays with earthworms produced results in agreement with those obtained with barley. Hg concentrations of 295 mg/kg (Soil 1) and 568 mg/kg (Soil 2) were tolerated without lethal effects during the 21-days test. This is consistent with Fischer and Koszorus (1992) [15] who found no lethal effects on earthworms (*Eisenia fetida*) during 56-day exposure in soils artificially contaminated with  $\text{HgCl}_2$  (500 mg  $\text{HgCl}_2/\text{kg}$ ). The lower tolerance was observed in Soil 3. Prolonged maintenance of the earthworms in this very high contaminated soil (11 500 mg Hg/kg) led to the degeneration and death of earthworms.

Analysis of tissues-Hg concentrations revealed high Hg concentrations at the end of the exposure time (Table 4.4). Once again, as for barley, the highest values in the earthworms living in Soil 1 (1410 mg Hg/kg) while in Soil 2 lower corresponding concentrations was found (178 mg Hg/kg). The strong mortality of earthworms in Soil 3 at 14 and 21-day, only allowed the 7-day Hg-tissues analysis which revealed 870 mg Hg/kg. These concentrations were 1500-1750 times (Soil 1), 213-384 times (Soil 2) and 1570 times (Soil 3) higher than the corresponding concentrations in the control earthworms. In their study, Fischer and Koszorus [15] found the maximal accumulation capacity, measured as sublethal concentration, of 156 mg Hg/ kg. In another study, Hg concentration in worm tissues exposed to contaminated soils from chlor-alkali plant was as high as 263 mg Hg/kg for a very high substrate concentration (25 000 mg Hg/ kg) [6].

The differences between the physicochemical characteristics of soils especially regarding the pH which varied from 7.90 to 7.92 in soils 1 and 2 respectively but was very alkaline (9.11) in Soil 3 and the organic carbon which was very low in soils 1 and 2 (<2%) but

absent in Soil 3 also suggest inappropriate conditions for earthworms survival and an enhanced toxicity in Soil 3 [32].

The earthworms BCFs increased almost linearly in Soil 1, while in Soil 2 the strongest increase occurred between 0 and 7d. At the end of the tests the BCFs were about 2-3 times the 7d BCFs indicating high rates of bioconcentrated Hg in worms. Furthermore, the higher BCFs were found in the earthworms living in Soil 1. In Soil 3, as in the test on barley, the very low 7d BCFs found in the earthworms tissues (0.08) means in fact very strong Hg concentrations. In their study, Sandoval et al. [6], warned about the misinformation given by the BCFs order of magnitude when the substrate is very contaminated. Indeed, as in the case of barley, BCFs must be associated with the actually tissues Hg concentrations of earthworms and other parameters as LC<sub>25</sub> or LC<sub>50</sub>. However, in the present study, the high tolerance of earthworms in soils 1 and 2 did not allow the calculation of the above indicators but only the 14d LC<sub>50</sub> (7000 mg Hg/ kg) and the 21d LC<sub>50</sub> (1830 mg Hg/ kg) in Soil 3.

The EF confirmed Hg uptake by earthworms at approximately the same rate (34.2%, 35.5, and 30.3% in the fist, second and third week respectively) in Soil 1, with a very slow diminution for the last week. Based on the percentages found Hg in Soil 2, the rate of uptake seems to be very different. More than half of total Hg (53.1%) was fixed by worms in the fist week. Afterwards, the concentrations of metal in tissues decreased progressively at 24.9% for the second week and at 22.0% for the third week.

As expected, a strong uptake of Hg was found in all earthworms that lived in contaminated soils, but they seem to have an effective excretion mechanism which prevents any important further biological accumulation, which is coherent with previous observations [4, 9]. One possible explanation for this could be the dietary exposure or dermal contact that is most important for earthworms, while plants are especially exposed via the pore water [33]. However for zinc, the water soluble fraction was found to be appropriate to use to predict effects on earthworms over a range of soil types [32]. This could explain the significant correlation ( $r=0.998$ ,  $p=0.041$ ) found between the earthworms mortality (%) and the water soluble fraction (mg/kg). Nevertheless, a better

correlation ( $r=1.00, p=0.014$ ) was found between earthworms mortality (%) and total mercury concentrations (mg/kg) and even between mortality (%) and volatile mercury (mg/kg) ( $r=0.999, p=0.023$ ) as well as between mortality (%) and residual fraction (mg/kg) ( $r=0.999, p=0.025$ ), which was for the most part in one volatile form especially in soils 1 and 3 suggesting, as in the case of barley, the possible uptake of volatile Hg. Furthermore, the earthworm tissues-Hg concentrations are also not only rate Hg uptake but also detoxification and excretion rates dependent [9]. Thus in all three soil, tissues-Hg concentrations in the earthworms were lower than those in the barley. However, the lower BCFs do not reflect the real hazard from Hg in contaminated soils, because a wildlife eating earthworms which can accumulate Hg via route ingestion rather than the earthworms themselves [34]. Yet, as in the case of barley, the tissues-Hg analysis confirmed that Hg partitioning is essential, despite the two trophic levels of the exposed organisms and the different routes of exposure. The results of the Hg uptake in Soil 1 and Soil 2 support a dynamic view of Hg release in soils with metal removal from solution using roots expected to initiate release even from the strongly adsorbed forms.

#### 4.6 Conclusions

Mercury partitioning, speciation, bioconcentration, and ecotoxicity were investigated in three highly contaminated soils from chlor-alkali plants. Single extractions and a four-step sequential extraction scheme were used in order to assess Hg speciation and partitioning. Total, volatile, and methyl Hg concentrations were determined. Hg was then separated in fractions defined as water soluble (F1),  $\text{CaCl}_2$  exchangeable (F2), organic (F3) and residual (F4). In order to evaluate the toxicity of Hg-contaminated soils, germination and growth inhibition of barley (*Hordeum vulgare*) and mortality of earthworms (*Eisenia andrei*) were assessed. The tissues Hg concentrations of exposed organisms (roots and aerial parts for barley and whole organism for earthworms) were also analysed in order to establish bioconcentration factors (BCFs).

Results revealed highly (295-11500 mg Hg/kg) contaminated soils with the highest mobile fraction (F1+F2) in Soil 1 (12 % of total Hg compared with 3.2 and 2.6% respectively in soils 2 and 3). Nevertheless, the highest concentration of mobile fraction

in Soil 3 (about 300 mg Hg/kg compared to 67.1 and 10.0 mg Hg/kg in soils 1 and 2 respectively). Methylmercury concentrations were low (from 0.24 to 19.3 µg/kg) in all soils. Sequential extractions indicated that the majority of the Hg was associated with the residual fraction (F4). In Soils 1 and 3, however, high percentages (88-98%) of the total Hg were present as volatile Hg suggesting the presence of very high concentrations of Hg<sup>0</sup> in these soils. The developed SEP was efficient for highly contaminated field samples with recovery ranged between  $70.5 \pm 2.1$  to  $130 \pm 6$  % of total Hg.

Results of ecotoxicological tests indicated inhibition effects on germination and growth in barley in the presence of higher concentrations of total mercury Hg. Soil 1 was more toxic (inhibition growth of barley, %) than Soil 2. However, the most toxic was always the highly contaminated Soil 3. The tissues-Hg concentrations and BCFs revealed higher values in barley grown in Soil 1 (4200 mg Hg/kg or 7.41 in aerial plants and 6560 mg Hg/kg 11.6 in roots) than in Soil 2 (20.6 mg Hg/kg or 0.07 in aerial plants and 510 mg Hg/kg or 1.73 in roots) or in Soil 3 (1750 mg Hg/kg or 0.152 in aerial plants and 2090 mg Hg/kg or 0.182 in roots).

The bioassays with earthworms produced results generally in agreement with those obtained with barley. No mortality was observed in soils 1 and 2 but strong percentages were recorded in Soil 3 (5%, 85%, and 100% at 7, 14, and 21d). The tissues-Hg concentrations and the correspondingly BCFs at 21 days were higher in Soil 1 (1410 mg Hg/kg or 2.48) than in Soil 2 (178 mg Hg/kg or 0.605).

For both organisms the highest tissues Hg concentrations were found in Soil 1. However, barley was the most sensitive organism probably because of higher BCFs (up to 7.41 in aerial parts and 11.6 in roots) compared to earthworms (up to 2.48) which entailed higher toxicity.

Based on ecotoxicological results, in soils 1 and 2, the higher the mobile Hg fraction, the higher are the tissues-Hg concentrations (as well as the BCFs) and the higher is the toxicity. Soil 3, with the highest concentration of mobile Hg manifested the highest toxicity but showed limited bioconcentration of Hg suggesting a threshold of Hg uptake.

Relationships have been established between soil extractable Hg and the toxicity as well as between soil extractable mercury and the BCFs. Toxic effects on barley and the BCFs were significantly positively correlated with the concentration of mobile Hg (water soluble and exchangeable fractions), while toxic effects on earthworms and the BCFs were significantly positively correlated with total mercury and with soluble mercury concentrations.

Globally, the study indicates that in mercury contaminated soils following the activity of chlor-alkali plants, the mobile Hg concentrations could be useful for estimation of toxic effects on barley, whereas for estimation of toxic effects on earthworms the total Hg concentrations and the soluble fraction are both important.

#### **4.7 Acknowledgements**

This research was supported by Solvay and Total Fina Elf. The authors gratefully acknowledge the assistance provided by Mr. Roger Jacquet and Ms. Patricia De Bruycker of Solvay, and Dr. Frédéric Périé of Total Fina Elf. Thanks are due to the Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec (CEAEQ) for the assessment of soil ecotoxicity.

#### 4.8 References

1. STEIN, E.D., COHEN, Y. et WINER, A.M. (1996). Environmental distribution and transformation of mercury compounds. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 26, 1-43.
2. SUSZCYN SKY, E.M. et SHANN, J.R. (1995). Phytotoxicity and accumulation of mercury in tobacco subjected to different exposure routes. Environmental Toxicology and Chemistry, 14, 61-67.
3. PICOT, A. et PROUST, N. (2000). Speciation and toxicity: mercury and associated compounds. Review article. Journal of Trace and Microprobe Techniques, 18, 183-192.
4. LODENIUS, M. (1994). Mercury in terrestrial ecosystems: A review. In Watras CJ, Huckabee JW, eds, Mercury Pollution. Integration and Synthesis, Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, pp 343-354.
5. MANZ, M., WEISSFLOG, L., KÜHNE, R. et SCHÜURMANN, G. (1999). Ecotoxicological hazard and risk assessment of heavy metal contents in agricultural soils of Central Germany, Ecotoxicological and Environmental Safety, 42, 191-201.
6. SANDOVAL, M.C., VEIGA, M., HINTON, J. et KLEIN, B. (2001). Review of biological indicators for metal mining effluents: a proposed protocol using earthworms, In Proc. of the 25<sup>th</sup> Annual British Columbia Reclamation Symposium, Campbell River, British Columbia, BC, Canada, Sept. 23-27, pp 67-69.
7. URE, A.M. et DAVIDSON, C.M. eds. (2002). Chemical speciation in the environment, 2nd edition, Blackwell Science Ltd., Abingdon, UK
8. ZAGURY, G.J., DUDAL, Y., BUREAU, J., BASTIEN, C. et CHASSE, R. (2002). Sample handling and preparation for estimation of mobility, bioavailability and toxicity of contaminants in soils. In Sunahara GI, Renoux AY, Thellen C and Pilon A, eds, Environmental Analysis of Contaminated Sites, New York, USA.

9. VAN WENSEM, J., VEGTER, J.J. et VAN STRAALEN, N.M. (1994). Soil quality criteria derived from critical body concentrations of metals in soil invertebrates. Applied Soil Ecology, 1, 185-191.
10. DAVIS, R.D., BECKETT, P.H.T. et WOLLAN, E. (1978). Critical levels of twenty potentially toxic elements in young spring barley. Plant and Soil, 49, 395-408.
11. PANDA, K.K., LENKA, M. et PANDA, B.B. (1992). Monitoring and assessment of mercury pollution in the vicinity of a chloralkali plant. II Plant-availability, tissue-concentration and genotoxicity of mercury from agricultural soil contaminated with solid waste assessed in barley (*Hordeum vulgare* L.). Environmental Pollution, 76, 33-42.
12. EDWARDS, S.C., MACLEOD, C.L. et LESTER, J.N. (1998). The bioavailability of copper and mercury to the common nettle (*Urtica Doica*) and the earthworm *Eisenia fetida* from contaminated dredge spoil. Water, Air, and Soil Pollution, 102, 75-90.
13. BOENING, D.W. (2000). Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. Chemosphere, 40, 1335-1351.
14. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. (1998). Standard Guide for Conducting a Laboratory Soil Toxicity Tests with the lumbricid Earthworm *Eisenia foetida*. E1676-95. Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05, Philadelphia, PA, USA.
15. FISCHER, E. et KOSZORUS, L. (1992). Sublethal effects, accumulation capacities and elimination rates of As, Hg and Se in the manure worm, *Eisenia foetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). Pedobiologia, 36, 172-178.
16. COCKING, D., KING, M.L., RITCHIE, L. et HAYES, R. (1994). Earthworm bioaccumulation of mercury from contaminated flood plain soils, In Watras CJ and Huckabee JW, eds, Mercury pollution. Integration and synthesis, Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, pp 381-395.

17. CALASANS, C.F. et MALM, O. (1997). Elemental mercury contamination survey in a chlor-alkali plant by the use of transplanted Spanish moss, *Tillandsia usneoides* (L). The Science of the Total Environment, 208, 165-177.
18. CARAS, C., ZAGURY, G.J. et DESCENES, L. (2003). Mercury speciation in highly contaminated soils from chlor-alkali plants using chemical extractions, Journal of Environmental Quality (submitted)
19. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. (1995). Standard test method for pH of soils. D 4972 - 95a. Annual Book of ASTM Standards, Vol. 04.08. Philadelphia. PA, USA.
20. CHAPMAN, H.D. (1965). Cation-exchange capacity. In Black CA, ed, Methods of soils analysis, Part 2-Chemical and microbiological properties. American Society of Agronomy Inc., Publisher, Madison, Wisconsin, USA, pp 891-901.
21. MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT ET DE LA FAUNE DU QUÉBEC. (1996). Solides-Détermination du carbone inorganique total, dosage par spectrophotométrie IR. Méthode MA.410C1.0. Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec, Québec, QC, Canada.
22. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. (1985). Classification of Soils for Engineering Purposes. D 2487-83. Annual Book of ASTM Standards. Vol. 04.08, Philadelphia. PA, USA, pp 395-408.
23. LIANG, L., HORVAT, M. et BLOOM, N.S. (1994). An improved speciation method for mercury by GC/CVAFS after aqueous phase ethylation and room temperature precollection, Talanta, 41, 371-379.
24. CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. (2000). Détermination de la germination et de la croissance avec les semences d'orge Hordeum vulgare. MA. 500 – G.C. 1.0. Ministère de l'Environnement, Gouvernement du Québec, Québec, QC, Canada.

25. NORBERG-KING, T.J. (1993). A linear interpolation method for sublethal toxicity, the Inhibition Concentration (IC<sub>p</sub>) Approach (version 2.0). Technical Report 03-09, National Effluent Toxicity Assessment Center, Environmental Research Laboratory, Duluth, USEPA, USA.
26. CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. (2003). Détermination de la toxicité létale avec le ver de terre (*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*). MA. 500 -- VTL 1.0. Ministère de l'Environnement, Gouvernement du Québec, Québec, QC, Canada.
27. CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. (1994). Programme Toxdapro: Probit, moyenne mobile et binomiale. Ministère de l'Environnement, Gouvernement du Québec, Québec, QC, Canada.
28. STATSOFT, INC. (1997). STATISTICA for Windows (Computer program manual). Tulsa, OK: StatSoft, Inc. 2300 East 14<sup>th</sup> Street, Tulsa, OK, USA, 74104.
29. MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT DU QUÉBEC. (1999). Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés, Les publications du Québec, QC, Canada.
30. WALKER, C.H., HOPKIN, S.P., SILBY, R.M. et PEAKALL, D.B. (1996). Principles of ecotoxicology, Taylor and Francis publishers, Great Britain.
31. LANNO, R.P. et MCCARTY, L.S. (1997). Earthworm bioassays: adopting techniques from aquatic toxicity testing. Soil Biology and Biochemistry, 29, 693-697.
32. SPURGEON, D.J. et HOPKIN, S.P. (1996). Effects of variations of the organic matter content of soils on the availability and toxicity of zinc to the earthworm *Eisenia fetida*. Pedobiologia, 40, 80-96.
33. LOCK, K. et JANSSEN, C.R. (2003). Effect of new soil metal immobilising agents on metal toxicity to terrestrial invertebrates. Environmental Pollution, 121, 123-127.

34. BEYER, W.N., CROMARTIE, E. et MOMENT, G.B. (1985). Accumulation of methylmercury in the earthworm, *Eisenia foetida*, and its effect on regeneration. Buletin of Environmental Contamination and Toxicology, 35, 157-162.

Table 4.1 Hg partitioning in Soil 1, Soil 2 and Soil 3 using a four step sequential extraction procedure

Soil	Total Hg (mg/kg)	Fraction 1		Fraction 2		Fraction 3		Fraction 4		Sum of fractions (mg/kg)	Recovery (%)
		Water soluble (%) <sup>b</sup>	Exchangeable (mg/kg)	Water soluble (%) <sup>b</sup>	Exchangeable (mg/kg)	Organic (%)	Residual (mg/kg)	(%)	(%)		
1 <sup>a</sup>	568 ± 24.2	4.08 ± 0.95	0.7 ± 0.2	63.3 ± 2.10	11.1 ± 0.4	11.5 ± 2.37	2.0 ± 0.4	661 ± 32.1	11.6 ± 6	740 ± 35.9	130 ± 6
2 <sup>a</sup>	295 ± 18.3	0.27 ± 0.01	0.1 ± 0.0	9.20 ± 0.32	3.1 ± 0.1	1.43 ± 0.06	0.5 ± 0.0	314 ± 7.30	10.6 ± 2	325 ± 7.55	110 ± 3
3 <sup>a</sup>	1.15x10 <sup>4</sup> ± 457	53.4 ± 1.59	0.5 ± 0.0	246 ± 18.4	2.1 ± 0.2	35.3 ± 4.17	0.3 ± 0.0	8.12 x 10 <sup>3</sup> ± 125	70.8 ± 0.9	8.45 x 10 <sup>3</sup> ± 108	73.7 ± 0.9

<sup>a</sup> Mean values and S.D. are calculated from 3 different determinations for soil 2 and 4 different determinations for Soil 1 and Soil 3.

<sup>b</sup> Calculated as: (Hg extracted in concerned fraction/ total Hg) x 100.

<sup>c</sup> Calculated as: (sum of extracted Hg fractions / total Hg) x 100.

Table 4.2 Inhibition concentrations (mg Hg/kg dry mass) for barley (*Hordeum vulgare*) in the soils <sup>a</sup>

Endpoint	Soil 1	Soil 2	Soil 3
IC <sub>25</sub> 7d shoots length	> 568	> 295	206 (138-757)
IC <sub>25</sub> 14d shoots length	> 568	> 295	482 (n.c. <sup>b</sup> )
IC <sub>50</sub> 7 and 14d shoots length	> 568	> 295	> 11 468
IC <sub>25</sub> 7d roots length	149 (128-203)	> 295	1089 (952-1319)
IC <sub>25</sub> 14d roots length	127 (101-201)	250	482 (77-940)
IC <sub>50</sub> 7d roots length	> 568	> 295	> 11 468
IC <sub>50</sub> 14d roots length	290 (274-317)	> 295	2959 (1032-6296)

<sup>a</sup> Results are presented as mean with a Confidence Interval (C.I. 95%)

<sup>b</sup> nc- not calculated

Table 4.3 Earthworms fragmentation and mortality in Soil 3

Concentrations (%)	<sup>a</sup> NDF/NTF	Mortality at 7d <sup>b</sup> (%)	<sup>a</sup> NDF/NTF	Mortality at 14d <sup>b</sup> (%)	<sup>a</sup> NDF/NTF	Mortality at 21d <sup>b</sup> (%)
100	1/2	50	2/2	100		no fragments
50	0/1	0	2/5	40		no fragments
25	2/4	50	4/9	44	5/5	100
12.5		no fragments		no fragments	3/3	100
6.25		no fragments		no fragments		no fragments
Control		no fragments		no fragments		no fragments

<sup>a</sup>NDF/ NTF: number dead fragments/ number total fragments

Table 4.4 Concentrations of Hg in soils and in barley (*H. vulgare*) and earthworms (*E. andrei*) during the bioassays

Soil	Total Hg in soil <sup>a</sup> (mg/kg dry soil)	Barley <sup>b</sup>				Earthworms <sup>b</sup>		
		Aerial plants 7d (mg Hg/kg dry aerial plants)	Roots 7d (mg Hg/kg dry roots)	Roots 14d (mg Hg/kg dry roots)	Roots 14d (mg Hg/kg dry tissues)	7d	14d	21d
1	568 ± 24.2	558±453	(4.20±1.07) x 10 <sup>3</sup>	2.02 x 10 <sup>3</sup> ±870	6.56 x 10 <sup>3</sup> ±237	480±36.0	979±56.4	1.41±0.12 x 10 <sup>3</sup>
2	295 ± 18.3	6.90±3.98	20.6±17.4	134±36.3	510±298	94.7±8.55	139±36.8	178±33.3
3	1.15 ± 0.05 x 10 <sup>4</sup>	na <sup>c</sup>	1.75 x 10 <sup>3</sup> ±168	na	2.09 ± 0.32 x 10 <sup>3</sup>	870 <sup>d</sup>	na	na

<sup>a</sup> Mean values and S.D. are calculated from 5 different determinations<sup>b</sup> Mean values and S.D. are calculated from 3 different determinations<sup>c</sup> na –non analysed<sup>d</sup> Calculated with one replicate

Table 4.5 Correlation for barley (*Hordeum vulgare*) toxicity and earthworms (*Eisenia andrei*) mortality with soil extract Hg concentrations for the soils

	THg (mg/kg)	VHg (mg/kg)	MgHg (%)	MeHg (μg/g)	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	F4 (%)	F1+F2 (%)	F1+F3 (%)	F1+F2+F3 (mg/kg)						
I(shoots) 7d (%)	0.986 p=.105	0.989 p=.096	0.730 p=.479	0.949 p=.205	-0.285 p=.816	0.293 p=.078	0.993 p=.722	-0.422 p=.021	<b>0.999</b> p=.727	-0.416 p=.253	0.994 p=.094	-0.922 p=.748	-0.385 p=.002	1.000 p=.745	-0.390 p=.009	1.000 p=.009	
I(roots) 7d (%)	0.950 p=.202	0.954 p=.193	0.825 p=.382	0.986 p=.107	-0.136 p=.913	0.435 p=.175	0.962 p=.820	-0.279 p=.076	<b>0.993</b> p=.824	-0.273 p=.028	0.999 p=.191	-0.852 p=.250	0.953 p=.104	-0.240 p=.095	0.989 p=.846	-0.245 p=.088	0.990 p=.088
I(shoots) 14d (%)	0.984 p=.115	0.986 p=.106	0.740 p=.469	0.954 p=.195	-0.270 p=.826	0.309 p=.800	0.991 p=.088	-0.408 p=.011	<b>1.000</b> p=.737	-0.402 p=.059	0.996 p=.263	-0.916 p=.059	0.987 p=.104	-0.370 p=.008	1.000 p=.755	-0.375 p=.001	1.000 p=.001
I(roots) 14d (%)	0.857 p=.345	0.864 p=.336	0.930 p=.240	0.999 p=.035	0.087 p=.944	0.624 p=.571	0.878 p=.318	-0.059 p=.962	<b>0.942</b> p=.218	-0.053 p=.964	0.942 p=.171	-0.715 p=.493	0.866 p=.333	-0.019 p=.338	0.931 p=.985	-0.024 p=.238	0.935 p=.231
Mortality 7d (%)	1.000 p=.014	<b>0.999</b> p=.023	0.590 p=.598	0.874 p=.323	-0.458 p=.697	0.111 p=.929	<b>0.998</b> p=.041	-0.583 p=.604	0.976 p=.140	-0.578 p=.608	0.957 p=.188	-0.978 p=.134	0.999 p=.025	-0.549 p=.630	0.982 p=.121	-0.554 p=.626	0.980 p=.128
Mortality 14d (%)	1.000 p=.014	<b>0.999</b> p=.023	0.590 p=.598	0.874 p=.323	-0.458 p=.697	0.111 p=.929	<b>0.998</b> p=.041	-0.583 p=.604	0.976 p=.140	-0.578 p=.608	0.957 p=.188	-0.978 p=.134	0.999 p=.025	-0.549 p=.630	0.982 p=.121	-0.554 p=.626	0.980 p=.128
Mortality 21d (%)	1.000 p=.014	<b>0.999</b> p=.023	0.590 p=.598	0.874 p=.323	-0.458 p=.697	0.111 p=.929	<b>0.998</b> p=.041	-0.583 p=.604	0.976 p=.140	-0.578 p=.608	0.957 p=.188	-0.978 p=.134	0.999 p=.025	-0.549 p=.630	0.982 p=.121	-0.554 p=.626	0.980 p=.128
IC <sub>50</sub> (roots) 7d (mg Hg/kg)	0.986 p=.106	0.984 p=.115	0.467 p=.690	0.794 p=.416	-0.582 p=.605	-0.034 p=.979	0.978 p=.133	-0.694 p=.512	<b>0.934</b> p=.232	-0.689 p=.280	0.905 p=.042	-0.998 p=.117	0.983 p=.538	-0.664 p=.213	0.944 p=.534	-0.668 p=.220	0.941 p=.220
IC <sub>50</sub> (roots) 14d (mg Hg/kg)	0.9225 p=.235	0.9271 p=.245	0.2792 p=.820	0.6552 p=.545	-0.7338 p=.476	-0.2348 p=.849	0.9161 p=.263	-0.8252 p=.382	<b>0.8428</b> p=.362	-0.8215 p=.410	0.8001 p=.087	-0.9906 p=.247	0.9259 p=.408	-0.8015 p=.343	0.8586 p=.405	-0.8047 p=.349	0.8531 p=.349
IC <sub>50</sub> (roots) 14d (mg Hg/kg)	0.9997 p=.015	0.9993 p=.024	0.5888 p=.599	0.8729 p=.325	-0.4594 p=.696	0.1093 p=.930	0.9978 p=.042	-0.5843 p=.603	<b>0.9755</b> p=.141	-0.5789 p=.607	0.9563 p=.189	-0.9781 p=.133	0.9992 p=.026	-0.5508 p=.629	0.9817 p=.122	-0.5552 p=.625	0.9796 p=.129

Table 4.5 (continuation) Correlation for barley (*Hordeum vulgare*) BCFs and earthworms (*Eisenia Andrei*) BCFs with soil extract Hg concentrations for the soils

	THg (mg/kg)	VHg (mg/kg)	vHg (%)	MeHg (mg/kg)	MeHg (%)	F1 (mg/kg)	F1 (%)	F2 (mg/kg)	F2 (%)	F3 (mg/kg)	F3 (%)	F4 (mg/kg)	F4 (%)	F1+F2 (mg/kg)	F1+F2 (%)	F1+F2+F3 (mg/kg)	F1+F2+F3 (%)
BCF (a.p.) 7d	1.000	1.000	0.597	0.878	-0.451	0.119	0.998	-0.576	0.978	-0.571	0.959	-0.976	1.000	-0.542	0.984	-0.547	0.982
	p=.008	p=.018	p=.593	p=.318	p=.702	p=.924	p=.036	p=.609	p=.135	p=.613	p=.183	p=.140	p=.020	p=.635	p=.116	p=.632	p=.123
BCF (roots) 7d	1.000	1.000	0.612	0.887	-0.433	0.138	0.999	-0.561	0.982	-0.555	0.964	-0.972	1.000	-0.526	0.987	-0.531	0.985
	p=.004	p=.006	p=.581	p=.306	p=.715	p=.912	p=.023	p=.621	p=.123	p=.625	p=.170	p=.152	p=.008	p=.647	p=.104	p=.644	p=.110
BCF (a.p.) 14d	-0.473	-0.460	0.413	-0.006	0.999	0.811	-0.435	0.994	-0.290	0.995	-0.217	0.663	-0.457	0.998	-0.318	0.997	-0.308
	p=.686	p=.696	p=.729	p=.996	p=.024	p=.398	p=.714	p=.069	p=.813	p=.065	p=.861	p=.538	p=.698	p=.043	p=.794	p=.047	p=.801
BCF (roots) 14d	-0.587	-0.575	0.287	-0.140	0.985	0.725	-0.552	1.000	-0.416	1.000	-0.346	0.758	-0.573	0.998	-0.443	0.998	-0.433
	p=.601	p=.610	p=.815	p=.910	p=.110	p=.484	p=.628	p=.017	p=.727	p=.021	p=.775	p=.453	p=.612	p=.043	p=.708	p=.039	p=.715
BCF 7d	-0.728	-0.718	0.103	-0.322	0.936	0.584	-0.698	0.977	-0.578	0.976	-0.515	0.866	-0.715	0.968	-0.602	0.969	-0.594
	p=.481	p=.491	p=.934	p=.791	p=.230	p=.603	p=.508	p=.136	p=.608	p=.140	p=.655	p=.333	p=.493	p=.162	p=.589	p=.159	p=.595
BCF 14d	1.000	1.000	0.599	0.879	-0.448	0.122	0.999	-0.574	0.978	-0.569	0.960	-0.975	1.000	-0.540	0.984	-0.545	0.982
	p=.007	p=.016	p=.591	p=.317	p=.704	p=.922	p=.034	p=.611	p=.133	p=.615	p=.181	p=.141	p=.018	p=.637	p=.114	p=.633	p=.121
BCF 21d	1.000	1.000	0.603	0.882	-0.443	0.127	0.999	-0.570	0.979	-0.564	0.961	-0.974	1.000	-0.536	0.985	-0.540	0.983
	p=.003	p=.013	p=.588	p=.313	p=.708	p=.919	p=.030	p=.614	p=.130	p=.618	p=.177	p=.145	p=.015	p=.640	p=.111	p=.637	p=.117

THg – total Hg

VHg – volatile Hg

MeHg – methylmercury

F1 – water extracted fraction

F2 – 1M CaCl<sub>2</sub> extracted fraction

F3 – 4% CH<sub>3</sub>COOH/0.2 M NaOH extracted fraction

F4 – acid digestion extracted fraction

I – shoot/ root inhibition

Mortality – earthworm mortality

IC<sub>x</sub> – inhibition concentrations for X% for shoot/ root length

BCFs – bioconcentration factors

a.p. – aerial plants

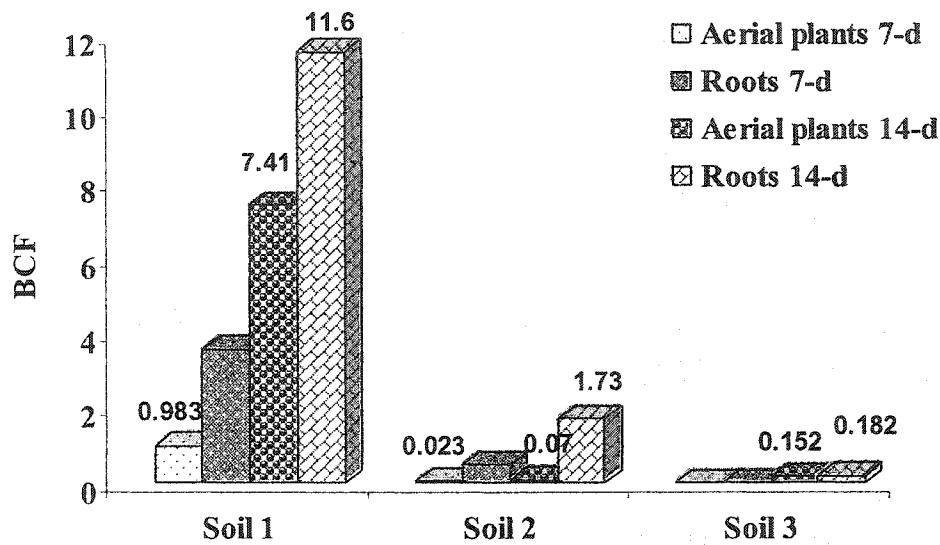


Fig. 4.1 Bioconcentrated Hg in roots and aerial plants of barley (*H. vulgare*) after harvest from chlor-alkali contaminated soils

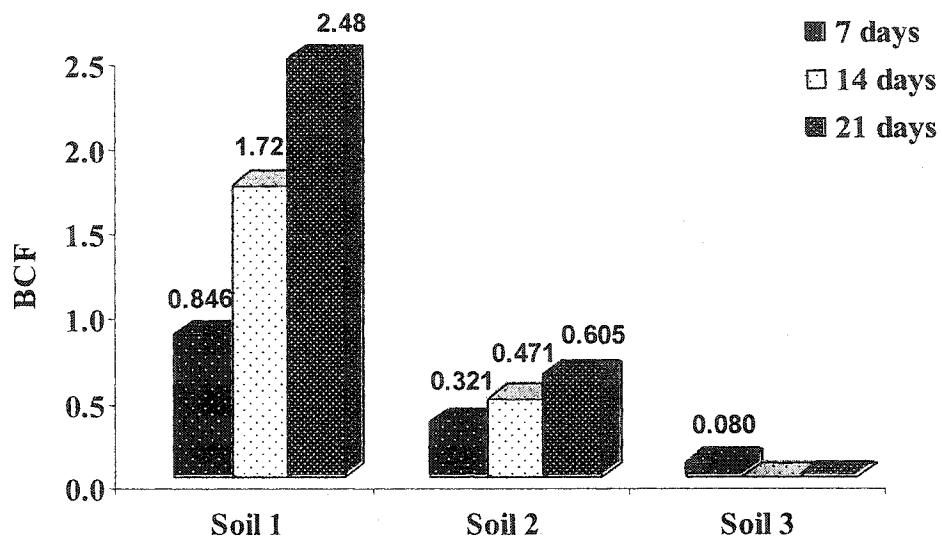


Fig. 4.2 Bioconcentrated Hg in the whole earthworms (*E. andrei*) after exposure in chlor-alkali contaminated soils

## CHAPITRE V

### DISCUSSION GÉNÉRALE

L'activité des usines chlore-alkali qui utilisent le procédé d'électrolyse à Hg est connue comme étant génératrice de sols contaminés. La forme de rejet est majoritairement le Hg<sup>0</sup> et dans une moindre mesure le Hg<sup>2+</sup> (surtout sous la forme de HgS). Dans ces sols, la spéciation du Hg peut changer en fonction de la concentration du Hg total, de la granulométrie, des caractéristiques physico-chimiques des sols et du vieillissement de la contamination. La toxicité de ces sols est en général corrélée à la concentration du Hg total et aussi à la concentration de certains composés organiques du Hg (principalement le méthyl-mercure et l'éthyl-mercure).

Dans le présent travail, l'analyse des résultats associés aux paramètres physico-chimiques pour des échantillons de sols contaminés par l'activité de trois usines chlore-alkali indique que tous les échantillons avaient un pH alcalin. Ce résultat n'est pas étonnant compte tenu de l'origine de la contamination (Hempel *et al.*, 1995).

Les trois sols contenaient des concentrations relativement élevées en chlorures et en particulier les Sols 1 et 3 (35 mg/kg et 26 mg/kg respectivement) par rapport au Sol 2 (5 mg/kg), étant donné que la concentration des chlorures dans les sols naturels non contaminés est d'environ 3,5 mg/kg (Schuster, 1991).

La teneur en matière organique dans les sols était très faible (inférieure à 2%) voire nulle dans le Sol 3.

La CEC était associée à la granulométrie des sols. Ainsi, c'est le Sol 3 qui contenait le plus fort pourcentage d'argile et qui avait la CEC la plus élevée. La granulométrie des sols (sables graveleux) peut s'avérer aussi un facteur très important induisant une plus forte mobilité des composés solubles du Hg, via l'eau interstitielle jusqu'à la nappe phréatique (Yin *et al.*, 1997).

Le pH alcalin des sols étudiés, avec des concentrations relativement élevées de chlorures et un manque de matière organique ne favorisent pas l'adsorption du Hg au niveau de la matrice du sol (Schuster, 1991, Yin *et al.*, 1996). Les concentrations variables des

chlorures et les concentrations du Hg total sont une indication de la possibilité d'une solubilité variable du Hg dans les trois sols.

Les concentrations de Hg étaient beaucoup plus élevées dans le Sol 3 que dans les deux autres sols (11 500 mg/kg par rapport à 568 et 295 mg/kg pour les Sols 1 et 2 respectivement). Ces niveaux de concentrations sont entre 1475 et 57500 fois plus élevées que le critère A pour les sols (Ministère de l'Environnement du Québec, 1999) et les critères écologiques pour les sols en Finlande et Suède (De Vries et Bakker, 1998). Dans la littérature, des concentrations de Hg dans les sols contaminés par l'activité d'usines chlore-alkali sont variables allant de 0,47-4,2 mg Hg/kg (Biester *et al.*, 2002) à 80,5-104 mg Hg/kg (Maserti et Ferrara, 1991) et même 73300 mg Hg/kg, dans un sol extrait sous les dalles de la salle d'électrolyse d'une usine chlore-alkali (Bloom *et al.*, 2003).

La forme chimique du Hg dans les Sols 1 et 3 est très différente de celle du Sol 2. Dans les Sols 1 et 3, respectivement 88% et 98% du Hg total se trouve sous forme volatile (éliminé par un simple chauffage à 180°C pendant 48 h), alors que dans le Sol 2, environ 14 % du Hg présent est volatil. Dans leur étude Biester et Nehrke (1997) ont trouvé environ 30% de la concentration du Hg total sous forme volatile ( $Hg^0$ ) dans un sol contaminé provenant d'usines chlore-alkali (avec une concentration moyenne de 1717 mg Hg/kg). De plus, les conditions spécifiques (180°C pendant 2 jours) de la méthode d'extraction pyrolytique appliquée pour la séparation de la fraction volatile du Hg dans les sols ont pu entraîner la volatilisation simultanée d'autres composés volatils du Hg dont le  $HgCl_2$  et le Hg lié à la matière organique (Biester et Scholz, 1997; Bloom *et al.*, 2003).

De façon générale, les concentrations en méthyl-mercure sont assez faibles (soit 9,49, 0,24 et 19,3 µg/kg respectivement pour chacun des trois sols, ce qui représente 0,167, 0,008 et 0,017% du Hg total). Ces pourcentages sont similaires aux valeurs trouvées par Bloom *et al.* (2003) et Hempel *et al.* (1995) soit 10 µg/kg (< 0,0001% du Hg total) et 400 µg/kg (< 0,04% du Hg total) dans des sols contaminés par les émissions d'usines chlor-alkali.

Quant à la distribution des fractions, dépendamment de la variante de la PES, les pourcentages les plus élevés de Hg mobile (soluble et échangeable) étaient retrouvés dans le Sol 1 (11,9-40,7%) par rapport à des valeurs moyennes (3,2-12,0%) pour le Sol 2 et les valeurs les plus faibles pour le Sol 3 (2,6-4,85%).

Cependant, lorsque l'on considère les concentrations contenues dans ces sols, ces faibles pourcentages peuvent se traduire par de fortes concentrations. Ainsi, pour le Sol 3, la fraction échangeable au  $\text{CaCl}_2$  obtenue avec la variante 1 de la PES représente uniquement 4,4% du Hg total, mais en terme de concentration (506 mg/kg), cela représente une quantité presque égale au Hg total du premier sol (568 mg/kg).

Parmi les fractions mobilisables à court terme, la fraction échangeable au  $\text{CaCl}_2$  (F2) est la plus substantielle. Pour cette fraction, des pourcentages d'extraction beaucoup plus importants ont été obtenus avec la variante 1 de la PES (conditions alcalines et en présence d'agents complexants, EDTA).

Les concentrations les plus élevées en Hg sont retrouvées dans la fraction résiduelle des trois sols avec 65,6-70,8 % (Sol 3), 87,7-106% (Sol 2) et 73,5-116 % (Sol 1). Généralement, cette fraction est très peu disponible (Wallschläger *et al.*, 1998). Cependant, dans le cas des Sols 1 et 3, cette fraction doit être considérée avec discernement. Certes, le Hg est retrouvé dans la fraction résiduelle mais à cause des concentrations de Hg volatile extrêmement élevées, une proportion importante du Hg résiduel est sous forme volatile.

Le Sol 2, composé d'un sol non remanié (contrairement aux deux autres sols) contient très peu de Hg volatile (environ 14 %, par rapport à 88 et 98% pour les Sols 1 et 3). Cette différence pourrait être due au fait que, lors du prélèvement du Sol 2, du sol non contaminé a été mélangé au sol contaminé. Il est également possible que le Hg élémentaire ait été transformé en d'autres formes sur le terrain. Pour le Sol 2, la fraction résiduelle est réellement sous une forme très peu disponible parce que ce sol contient très peu de Hg volatile. Une très bonne corrélation trouvée entre le rapport des chlorures sur le Hg total et la fraction échangeable ( $r=0,99$ ;  $p=0,02$  pour la variante 1 de la PES et  $r=0,99$ ;  $p=0,09$  pour la variante 2 de la PES) ou la somme des fractions soluble et échangeable

( $r=0,99$ ;  $p=0,03$  et  $r=0,98$ ;  $p=0,11$  pour la variante 1 et 2 de la PES respectivement) expliquerait aussi les fractions extrêmement faibles de Hg soluble dans l'eau dans le Sol 2 ( $<0,01\%$ , par rapport à  $>0,7\%$  et  $>0,4\%$  pour les Sols 1 et 3).

Pour les Sols 1 et 2, les pourcentages de récupération du Hg par la PES (somme des quatre fractions) dépassent légèrement les concentrations de Hg total analysé par digestion directe des échantillons frais. Cette différence peut s'expliquer par le fait que le mélange oxydant employé pour la digestion directe n'a pas minéralisé en totalité la matrice solide, laissant du solide contenant du Hg. Quant à la PES, elle induit une pré-digestion, ce qui produit des concentrations plus élevées. De plus, le mélange oxydant utilisé dans notre PES est composé d'acides inorganiques très forts et présente un pouvoir oxydant supérieur à l'eau régale, utilisée dans la plupart des méthodes standards pour l'analyse du Hg total.

Globalement, la méthode utilisée s'est avérée efficace sur des sols moyennement contaminés (environ 300 mg/kg), de même que sur des sols très contaminés (11 500 mg/kg), avec des pourcentages de récupération du Hg variant entre 70-130% du Hg total. Avec la procédure proposée, la somme des fractions récupérées par rapport à la concentration du Hg obtenue par digestion totale de l'échantillon est satisfaisante, particulièrement pour le Sol 2 (avec  $(100,0 \pm 7,4)\%$  et  $(110,1 \pm 2,6)\%$  respectivement pour les deux variantes d'extraction).

Les résultats des tests écotoxicologiques ont indiqué des effets d'inhibition de la germination et de la croissance de l'orge en présence des concentrations plus élevées de mercure total. Très peu de variation sur l'inhibition de la germination des graines de l'orge était observée dans les sols 1 et 2 avec respectivement 5,6% et 11% d'inhibition de la germination. En même temps (à 14j), une baisse importante de la germination (40%) était observée dans le Sol 3. Dans ce dernier sol, la germination a été totalement inhibée à 7j et des graves symptômes de stress causé par le Hg ont été observés à 14j (des plantes chlorotiques très peu développées). L'inhibition de la croissance (%) de l'orge comparativement au sol témoin à la fin des tests était différente, avec une toxicité plus faible du Sol 2 (15,2 pour les parties aériennes des plantes et 31,0 pour les racines)

moyenne pour le Sol 1 (20,2 pour les parties aériennes des plantes et 63,7 pour les racines) et plus importante dans le Sol 3 (38,8 pour les parties aériennes des plantes et 92,2 pour les racines). Le Sol 1 était alors plus toxique que le Sol 2 mais moins toxique que le Sol 3.

L'analyse du Hg dans les tissus indiquait des concentrations plus élevées dans l'orge du Sol 1 (4200 mg Hg/kg dans les parties aériennes des plantes et 6560 mg Hg/kg dans les racines) avec des BCF respectivement de 7,41 et 11,6 que dans le Sol 2 (21 mg Hg/kg ou 0,07 dans les parties aériennes des plantes et 510 mg Hg/kg ou 1,73 dans les racines) ou le Sol 3 (1750 mg Hg/kg ou 0,152 dans les parties aériennes des plantes et 2090 mg Hg/kg ou 0,182 dans les racines). Les résultats montrent donc que les racines ont concentré plus de Hg que les parties aériennes ce qui est en accord avec la littérature (Panda *et al.*, 1992). Le rapport des concentrations du Hg dans les racines et les parties aériennes variait entre 1,56 (à 14j)-3,62 (à 7j) (Sol 1), entre 19,4 (à 7j)-24,8 (à 14j) (Sol 2) et 1,19 (à 14j) (Sol 3), ce qui nous permet de supposer une absorption du Hg volatil par les parties aériennes de l'orge, dans les conditions spécifiques du présent travail (tests réalisés dans des pots scellés), notamment dans le cas des sols 1 et 3 à cause de très forts pourcentages du Hg volatil présents dans ces sols. L'absorption du Hg volatil par les parties aériennes des plantes a été aussi trouvée par Suszcynsky et Shann (1995) pour le tabac *Nicotiana miersii*.

Les bioessais avec le ver de terre ont produit des résultats généralement en accord avec ceux de l'orge. Aucune mortalité n'était observée dans les sols 1 et 2 mais des forts pourcentages ont été enregistrés dans le Sol 3 (5%, 85%, et 100% à 7, 14, et 21j). Les concentrations du Hg dans les tissus des vers de terre à 21 jours de même que les BCF étaient plus élevés dans le Sol 1 (1410 mg Hg/kg ou 2,48) que dans le Sol 2 (178 mg Hg/kg ou 0,605). Cependant, à 7 jours d'exposition, les teneurs en Hg dans les tissus des vers de terre étaient plus élevées dans le Sol 3 (870 mg /kg) que dans le Sol 1 ( $480\pm36$  mg/kg) et que dans le Sol 2 ( $95\pm8.5$  mg/kg). Pour les deux organismes l'analyse directe des concentrations du Hg dans les tissus s'est révélée un bon indicateur d'exposition au mercure avec les concentrations les plus élevées du Hg dans les tissus des organismes du

Sol 1 après 21 jours d'exposition. Des deux organismes, l'orge était le plus sensible au Hg probablement à cause des fortes concentrations retenues dans les tissus et des BCF plus élevés (jusqu'à 7,41 dans les parties aériennes des plantes et 11,6 dans les racines) comparativement aux vers de terre (jusqu'à 2,48) ce qui entraîna la toxicité la plus élevée. Du ce point de vue tous les sols testés ont eu plus d'effets sur l'orge comparativement au ver de terre pour lequel la mortalité à la fin des tests était 0% pour le Sol 1 et le Sol 2. Le ver de terre a assimilé moins de Hg et par conséquent les effets toxiques ont été moins forts. Ce comportement peut s'expliquer par l'excrétion du Hg inhibant la bioconcentration du Hg (Lodenius, 1994) ou par l'exposition des vers de terre matures au Hg, tandis que l'orge était exposé au Hg pendant plusieurs stades de développement.

Des corrélations ont été établies entre le Hg mobile (la somme des fractions soluble et échangeable) dans le sol et la toxicité sur les deux organismes, entre le mercure mobile et les concentrations du Hg dans les tissus des organismes après l'exposition, de même qu'entre la toxicité et les BCFs. Les effets toxiques sur l'orge sont significativement corrélés à la concentration du Hg mobile, tandis que les effets toxiques sur le ver de terre sont le mieux corrélés à la concentration du mercure total et à la concentration du mercure soluble dans l'eau. Cependant les teneurs du Hg dans les tissus de l'orge après 14 jours d'exposition et les BCF sont significativement corrélés au mercure mobil des sols, tandis que pour le ver de terre ils sont significativement corrélés à la concentration du mercure total et à la concentration du mercure soluble dans l'eau.

Basé donc sur les résultats des tests ecotoxicologiques, pour les sols 1 et 2, plus la concentration en Hg mobile est élevée, plus les concentrations du Hg dans les tissus sont élevées (aussi bien que le BCF) et plus la toxicité pour l'orge est élevée. Cependant, le Sol 3, avec la concentration la plus élevée du Hg mobile a manifesté la toxicité la plus élevée sur les deux organismes mais une bioconcentration limitée à 14 jours d'exposition pour l'orge suggérant l'existence d'un seuil dans l'assimilation du Hg.

L'étude indique que pour le mercure des sols contaminés suite à l'activité d'usines chlore-alcali, les concentrations du Hg mobile sont utiles pour l'estimation des effets toxiques

sur l'orge, tandis que pour l'estimation des effets toxiques sur le ver de terre les concentrations totales et la concentration de Hg soluble dans l'eau sont paramètres importants.

## CHAPITRE VI

### CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

#### 6.1 Conclusions générales

Les sols provenant des usines chlore-alkali utilisés dans cette étude étaient fortement contaminés. Le Hg total de la source était majoritairement sous une forme volatile dans deux des trois sols. Une partie du Hg était sous la forme de méthyl-mercure mais dans de très faibles pourcentages du Hg total.

La nouvelle variante de PES développée s'est avérée efficace pour toutes les concentrations testées avec de très bons pourcentages de récupération du Hg total (70,5-130%) comparativement aux résultats publiés dans la littérature scientifique. La mobilité du métal (la somme des fractions soluble et échangeable) était au plus 40,7% de la concentration du Hg total, avec la fraction échangeable toujours la plus élevée. Parmi toutes les fractions extraites, la fraction résiduelle était majoritaire. La fraction soluble et la somme des fractions soluble et échangeable étaient très bien corrélées au rapport des chlorures sur le Hg total.

Les tests menés sur deux groupes d'organismes terrestres (l'orge *Hordeum vulgare* et le ver de terre *Eisenia andrei*) ont montré que la toxicité sur l'orge était associée à la concentration du Hg mobile, tandis que la toxicité sur le ver de terre était associée à la concentration du Hg total et à la concentration du Hg soluble. Le Sol 3 avec la concentration la plus élevée de Hg mobile était le plus toxique mais le sol avec le plus fort pourcentage de Hg mobile (Sol 1) a entraîné la plus forte bioconcentration du Hg dans les tissus à la fin des tests. Des deux organismes, l'orge était le plus sensible au Hg. Selon les résultats (sols 1 et 2), plus la concentration de Hg mobile est élevée, plus les concentrations du Hg dans les tissus sont élevées (aussi bien que les BCF) et plus la toxicité pour l'orge est élevée. Le Sol 3, avec la concentration la plus élevée de Hg mobile a manifesté la toxicité la plus élevée sur les deux organismes mais une bioconcentration limitée suggérant l'existence d'un seuil dans l'assimilation du Hg.

L'étude indique que dans les sols contaminés par l'activité d'usines chlore-alcali, les concentrations du Hg mobile pourraient être utile pour l'estimation des effets toxiques sur l'orge, tandis que pour l'estimation de la toxicité aigüe sur le ver de terre les concentrations totales et la concentration de soluble dans l'eau sont importantes.

## 6.2 Recommandations

Les principales recommandations concernent l'évaluation de la spéciation par la procédure analytique de l'extraction séquentielle et l'étude de la biodisponibilité du Hg dans des sols résiduels provenant d'usines chlore-alkali.

L'analyse et l'interprétation statistique des données expérimentales a indiqué une très bonne corrélation entre la fraction soluble du Hg et le ratio chlorures/Hg total. Ceci étant, une approche plus poussée dans ce sens permettrait d'apprécier avec plus de finesse l'effet des chlorures sur la mobilité et la biodisponibilité du Hg dans les sols fortement contaminés.

De plus il pourrait être intéressant d'évaluer la spéciation du Hg dans la fraction soluble et dans la fraction échangeable.

En raison des pourcentages très satisfaisants de récupération du Hg suite à l'application de la PES mise au point durant ce projet, il pourrait être intéressant de poursuivre son utilisation pour évaluer la distribution du Hg dans des sols avec une autre provenance (activité minière de séparation du cinabre, HgS).

Pour les formes volatiles du Hg (par exemple le Hg élémentaire, le chlorure de Hg, le Hg lié aux radicaux organiques), des essais d'élaboration d'une technique de séparation et de récupération simple des composés séparément pourraient être intéressants.

Selon la littérature, il y a toujours une différence entre les concentrations du métal retenu dans les tissus des organismes exposés dans des conditions contrôlées de laboratoires et dans des conditions de terrain. Dans cette étude les concentrations trouvées dans les tissus des deux organismes ont été très élevées et par conséquent il est recommandé de rechercher aussi la biodisponibilité (BCF) dans les organismes prélevés sur les sites contaminés.

De plus, le nombre d'échantillons étudiés étant restreint ( $n=3$ ) dans ce travail, il serait intéressant d'utiliser une approche similaire avec un plus grand nombre des sols contaminés au Hg afin en particulier d'effectuer une meilleure interprétation statistique des résultats.

## CHAPITRE VII

### RÉFÉRENCES

- ABASSI, S.A. et SONI, R. (1983). Stress-induced enhancement of reproduction in earthworms exposed to chromium (VI) and mercury (II)-implications in environmental management. International Journal of Environmental Studies, 22, 43-47.
- AIDA *Industrie* (2002). Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques, France.
- BALDI, F. et BARGAGLI, R. (1984). Mercury pollution in marine sediments near a chlor-alkali plant: distribution and availability of the metal. The Science of the Total Environment, 39, 15-26.
- BALDI, F. et D'AMATO, M.L. (1986). Mercury pollution in marine sediment cores near cinnabar deposits and a chlor-alkali plant. The Science of the Total Environment, 57, 111-120.
- BERNHARD, P.C., BRINCKMAN, F.E. et IRGOLIC, K.J. (1986). Why speciation? In The importance of chemical speciation in environmental processes. Springer-Verlag, Berlin, p.7.
- BIESTER, H., GOSAR, M. et COVELLI, S. (2000). Mercury speciation in sediments affected by dumped mining residues in the drainage area of the Idrija mercury mine, Slovenia. Environmental Science and Technology, 34, 3330-3336.
- BIESTER, H., GOSAR, M. et MULLER, G. (1999). Mercury speciation in tailings of the Idrija mercury mine. Journal of Geochemical Exploration, 65, 195-204.
- BIESTER, H., MÜLLER, G. et SCHÖLER, H.F. (2002). Binding and mobility of mercury in soils contaminated by emissions from chlor-alkali plants. The Science of the Total Environment, 284, 191-203.
- BIESTER, H. et NEHRKE, G. (1997). Quantification of mercury in soils and sediments - acid digestion versus pyrolysis. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 358, 446-452.

- BIESTER, H. et SCHOLZ, C. (1997). Determination of mercury binding forms in contaminated soils: mercury pyrolysis versus sequential extractions. Environmental Science and Technology, 31, 233-239.
- BLOOM, N.S., PREUS, E., KATON, J. et HILTNER, M. (2003). Selective extractions to assess the biogeochemically relevant fractionation of inorganic mercury in sediments and soils. Analytica Chemica Acta, 479, 233-248.
- BOENING, D.W. (2000). Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. Chemosphere, 40, 1335-1351.
- BULL, K.R., ROBERTS, R.D., INSKIP, M.J. et GOODMAN, G.T. (1977). Mercury concentrations in soil, grass, earthworms and small mammals near an industrial emission source. Environmental Pollution, 12, 135-140.
- CALASANS, C.F. et MALM, O. (1997). Elemental mercury contamination in a chlor-alkali plant by the use of transplanted Spanish moss, *Tillandsia usneoides* (L.). The Science of the Total Environment, 208, 165-177.
- CASTILLO, G.C., VILA, I.C. et NEILD, E. (2000). Ecotoxicity assessment of metals and wastewater using multitrophic assays. Environmental Toxicology, 15, 370-375.
- COCKING, D., KING, M.L., RITCHIE, L. et HAYES, R. (1994). Earthworm bioaccumulation of mercury from contaminated flood plain soils. In Mercury pollution. Integration and synthesis. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, 381-395.
- COSSA, D. ET FICHT, A. (1999). La dynamique du mercure. Programme scientifique Seine-Aval, Fascicule no.11. Editions Ifremer, Ifremer Nantes, France, pp.29.
- DAVIS, A., BLOOM, N.S. et QUE HEE, S.S. (1997). The environmental geochemistry and bioaccessibility of mercury in soils and sediments: a review. Risk Analysis, 17, 557-569.
- DAVIS, R.D., BECKETT, P.H.T. et WOLLAN, E. (1978). Critical levels of twenty potentially toxic elements in young spring barley. Plant and Soil, 49, 395-408.

- DE VRIES, W. et BAKKER, D.J. (1998). Manual for calculating critical loads of heavy metals for terrestrial ecosystem: Guidelines for critical limits, calculation methods and input data. TNO Institute of Environmental Sciences, Energy Research and Process Innovation, Den Helder, The Netherlands, pp.188p.
- DI GIULIO, R.T. et RYAN, E.A. (1987). Mercury in soils, sediments, and clams from a North Carolina peatland. Water, Air, and Soil Pollution, 33, 205-219.
- DOCK, L. (May 1998). Human exposure monitoring and bioavailability issues. Proceedings of the Sixth International FZK/TNO Conference on Contaminated Soil, Edinburgh, UK, 321-329.
- EDWARDS, S.C., MACLEOD, C.L. et LESTER, J.N. (1998). The bioavailability of cooper and mercury to the common nettle (*Urtica Doica*) and the earthworm *Eisenia Fetida* drom contaminated dredge spoil. Water, Air, and Soil Pollution, 102, 75-90.
- ELLIOTT, J., AZZARIA, L.M. et BARBEAU, A. (1976). In Dossier mercure. De Minamata à Matagami. Les Publications Plein-Air Inc., 157p.
- ENVIRONNEMENT CANADA. Service de la Protection de l'Environnement. (1981). Méthodes d'échantillonnage, de conservation et de dosage du mercure. Québec, Canada, pp.85-100.
- FERNANDEZ, J.A., ABOAL, J.R. et CARBALLEIRA, A. (2000). Use of native and transplanted mosses as complementary techniques for biomonitoring mercury around an industrial facility. The Science of the Total Environment, 256, 151-161.
- FILELLA, M., TOWN, R.M. et BUFFLE, J. (2002). Speciation in freshwaters. In Chemical speciation in the environment. Blackwell Science, Abingdon, UK, 188-217.
- FISCHER, E. et KOSZORUS, L. (1992). Sublethal effects, accumulation capacities and elimination rates of As, Hg and Se in the manure worm, *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). Pedobiologia, 36, 172-178.
- FLECK, J.A., GRIGAL, D.F. et NATER, E.A. (1999). Mercury uptake by trees: an observational experiment. Water, Air, and Soil Pollution, 115, 513-523.

- GAGGI, C., CHEMELLO, G. et BACCI, E. (1991). Mercury vapour accumulation in azalea leaves. Chemosphere, 22, 869-872.
- GONZALES, H. (1991). Mercury pollution caused by a chlor-alkali plant. Water, Air, and Soil Pollution, 56, 83-93.
- GRIGAL, D.F. (2002). Inputs and outputs of mercury from terrestrial watersheds: a review. Environmental Reviews, 10, 1-39.
- GRIGAL, D.F. (2003). Mercury sequestration in forest and peatlands: a review. Journal of Environmental Quality, 32, 393-405.
- GUSTIN, M.S., TAYLOR JR., G.E. et LEONARD, T.L. (1991). Atmospheric mercury concentrations above mercury contaminated mill tailings in the Carson river drainage basin, NV. Water, Air, and Soil Pollution, 80, 217-220.
- GUSTIN, M.S., TAYLOR, G.E., JR. et MAXEY , R.A. (1997). Effect of temperature, wind velocity and concentration on the flux of elemental mercury from mill tailings to the atmosphere. Journal of Geophysical Research, 102, 3891-3898.
- HAMASAKI, T., NAGASE, H., Y., Y. et SATO, T. (1995). Formation, distribution, and ecotoxicity of methylmetals of tin, mercury, and arsenic in the environment. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 25, 45-91.
- HEMPEL, M., CHAU, Y.K.D., B.J., MCINNIS, R., KWAN, K.K. et LIU, D. (1995). Toxicity of organomercury compounds: bioassay results as a basis for risk assessment. Analyst, 120, 721-724.
- HINTON, J. et VEIGA, M.M. (2002). Earthworms as bioindicators of mercury pollution from mining and other industrial activities. Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis, 2, 269-274.
- HO, M.D. et EVANS, G.J. (2000). Sequential extraction of metal contaminated soils with radiochemical assessment of readsorption effects. Environmental Science and Technology, 34, 1030-1035.

- HORVAT, M. (1991). Determination of methylmercury in biological certified reference materials. Water, Air, and Soil Pollution, 56, 95-102.
- HORVAT, M., BLOOM, N.S. et LIANG, L. (1993). Comparison of distillation with other current isolation methods for the determination of methyl mercury compounds in low level environmental samples. Part 1. Sediments. Analytica Chimica Acta, 281, 135-152.
- HORVAT, M., COVELLI, S., FAGANELI, J., LOGAR, M., MANDIC, V., RAJAR, R., SIRCA, A. et ZAGAR, D. (1999). Mercury in contaminated coastal environments; a case study: the Gulf of Trieste. The Science of the Total Environment, 237-238, 43-56.
- KELSEY, J.W. et ALEXANDER, M. (1997). Declining bioavailability and inappropriate estimation of risk of persistent compounds. Environmental Toxicology and Chemistry, 16, 582-585.
- KERRY, R. et ALLOWAY, B.J. (1998). Bioavailability of mercury in industrially contaminated soils and sediments. Department of Soil Science, University of Reading, Reading, UK, 82p.
- KIM, C.S., BROWN, G.E. et RYTUBA, J.J. (2000). Characterization and speciation of mercury-bearing mine wastes using X-ray absorption spectroscopy. The Science of the Total Environment, 261, 157-168.
- KUNGOLOS, A., AOYAMA, I. et MURAMOTO, S. (1999). Toxicity of organic and inorganic mercury to *Saccharomyces cerevisiae*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 43, 149-155.
- LECHLER, P.J., MILLER, J.R., HSU, L.C. et DESILETS, M.O. (1997). Mercury mobility at the Carson River Superfund Site, west-central Nevada, USA: interpretation of mercury speciation data in mill tailings, soils, and sediments. Journal of Geochemical Exploration, 58, 259-267.

- LINDBERG, S.E., KIM, K.H., MEYERS, T.P. et OWENS, J.G. (1995). Micrometeorological gradient approach for quantifying air/surface exchange of mercury vapor: tests over contaminated soils. Environmental Science and Technology, 29, 126-135.
- LINDBERG, S.E., MEYERS, T.P., TAYLOR, G.E., TURNER, R.R. et SCHROEDER, W.H. (1992). Atmosphere-surface exchange of mercury to a forest: results of modeling and gradient approaches. Journal of Geochemical Research, 97, 2519-2528.
- LINDBERG, S.E. et STRATTON, W.J. (1998). Atmospheric mercury speciation: Concentrations and behavior of reactive gaseous mercury in ambient air. Environmental Science and Technology, 32, 49-57.
- LINDBERG, S.E. et TURNER, R.R. (1977). Mercury emissions from chlorine-production solid waste deposits. Nature, 268, 133-135.
- LINDBERG, S.E., TURNER, R.R., MEYERS, T.P., G.E., T.J. et SCHROEDER, W.H. (1991). Athmospheric concentrations and deposition of Hg to a deciduous forest at Walker Branch watershed, Tennessee, USA. Water, Air, and Soil Pollution, 56, 577-594.
- LODENIUS, M. (1998). Dry and wet deposition of mercury near a chlor-alkali plant. The Science of the Total Environment, 213, 53-56.
- LODENIUS, M. (1994). Mercury in terrestrial ecosystems: a review. In Mercury pollution. Integration and synthesis. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, 343-354.
- LODENIUS, M. et TULISALO, E. (1984). Environmental mercury contamination around a chlor-alkali plant. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 32, 439-444.
- LODENIUS, M., TULISALO, E. et SOLTANPOUR-GARGARI, A. (2003). Exchange of mercury between atmosphere and vegetation under contaminated conditions. The Science of the Total Environment, 304, 169-174.
- MASERTI, B.E. et FERRARA, R. (1991). Mercury in plants, soil and atmosphere near a chlor-alkali plant. Water, Air, and Soil Pollution, 56, 15-20.

- MASON, R.P., REINFELDER, J.R. et MOREL, F.M.M. (1996). Uptake, toxicity, and trophic transfer of mercury in a coastal diatom. Environmental Science and Technology, 30, 1835-1845.
- MAXAM, G., RILA, J.P., DOTT, W. et EISENTRAEGER, A. (2000). Use of bioassays for assessment of water-extractable ecotoxic potential of soils. Ecotoxicology and Environmental Safety, 45, 240-246.
- MCEBEATH, I. (1985). Étude de l'industrie canadienne du chlore. Situation de l'industrie et mesures prises contre la pollution de l'eau. Rapport SPE 5/CC/1. Environnement Canada, Canada, 141p.
- MCLEAN, J.E. et BLEDSOE, B.E. (1992). Behavior of metals in soils. Technical research document, EPA/540/S-92/018, Environmental Research Laboratory, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Ada, Oklahoma, USA, pp.1-25.
- MICHALKE, B. et SCHRAMEL, P. (1999). Quality control and reference materials in speciation analysis. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 363, 429-430.
- MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT DU QUÉBEC (MENV) (1999). Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés. Les publications du Québec, QC. Canada, 124 p.
- MOREL, F.M.M., KRAEPIEL, A.M.L. et AMYOT, M. (1998). The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. Annual Review of Ecology and Systematics, 29, 543-566.
- NAIDU, R., GUPTA, V.V.S.R., ROGERS, S., KOOKANA, R.S., BOLAN, N.S. et ADRIANO, D.C. (2003). Bioavailability of metals in the soil plant environment and its potential role in risk assessment. In Bioavailability, toxicity and risk relationships in ecosystems. Science Publishers Inc., Enfield, NH, 21-57.
- NRIAGU, J.O. (1979). In The biogeochemistry of mercury in the environment. Elsevier, North-Holland Biomedical Press, 696p.

PANDA, K.K., LENKA, M. et PANDA, B.B. (1989). Allium micronucleus (MNC) assay to assess bioavailability, bioconcentration and genotoxicity of mercury from solid waste deposits of a chloralkali plant, and antagonism of L-cysteine. The Science of the Total Environment, 79, 25-36.

PANDA, K.K., LENKA, M. et PANDA, B.B. (1990). Monitoring and assessment of mercury pollution in the vicinity of a chloralkali plant. I. Distribution, availability and genotoxicity of sediment mercury in the Rushikulya Estuary, India. The Science of the Total Environment, 96, 281-296.

PANDA, K.K., LENKA, M., et PANDA, B.B. (1992). Monitoring and assessment of mercury pollution in the vicinity of a chloralkali plant. II Plant-availability, tissue-concentration and genotoxicity of mercury from agricultural soil contaminated with solid waste assessed in barley (*Hordeum vulgare* L.). The Science of the Total Environment, 76, 33-42.

PICHARD, A. (2000). Mercure et dérives du mercure. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances dangereuses. INERIS, France, pp.43.

PICOT, A. et PROUST, N. (1995). Spéciation, toxicologie et environnement: l'exemple du mercure. Toxicorama, VII, 39-47.

PICOT, A. et PROUST, N. (1998). Le mercure et ses composés. De la spéciation à la toxicité. L'Actualité Chimique, 16-24.

PICOT, A. et PROUST, N. (2000). Speciation and toxicity: mercury and associated compounds. Journal Trace and Microprobe Techniques, 18, 183-192.

PUK, R. et WEBER, J.H. (1994). Critical review of analytical methodes for determination of inorganic mercury and methylmercury compounds. Applied Organometallic Chemistry, 8, 293-302.

REA, A.W., LINDBERG, S.E. et KEELER, G.J. (2000). Assessment of dry deposition and foliar leaching of mercury and selected trace elements based on washed foliar and surrogate surfaces. Environmental Science and Technology, 34, 2418-2425.

- REA, A.W., LINDBERG, S.E., KEELER, G.J. (2001). Dry deposition and foliar leaching of mercury and selected trace elements in deciduous forest throughfall. Atmospheric Environment, 35, 3453-3462.
- REVIS, N.W., OSBORNE, T.R., HOLDSWORTH, G. et HADDEN, C. (1989). Distribution of mercury species in soil from a mercury-contaminated site. Water, Air, and Soil Pollution, 45, 105-113.
- REVIS, N.W., OSBORNE, T.R., HOLDSWORTH, G. et HADDEN, C. (1990). Mercury in soil: a method for assessing acceptable limits. Archives Environmental Contamination and Toxicology, 19, 221-226.
- RULE, J.H. et IWASHCHENKO, M.S. (1998). Mercury concentrations in soils adjacent to a former chlor-alkali plant. Journal of Environmental Quality, 27, 31-37.
- SAKAMOTO, H., TOMIYASU, T. et YONEHARA, N. (1992). Differential determination of organic mercury, mercury(II) oxide and mercury(II) sulfide in sediments by cold vapor atomic absorption spectrometry. Analytical Sciences, 8, 35-39.
- SAKAMOTO, H., TOMIYASU, T. et YONEHARA, N. (1995). The content and chemical forms of mercury in sediments from Kagoshima bay, in comparison with Minamata Bay and Yatshuro Sea, southwestern Japan. Geochemical Journal, 29, 97-105.
- SANDOVAL, M.C., VEIGA, M., HINTON, J. et KLEIN, B. (2001). Review of biological indicators for metal mining effluents: a proposed protocol using earthworms. Proceedings of the 25th Annual British Columbia Reclamation Symposium, Campbell River, British Columbia, BC, Canada, Sept. 23-27, 67-69.
- SAUVÉ, S. (2003). The role of chemical speciation in bioavailability. In Bioavailability, toxicity and risk relationships in ecosystems. Science Publishers Inc., Enfield, NH, 59-82.
- SCHLUTER, K. (2000). Review: evaporation of mercury from soils. An integration and synthesis of current knowledge. Environmental Geology, 39, 249-271.

- SCHUSTER, E. (1991). The behaviour of mercury in the soil with special emphasis on complexation and adsorption process - a review of the literature. Water, Air, and Soil Pollution, 56, 667-680.
- SCHWESIG, D. et KREBS, O. (2003). The role of ground vegetation in the uptake of mercury and methylmercury in a forest ecosystem. Plant and Soil, 253, 445-455.
- SLADEK, C. et GUSTIN, M.S. (2003). Evaluation of sequential and selective extraction methods for determination of mercury speciation and mobility in mine waste. Applied Geochemistry, 18, 567-576.
- STEIN, E.D., COHEN, Y. et WINER, A.M. (1996). Environmental distribution and transformation of mercury compounds. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 26, 1-43.
- STEINNES, E. (1990). Mercury. In Heavy metals in soils. 1st edition. B.J. Aloway, London, UK, 222-235.
- SUSZCYNISKY, E.M. et SHANN, J.R. (1995). Phytotoxicity and accumulation of mercury in tobacco subjected to different exposure routes. Environmental Toxicology and Chemistry, 14, 61-67.
- TESSIER, A. et CAMPBELL, P.G.C. (1988). Comments on the testing of the accuracy of an extraction procedure for determining the partitioning of trace metal in sediments. Analytical Chemistry, 60, 1475-1476.
- TESSIER, A., CAMPBELL, P.G.C. (1991). Comment on " Pitfalls of sequential extractions". Water Research, 25, 115-117.
- TOMIYASU, T., NAGANO, A., SAKAMOTO, H. et YONEHARA, N. (1996). Differential determination of organic mercury and inorganic mercury in sediment, soil and aquatic organisms by cold-vapor atomic absorption spectrometry. Analytical Sciences, 12, 477-481.

TOMIYASU, T., NAGANO, A., YONEHARA, N., SAKAMOTO, H., KIMIHIKO OKI, R. et AKAGI, H. (2000). Mercury contamination in the Yatsushiro Sea, south-western Japan: spatial variations of mercury in sediment. The Science of the Total Environment, 257, 121-132.

TURNER, R.R. et LINDBERG, S.E. (1978). Behavior and transport of mercury in river-reservoir system downstream of inactive chloralkali plant. Environmental Science and Technology, 12, 918-923.

URE, A.M. et DAVIDSON, C.M. (2002). In Chemical speciation in the environment. Blackwell Science, Abingdon, UK, 452p.

WALKER, C.H., HOPKIN, S.P., SILBY, R.M. et PEAKALL, D.B. (1996). In Principles of ecotoxicology. Taylor and Francis Publishers, London ; Bristol, PA, 321p.

WALLSCHLÄGER, D., DESAI, M.V.M., SPENGLER, M. et WILKEN, R.D. (1998). Mercury speciation in floodplain soils and sediments along a contaminated river transect. Journal of Environmental Quality, 27, 1034-1044.

WASAY, S.A., BARRINGTON, S. et TOKUNAGA, S. (1998). Retention form of heavy metals in three polluted soils. Journal of Soil Contamination, 7, 103-119.

WOOD, J.M. (1984). Alkylation of metals and the activity of metal-alkyls. Toxicology and Environmental Chemistry, 7, 229-240.

YEARDLEY, R.B.J., LAZORCHAK, J.M. et GAST, L.C. (1996). The potential of an earthworm avoidance test for evaluation of hazardous waste sites. Environmental Toxicology and Chemistry, 15, 1532-1537.

YIN, Y., ALLEN, H.E. et HUANG, C.P. (1997). Kinetics of mercury (II) adsorption and desorption on soil. Environmental Science and Technology, 31, 496-503.

YIN, Y., ALLEN, H.E., LI, Y., HUANG, C.P. et SANDERS, P.F. (1996). Adsorption of mercury (II) by soil: effects of pH, chloride, and organic matter. Journal of Environmental Quality, 25, 837-844.

- ZAGURY, G.J. (1997). Étude d'un traitement par biolixivation au moyen de la microflore indigène ferrooxydante des sols contaminés aux métaux lourds (Zn, Cu, Mn). Ph.D. Thesis. Université de Sherbrooke, Québec, Canada, 176p.
- ZHANG, L. et LINDBERG, S.E. (1999). Process influencing the emission of mercury from soils: a conceptual model. Journal of Geochemical Research, 104, 21889-21896.
- ZILLIOUX, E.J., PORCELLA, D.B. et BENOIT, J.M. (1993). Mercury cycling and effects in freshwater wetland ecosystems. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, 2245-2264.

## BIBLIOGRAPHIE

- ALLARD, B. et ARSENIE, I. (1991). Abiotic reduction of mercury by humic substances in aquatic system - an important process for the mercury cycle. Water, Air, and Soil Pollution, 56, 457-464.
- ANDERSSON, A., PARKMAN, H. et JERNELOV, A. (1990). The role of sediments as sink or source for environmental contaminants - a case study of mercury and chlorinated organic compounds. Limnologica, 20, 347-359.
- BALASOIU, C.F., ZAGURY, G.J. et DESCHÈNES, L. (2001). Partitioning and speciation of chromium, copper, and arsenic in CCA-contaminated soils: influence of soil composition. The Science of the Total Environment, 280, 239-255.
- BASHOR, B.S. et TURRI, P.A. (1986). A method for determining an allowable concentration of mercury in soil. Archives Environmental Contamination and Toxicology, 15, 435-438.
- BEYER, W.N., CROMARTIE, E. et MOMENT, G.B. (1985). Accumulation of methylmercury in the earthworm, *Eisenia foetida*, and its effect on regeneration. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 35, 157-162.
- BIESTER, H., MÜLLER, G. et SCHÖLER, H.F. (2002a). Estimating distribution and retention of mercury in three different soils contaminated by emissions from chlor-alkali plants: part I. The Science of the Total Environment, 284, 177-189.
- BIESTER, H. et ZIMMER, H. (1998). Solubility and changes of mercury binding forms in contaminated soils after immobilization treatment. Environmental Science and Technology, 32, 2755-2762.
- BLOOM, N.S., COLMAN, J.A. et BARBER, L. (1997). Artifact formation of methyl mercury during aqueous distillation and alternative techniques for the extraction of methyl mercury from environmental samples. Fresenius Journal of analytical Chemistry, 358, 371-377.

- BLOOM, N.S., GILL, G.A., CAPPELLINO, S., DOBBS, C., MCSHEA, L., DRISCOLL, R. et RUDD, J. (1999). Speciation and cycling of mercury in Lavaca Bay, Texas, sediments. Environmental Science and Technology, 33, 7-13.
- BLOOM, N.S. et LASORSA, B.K. (1999). Changes in mercury speciation and the release of methyl mercury as a result of marine sediment dredging activities. The Science of the Total Environment, 237-238, 379-385.
- BRACK, K. et STEVENS, R.L. (2001). Historical pollution trends in a disturbed, estuarine sedimentary environment, SW Sweden. Environmental Geology, 40, 1017-1029.
- BRANDVOLD, D.K., MARTINEZ, P. et MATLOCK, C. (1993). Method for the determination of mercury in very small solid samples. Analytical Instrumentation, 21, 63-67.
- BUFFA, L. (1979). Rapport sur la protection de l'environnement contre le mercure au Japon. Rapport EPS-3-WP-76F. Environnement Canada. Direction de la dépollution et du contrôle. Direction générale de la pollution des eaux, Québec, Canada, 35p.
- CAI, Y., R., J. et JONES, R. (1997). Ethylmercury in the soils and sediments of the Florida Everglades. Environmental Science and Technology, 31, 302-305.
- CAMARGO, J.A., NOMBELA, G., MUNIZ, M. et NAVAS, A. (1998). Age specific sensitivity of the nematode *Aphelenchus avenae* to mercury toxicity. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 61, 149-153.
- CASTILLO, G.C., VILA, I.C. et NELLD, E. (2000). Microbial community indigenous to the earthworm *Eisenia Foetida*. Biological Fertility Soil, 31, 187-190.
- CHENG, T. et ALLEN, H.E. (2001). Prediction of uptake of copper from solution by lettuce (*Lactuca sativa* romance). Environmental Toxicology and Chemistry, 20, 2544-2551.

- DAVIDSON, C.M., THOMAS, R.P., MCVEY, S.E., PERALA, R., LITTLEJOHN, D. et URE, A.M. (1994). Evaluation of a sequential extraction procedure for the speciation of heavy metals in sediments. Analytica Chimica Acta, 291, 277-286.
- DEVAI, I., DELAUNE, R.D., PATRICK JR., W.H. et GAMBRELL, R.P. (2001). Changes in methylmercury concentration during storage: effect of temperature. Organic Geochemistry, 32, 755-758.
- EFFLER, S.W. (1986). The impact of a chlor-alkali plant on Onondaga Lake and adjoining systems. Water, Air, and Soil Pollution, 33, 85-115.
- FISCHER, R.G., RAPSOMANIKIS, S. et ANDREAE, M.O. (1995). Bioaccumulation of methylmercury and transformation of inorganic mercury by macrofungi. Environmental Science and Technology, 29, 993-999.
- FITZGERALD, W.F. et CLARKSON, T.W. (1991). Mercury and monomethylmercury: present and future concerns. Environmental Health Perspectives, 96, 159-166.
- GAGNON, C. et FISCHER, N.S. (1997). Bioavailability of sediment-bound methyl and inorganic mercury to a marine bivalve. Environmental Science and Technology, 31, 993-998.
- GAGNON, C., PELLETIER, E. et MUCCI, A. (1997). Behaviour of anthropogenic mercury in coastal marine sediments. Marine Chemistry, 59, 159-176.
- GANGULI, P.M., MASON, R.P., ABU-SABA, K.E., ANDERSSON, R.S. et RUSSELL FLEGAL, A. (2000). Mercury speciation in drainage from the New Idria mercury mine, California. Environmental Science and Technology, 34, 4773-4779.
- GIBBS, M.H., WICKER, L.F. et STEWARD, A.J. (1996). A method for assessing sublethal effects of contaminants in soils to the earthworm, *Eisenia Foetida*. Environmental Toxicology and Chemistry, 15, 360-368.
- GILL, G.A., BLOOM, N.S., CAPPELLINO, S., DRISCOLL, C.T., DOBBS, C., MCSHEA, L., MASON, R. et RUDD, J.W.M. (1999). Sediment-water flux of mercury in Lavaca Bay, Texas. Environmental Science and Technology, 33, 663-669.

GNAMUS, A., BYRNE, A.R. et HORVAT, M. (2000). Mercury in the soil-plant-deer-predator food chain of a temperate forest in Slovenia. Environmental Science and Technology, 34, 3337-3345.

GÓMEZ ARIZA, J.L., GIRÁLDEZ, I., SÁNCHEZ-RODAS, D. et MORALES, E. (2000). Metal sequential extraction procedure optimized for heavily polluted and iron oxide rich sediments. Analytica Chimica Acta, 414, 151-164.

GÓMEZ ARIZA, J.L., MORALES, E., MORALES, E., GIRÁLDEZ, I. et SÁNCHEZ-RODAS, D. (2000). Stability of chemical species in environmental matrices. Trends in analytical chemistry, 19, 200-209.

HAN, I., KINGSTON, H.M., BOYLA, H.M., RAHMAN, G.M.M., SHAN, S., RICHTER, R.C., LINK, D.D. et BHANDARI, S (2003). Speciation of mercury in soil and sediment by selective solvent and acid extraction. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 375, 428-436.

HAVEZOV, I. (1996). Atomic absorption spectrometry (AAS) - a versatile and selective detector for trace metal speciation. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 355, 452-456.

HEAVEN, S., ILYUSHCHENKO, M.A., KAMBEROV, I.M., POLITIKOV, M.I., TANTON, T.W., ULLRICH, S.M. et YANIN, E.P. (2000). Mercury in the River Nura and its floodplain, Central Kazakhstan: II. Floodplain soils and riverbank silt deposits. The Science of the Total Environment, 260, 45-55.

HEPLER, L.G. et OLOFSSON, G. (1975). Mercury: thermodynamic properties, chemical equilibria, and standard potentials. Chemical Reviews, 75, 585-602.

HEMPEL, M., WILKEN, R.D., MIESS, R., HERTWICH, J. et BEYER, K. (1995). Mercury contaminated sites - behaviour of mercury and its species in lysimeter experiments. Water, Air, and Soil Pollution, 80, 1089-1098.

HEPLER, L.G. et OLOFSSON, G. (1975). Mercury: thermodynamic properties, chemical equilibria, and standard potentials. Chemical Reviews, 75, 585-602.

- HINTELMANN, H. (1999). Comparison of different extraction techniques used for methylmercury analysis with respect to accidental formation of methylmercury during sample preparation. *Chemosphere*, **39**, 1093-1105.
- HINTELMANN, H. (1999). Distillation of methylmercury using a microdistillation technique. *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy*, **4**, 182-188.
- HINTELMANN, H., EBINGHAUS, R. et WILKEN, R.D. (1993). Accumulation of mercury (II) and methylmercury by microbial biofilms. *Water Research*, **27**, 237-242.
- HINTELMANN, H., HEMPEL, M. et WILKEN, R.D. (1995). Observation of unusual organic mercury species in soils and sediments of industrially contaminated sites. *Environmental Science and Technology*, **29**, 1845-1850.
- HINTELMANN, H., KEPEL-JONES, K. et EVANS, R.D. (2000). Constants of mercury methylation and demethylation rates in sediments and comparison of tracer and ambient mercury availability. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **19**, 2204-2211.
- HINTELMANN, H. et WILKEN, R.D. (1995). Levels of total mercury and methylmercury compounds in sediments of the polluted Elbe River: influence of seasonally and spatially environmental factors. *The Science of the Total Environment*, **166**, 1-10.
- HORVAT, M. (1991). Determination of methylmercury in biological certified reference materials. *Water, Air, and Soil Pollution*, **56**, 95-102.
- HORVAT, M., BLOOM, N.S. et LIANG, L. (1993). Comparison of distillation with other current isolation methods for the determination of methyl mercury compounds in low level environmental samples. Part 1. Sediments. *Analytica Chimica Acta*, **281**, 135-152.
- JAHANBAKHT, S., LIVARDJANI, F., RUHL, E., JAEGER, A. et LUGNIER, A. (1998). An experimental ecotoxicological model and its application to the behavioral study of inorganic mercury ( $\text{HgCl}_2$ ) in the environment. *Analysis*, **26**, 377-380.

- JOIRIS, C.R., DAS, H.K. et HOLSBECK, L. (2000). Mercury accumulation and speciation in marine fish from Bangladesh. Marine Pollution Bulletin, 40, 454-457.
- JONNALAGADDA, S.B. et PRASADA RAO, P.V.V. (1993). Toxicity, bioavailability and metal speciation - mini review. Compounds Biochemistry and Physiology, 106C, 585-595.
- KANNAN, K., SMITH JR., R.G., LEE, R.F., WINDOM, H.L., HEITMULLER, P.T., MACAULEY, J.M. et SUMMERS, J.K. (1998). Distribution of total mercury and methyl mercury in water, sediment, and fish from South Florida estuaries. Archives Environmental Contamination and Toxicology, 34, 109-118.
- KONG, I.C., BITTON, G., KOOPMAN, B. et JUNG, K.H. (1995). Heavy metal toxicity testing in environmental samples. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 142, 119-147.
- KRAMER, U. et CHARDONNENS, A.N. (2001). The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace elements. Applied Microbiology and Biotechnology, 55, 661-672.
- KRIGER, A.A. et TURNER, R.R. (1995). Field analysis of mercury in water, sediment and soil using static headspace analysis. Water, Air, and Soil Pollution, 80, 1295-1304.
- LAPORTE, J.M., TRUCHOT, J.P., RIBEYRE, F. et BOUDOU, A. (1997). Combined effects of water pH and salinity on the bioaccumulation of inorganic mercury and methylmercury in the shore crab *carcinus maenas*. Marine Pollution Bulletin, 34, 880-893.
- LAUGHLIN, M.J., ZARCINAS, B.A., STEVENS, D.P. et COOK, N. (2000). Soil testing for heavy metals. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 31, 1661-1700.
- LEIGH, D.S. (1997). Mercury-tainted overbank sediment from past gold mining in north Georgia, USA. Environmental Geology, 30, 244-251.
- LOCKWOOD, R.A. et CHEN, K.Y. (1973). Adsorption of Hg(II) by hydrous manganese oxides. Environmental Science and Technology, 7, 1028-1034.

- LOGAR, M., HORVAT, M., AKAGI, H., ANDO, T., TOMIYASU, T. et FAJON, V. (2001). Determination of total mercury and monomethylmercury compounds in water samples from Minamata Bay, Japan: an interlaboratory comparative study of different analytical techniques. Applied Organometallic Chemistry, 15, 515-526.
- MACH, M.H., NOTT, B., SCOTT, J.W., MADDALONE, R.F. et WHIDDON, N.T. (1996). Metal speciation: survey of environmental methods of analysis. Water, Air, and Soil Pollution, 90, 269-279.
- MAGALHAES, C.E.C., KRUG, F.J., FOSTIER, A.H. et BERNDT, H. (1997). Direct determination of mercury in sediments by atomic absorption spectrometry. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 12, 1231-1234.
- MANZ, M., WEISSFLOG, L., KÜHNE, R. et SCHÜÜRMANN, G. (1999). Ecotoxicological hazard and risk assessment of heavy metal contents in agricultural soils of Central Germany. Ecotoxicology and Environmental Safety, 42, 191-201.
- MARVIN-DIPASQUALE, M.C., AGEE, J., MCGOWAN, C., OREMLAND, R.S., THOMAS, M., KRABBENHOFT, D. et GILMOUR, C.C. (2000). Methyl-mercury degradation pathways: a comparison among three mercury-impacted ecosystems. Environmental Science and Technology, 34, 4908-4916.
- MARVIN-DIPASQUALE, M.C. et OREMLAND, R.S. (1998). Bacterial methylmercury degradation in Florida Everglades peat sediment. Environmental Science and Technology, 32, 2556-2563.
- MASON, R., BLOOM, N., CAPPELLINO, S., GILL, G., BENOIT, J. et DOBBS, C. (1998). Investigation of porewater sampling for mercury and methylmercury. Environmental Science and Technology, 32, 4031-4040.
- MASON, R.P. et LAWRENCE, A.L. (1999). Concentration, distribution, and bioavailability of mercury and methylmercury in sediments of Baltimore Harbor and Chesapeake Bay, Maryland, USA. Environmental Toxicology and Chemistry, 18, 2438-2447.

- MASON, R.P., LAWSON, N.M., LAWRENCE, A.L., LEANER, J.J., JENNY, G.L. et SHEU, G.-R. (1999). Mercury in the Chesapeake Bay. Marine Chemistry, 65, 77-96.
- MCLAUGHLIN, M.J., HAMON, R.E., MCLAREN, R.G., SPEIR, T.W. et ROGERS, S.L. (2000). Review: a bioavailability-based rationale for controlling metal and metalloid contamination of agricultural land in Australia and New Zealand. Australian Journal of Soil Research, 38, 1037-1086.
- MCLAUGHLIN, M.J., ZARCINAS, B.A., STEVENS, D.P. et COOK, N. (2000). Soil testing for heavy metals. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 31, 1661-1700.
- MELAMED, R., VILLAS BOAS, R.C., GONCALVES, G.O. et PAIVA, E.C. (1997). Mechanisms of physico-chemical interaction of mercury with river sediments from a gold mining region in Brasil: relative mobility of mercury species. Journal of Geochemical Exploration, 58, 119-124.
- MIKAC, N., NIJESSEN, S. et FISCHER, J.C. (2000). Effects of acid volatile sulfides on the use of hydrochloric acid for determining solid-phase associations of mercury in sediments. Environmental Science and Technology, 34, 1871-1876.
- MUHAYA, B.B.M., LEERMAKERS, M. et BAEYENS, W. (1997). Influence of sediment preservation on total mercury and methylmercury analyses. Water, Air, and Soil Pollution, 107, 277-288.
- MUKHERJEE, A.B. (1991). Industrial emissions of mercury in Finland between 1967 and 1987. Water, Air, and Soil Pollution, 56, 35-49.
- NIREL, P.M.V. et MOREL, F.M.M. (1990). Technical note. Pitfalls of sequential extractions. Water Research, 24, 1055-1056.
- PLASCHKE, R., PONT, G.D. et BUTLER, E.C.V. (1997). Mercury in waters of the Derwent Estuary-sample treatment and analysis. Marine Pollution Bulletin, 34, 177-185.

- QUEVAUVILLER, P., FILIPPELLI, M. et HORVAT, M. (2000). Method performance evaluation for methylmercury determination in fish and sediment. Trends in Analytical Chemistry, 19, 157-166.
- RAPIN (1986). Potential artifacts in the determination of metal partitioning in sediments by a sequential extraction procedure. Environmental Science and Technology, 20, 836-840.
- REGNELL, O., ANDERS, T., EWALD, G. et SANGFORS, O. (1996). Methylmercury production in freshwater microcosms affected by dissolved oxygen levels: role of cobalamin and microbial community composition. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 53, 1535-1545.
- REMY, S., PRUDENT, P., HISSLER, C., PROBST, J.L. et KREMPP, G. (2003). Total concentrations in an industrialized catchment, the Thur River basin (north-eastern France): geochemical background level and contamination factors. Chemosphere, 52, 635-644.
- RODRIGUEZ MARTIN-DOIMEADIOS, R.C., WASSERMAN, J.C., GARCIA BERMEJO, L.F., AMOUROUX, D., BERZAS NEVADO, J.J. et DONARD, O.F.X. (2000). Chemical availability of mercury in stream sediments from the Almaden area, Spain. Journal of Environmental Monitoring, 2, 360-366.
- ROTH, D.A., TAYLOR, H.E., DOMAGALSKI, J., DILEANIS, P., PEART, D.B., ANTWEILER, R.C. et ALPERS, C.N. (2001). Distribution of inorganic mercury in Sacramento River water and suspended colloidal sediment material. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 40, 161-172.
- SAOUTER, E., CAMPBELL, P.G.C., RIBEYRE, F. et BOUDOU, A. (1993). Use of partial extractions to study mercury partitioning on natural sediment particles - a cautionary note. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 54, 57-68.

- SAOUTER, E., GILLMAN, M., TURNER, R. et TAMAR, B. (1995). Development and field validation of a microcosm to simulate the mercury cycle in a contaminated pond. Environmental Toxicology and Chemistry, 14, 69-77.
- SARKAR, D., ESSINGTON, M.E. et MISRA, K.C. (1999). Adsorption of mercury (II) by variable charge surfaces of quartz and gibbsite. Soil Science Society of America Journal, 63, 1626-1636.
- SAUVANT, M.P., PEPIN, D., BOHATIER, J., GROLIERE, C.A. et GUILLOT, J. (1997). Toxicity assessment of 16 inorganic environmental pollutants by six bioassays. Ecotoxicology and Environmental Safety, 37, 131-140.
- SEMU, E. et SINGH, B.R. (1985a). Adsorption of mercury compounds by tropical soils. I. Adsorption in soil profiles in relation to their physical, chemical, and mineralogical properties. Water, Air, and Soil Pollution, 32, 1-10.
- SEMU, E. et SINGH, B.R. (1985b). Adsorption of mercury compounds by tropical soils. II. Effect of soil: soil ration, ionic strength, pH, and organic matter. Water, Air, and Soil Pollution, 32, 1-10.
- SIEGEL, S.M., SIEGEL, B.Z., PUERNER, N. et SPEITEL, T. (1975). Water and soil biotic relations in mercury distribution. Water, Air, and Soil Pollution, 4, 9-18.
- SIN, Y.M., LIM, Y.F. et WONG, M.K. (1983). Uptake and distribution of mercury in mice from ingesting soluble and insoluble mercury compounds. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 31, 605-612.
- SUBHADRA, A.V. et PANDA, B.B. (1994). Metal-induced genotoxic adaptation in barley (*Hordeum vulgare* L.) to malei hydrazide and methyl mercuric chloride. Mutation Research, 321, 93-102.
- SUBHADRA, A.V., PANDA, K.K. et PANDA, B.B. (1993). Residual mercury in seed of barley (*Hordeum vulgare* L) confers genotoxic adaptation to ethyl methanesulfonate, maleic hydrazide, methyl mercuric chloride and mercury-contaminated soil. Mutation Research, 300, 141-149.

- TESSIER, A., CAMPBELL, P.G.C. et BISSON, M. (1979). Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. Analytical Chemistry, 51, 844-851.
- TOYOTA, K. et KIMURA, M. (2000). Microbial community indigenous to the earthworm *Eisenia foetida*. Biology and Fertility of Soil, 31, 187-190.
- TRUDEL, M. et RASMUSSEN, J.B. (1997). Modeling the elimination of mercury by fish. Environmental Science and Technology, 31, 1716-1722.
- VAN WENSEM, J., VEGTER, J.J. et VAN STRAALEN, N.M. (1994). Soil quality criteria derived from critical body concentrations of metals in soil invertebrates. Applied Soil Ecology, 1, 185-191.
- VEIGA, M.M., HINTON, J. et LILLY, C. (1999). Mercury in the Amazon: a comprehensive review with special emphasis on bioaccumulation and bioindicators. NIMD (National Institute for Minamata Disease) Forum'99, Minamata, Japan, 19-39.
- WALLSCHLÄGER, D., HINTELMANN, H., EVANS, R.D. et WILKEN, R.D. (1995). Volatilisation of dimethylmercury and elemental mercury from River Elbe floodplain soils. Water, Air, and Soil Pollution, 80, 1325-1329.
- WANG, W.X., STUPAKOFF, I., GAGNON, C. et FISCHER, N.S. (1998). Bioavailability of inorganic and methylmercury to a marine deposit-feeding polychaete. Environmental Science and Technology, 32, 2564-2571.
- WEBER, J.H. (1997). In Analytical methods for the determination of mercury (II) and methylmercury compounds: the problem of speciation. Marcel Dekker Inc., New York, USA, p.1-19.
- WELP, G. et BRUMMER, G.W. (1997). Microbial toxicity of Cd and Hg in different soils related to total and water-soluble contents. Ecotoxicology and Environmental Safety, 38, 200-204.

- WILKEN, R.D. et HINTELMANN, H. (1991). Mercury and methylmercury in sediments and suspended particles from the river Elbe, north Germany. Water, Air, and Soil Pollution, 56, 427-437.
- YIN, Y., ALLEN, H.E., HUANG, C.P. et SANDERS, P.F. (1997). Interaction of Hg(II) with soil-derived humic substances. Analytica Chimica Acta, 341, 73-82.
- YONGCAN, G., ZHENZHONG, W., YOUMEI, Z. et XIAOYANG, M. (1998). Biconcentration effects of heavy metal pollution in soil on the mucosa epithelia cell ultrastructure injuring of the earthworm's gastrointestinal tract. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 60, 280-284.
- ZAGURY, G.J., SAMSON, R. et DESCHÈNES, L. (2003). Occurrence of metals in soil and ground water near chromated copper arsenate-treated utility poles. Journal of Environmental Quality, 32, 507-515.
- ZAGURY, G.J., DUDAL, Y., BUREAU, J., BASTIEN, C. et CHASSÉ, R. (2002). Sample handling and preparation for estimation of mobility, bioavailability and toxicity of contaminants in soils. In Environmental Analysis of Contaminated Sites. Sunahara GI, Renoux AY, Thellen C and Pilon A, eds., New York, USA, p.9-23.

## **ANNEXES**

**ANNEXE I: PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX**

## Caractérisation physico-chimique des échantillons de sol contaminé par le mercure



### PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Protocole # : 53A	Nombres de pages : 3
Version : 2/2	Date : 10 août 2003
Auteur(s): Carmen-Mihaela Caras	
Approuvé par:	Signatures :
Gérald Zagury	<input checked="" type="checkbox"/>
Manon Leduc	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>

**Titre :** Caractérisation physico-chimique des échantillons de sol contaminés par le mercure

**Mots clés :** méthyl-mercure, humidité, pH, matières volatiles à 550°C, capacité d'échange cationique (CEC), granulométrie (sable, silt, argile), chlorures (Cl<sup>-</sup>), soufre total (S) et carbone organique

### **1. OBJECTIF(S)**

La caractérisation physico-chimique des échantillons offre des données sur des paramètres qui déterminent la spéciation du mercure dans des matrices contaminées et sa mobilité par des phénomènes d'adsorption/absorption, de bioaccumulation et des réactions d'oxydoréduction et de compléxation.

**2. MATÉRIEL** – spécifique pour chaque indicateur, conformément au protocole d'analyse.

### **3. MÉTHODOLOGIE**

3.1. Méthyl-mercure – envoyer les échantillons dans un laboratoire spécialisé pour ce type d'analyse (Philip Corporation et McGill University)

3.2. Humidité – conformément au Protocole #: A7, version 2

Modifications.

Sécher les échantillons à  $45\pm1^{\circ}\text{C}$ , pendant au moins 72 h jusqu'à l'obtention d'une masse constante. Cette température a été choisie dans le but d'empêcher la volatilisation des composés volatiles du mercure (Gonzales, 1991; Sakamoto et al., 1992 et 1995; Maserti et Ferrara, 1991; Sladek et Gustin, 2000), au lieu de  $105^{\circ}\text{C}$ .

**Attention!** Pendant le séchage, le four doit être introduit sous la hotte chimique à cause de possibles dégagements gazeux néfastes pour la santé ( $\text{Hg}^0$  et les composés volatiles du Hg).

3.3. pH – conformément au Protocole #: A5, version 2

Modifications.

Le pH sera déterminé sur des échantillons humides:

Préparer les échantillons ainsi que le rapport solide humide: liquide soit de 1:1 (10 g sol et 10 ml d'eau distillée), agiter pendant 1 minute sur l'agitateur Wrist Action et laisser se reposer la solution jusqu'à la séparation des phases (2 heures ou plus) avant de lire le pH.

3.4. Matières solides volatiles à  $550^{\circ}\text{C}$  – conformément au Protocole #: P33-A, version 2/2, pour la matière organique

3.5. C organique - analysé dans les laboratoires du Département de Génie Minéral (GSM) le C total et dans les laboratoires de Philip Corporation le C inorganique total et obtenir le C organique par différence entre les deux (C total – C inorganique total).

3.5. Capacité d'échange cationique (CEC) – conformément au Protocole #: P33-B, version 2/2

3.5. Granulométrie (sable, silt, argile) – à cause des concentrations élevées de mercure volatile dans les échantillons, on a procédé au tamisage des sols directement dans notre laboratoire et on a déterminé les fractions conformément au Unified Soils Classification System (2 mm, 1mm et 75  $\mu\text{m}$ )

3.6. Chlorures ( $\text{Cl}^-$ ) – analysés dans les laboratoires de Philip Corporation.

3.7. Soufre total (S) et carbone organique – déterminés dans les laboratoires du Département de Génie Minéral (GSM), avec un four LECO.

#### 4. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bertrand, J.-P. et Oudjehani, K. (1999) *Détermination de la matière organique par combustion à 550°C* (Protocole #: P33-A, version: 2/2).
- Estrela, S., Zagury, G.J. et Leduc, M. (2000) *Détermination du poids sec d'un sol* (Protocole #: A7, version: 2).
- Estrela, S., Zagury, G.J. et Leduc, M. (2000) *Détermination du pH d'un sol à l'aide d'un pH-mètre* (Protocole #: A7, version: 2).
- Gonzales, H. (1991) *Mercury pollution caused by a chlor-alkali plant*, Water, Air, and Soil Pollution 56: 83-93.
- Maserati, B.E. et Ferrara, R. (1991) *Mercury in plants, soil and atmosphere near a chlor-alkali plant*, Water, Air, and Soil Pollution 56: 15-20.
- Oudjehani, K., Méthode de détermination de la Capacité d'Échange Cationique (CEC) pour un résidu minier (Protocole #: P33-B, version: 2/2), 1999.
- Sakamoto, H., Tomiyasu, T. et Yonehara, N. (1992) Differential Determination of Organic mercury, Mercury (II) Oxide and Mercury (II) Sulfide in Sediments by Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry, Analytical Sciences 8: 35-39.
- Sakamoto, H., Tomiyasu, T. et Yonehara, N. (1995) The content and chemical forms of mercury in sediments from Kagoshima Bay, in comparison with Minamata Bay and Yatshuro Sea, southwestern Japan, Geochemical Journal 29: 97-105.
- Sladek C, Gustin MS. (2003) Evaluation of sequential and selective extraction methods for determination of mercury speciation and mobility in mine waste. Applied Geochemistry 18: 567-576

## Détermination de l'humidité

		
<b>PROTOCOLE STANDARD D'OPÉRATION</b>		
Protocole # : A7	Nombres de pages : 5	
Version : 2	Date : 05-04-00	
Auteur(s): Sandra Estrela <hr/> <hr/>		
Approuvé par : Manon Leduc <hr/> <hr/> <hr/>	Signatures : <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Date :
Titre : Détermination du poids sec d'un sol		
Mots clés : poids sec, pourcentage ou taux d'humidité, pourcentage ou taux d'eau, sol, caractérisation physique		

## 1. DOMAINE D'APPLICATION

Ce protocole s'applique aux sols organiques et inorganiques, roches et matériaux similiaires.

## 2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le poids sec (aussi nommé % d'eau ou d'humidité) est déterminé par séchage à 105 (sols organiques et tourbe) ou 110°C (autres sols et roches), jusqu'à l'obtention d'une masse constante de l'échantillon. Le contenu en eau de l'échantillon à l'étude est alors considéré comme étant le ratio, exprimé en pourcentage, de la masse d'eau « libre » ou « contenue dans les pores » sur la masse d'échantillon original.

## 3. MATÉRIEL

1. Four réglable à une température constante et uniforme de 105 et 110 ± 5 ° C;
2. Balance analytique de précision de 0.0001 g;
3. Coupelles d'aluminium;
4. Dessicateur;
5. Dessicant (drierite = sulfate de calcium anhydre);
6. Gants ou pinces propres (pour manipuler les coupelles);
7. Matériel de prélèvement des échantillons (spatule, cuillère ou couteau selon les besoins).

## 4. MODE OPÉRATOIRE

Il est fortement recommandé d'effectuer au moins des duplicates lors de l'analyse du taux d'humidité de chacun des échantillons.

1. La pesée d'échantillon doit se faire dans une coupelle préalablement séchée. Pour ce faire, 2 options sont possibles : 1) Déposer les coupelles vides préalablement identifiées (initiales, date et numéro d'échantillon) dans le dessicateur suffisamment longtemps (la nuit) afin de les sécher ou 2) Déposer les coupelles préalablement identifiées au four à 105°C (apporter le dessicateur près des balances pour éviter d'humidifier les coupelles). Dans ce cas, la coupelle doit être ramenée à la température de la pièce avant la pesée de l'échantillon (1 heure dans le dessicateur);
2. Calibrer la balance selon le PSO E2;
3. Déposer la coupelle sèche sur la balance et noter le poids (PC);
4. Bien homogénéiser l'échantillon de sol à l'étude;

5. Sans remettre la balance à 0, ajouter environ 5 g de l'échantillon humide à l'étude dans la coupelle en prenant soin de prendre un échantillon représentatif (voir section NOTES pour les recommandations concernant les prélèvements) et noter le poids (PH);
6. Mettre au four la coupelle contenant l'échantillon humide et sécher au four à 105°C (sol organique ou tourbe) ou 110 °C (autre type de sol ou roches) pendant environ 16 h (minimum) ou jusqu'à ce que la masse soit constante (attendre au moins 1 h entre chaque pesée);
7. Refroidir au dessicateur à température ambiante, en s'assurant de ne pas réhumidifier l'échantillon (apporter le dessicateur près du four);
8. Calibrer à nouveau la balance selon le PSOE2;
9. Peser la coupelle contenant l'échantillon maintenant sec (apporter de nouveau le dessicateur près des balances) et noter le poids (PS);
10. Disposer des échantillons.

## 5. CALCULS

Le taux d'humidité de l'échantillon est calculé selon l'une des deux équations suivantes :

$$\frac{\% \text{ d'eau} = (\text{PH}-\text{PC})-(\text{PS}-\text{PC})*100}{(\text{PH}-\text{PC})} \quad (\text{équation 1.0})$$

ou

$$\frac{\% \text{ d'eau} = (\text{PH}-\text{PC})-(\text{PS}-\text{PC})*100}{(\text{PS}-\text{PC})} \quad (\text{équation 2.0})$$

où      PC: poids coupelle sèche (g)

PH: poids coupelle + échantillon humide (g)

PS: poids coupelle + échantillon sec (g)

L'équation 1.0 est couramment utilisée en environnement. Elle indique le % d'humidité de l'échantillon en fonction du poids humide alors que la seconde indique le % d'humidité de l'échantillon en fonction du poids sec de ce dernier (plus utilisée dans le domaine géotechnique). Il faut toujours indiquer clairement si vous utilisez le % par rapport au poids sec ou au poids humide.

Pour un même utilisateur, les duplicates d'échantillon ne devraient pas différer de plus de 7.8% de la moyenne des échantillons.

## 6. LIMITE(S) DE LA MÉTHODE

Cette méthode s'applique aux échantillons de moins de 200 g.

## 7. RÉFÉRENCE(S)

ASTM D2216-92, ASTM D2974-87

### NOTE(S)

#### *Prélèvement d'un échantillon représentatif*

- ✓ Pour favoriser l'homogénéisation de l'échantillon, bien mélanger ce dernier avant le prélèvement et prélever environ 5 portions réparties en différents endroits de l'échantillon;
- ✓ Éviter de prélever des portions en contact avec les parois du contenant où se trouve l'échantillon car ces portions risquent d'être plus humides étant donné la condensation sur les parois;

#### *Pesée de l'échantillon*

- ✓ Les balances analytiques sont très sensibles aux courants de convection générés par la chaleur. Toujours vous assurer que l'échantillon à peser est à température de la pièce;
- ✓ Dans les méthodes ASTM, on recommande de prendre un minimum de 20 g d'échantillon toutefois, ceci peut être compensé par l'utilisation de duplicates et triplicatas. Toujours prendre en note la quantité d'échantillon pesée;
- ✓ Pour un échantillon de roches, une quantité d'au moins 500 g est recommandée par l'ASTM;

#### *Séchage de l'échantillon au four*

- ✓ Attention lors du séchage de sol contaminé au four. Assurez-vous qu'il n'y a pas de dégagement gazeux néfaste pour la santé;
- ✓ La température de 105°C est très importante en ce qui a trait aux sols organiques. En effet, une température plus élevée pourrait entraîner une décomposition de l'échantillon. Si le contenu en matière organique de votre échantillon n'est pas connu, effectuer le séchage à 105 °C;

- ✓ Les matériaux contenant du gypse (sulfate de calcium dihydraté) ou un très haut taux de matière organique peuvent être problématiques lors de la détermination du taux d'humidité. En effet, ces matériaux ont tendance à se désécher au four ou à des % d'humidité très faibles telles que les conditions d'un dessicateur. Pour ce genre de matériau, il serait préférable de sécher préalablement l'échantillon à 60°C avant la pesée (ne pas oublier de ramener l'échantillon à température de la pièce). Prendre en note toute modification à la méthode standard dans ce cas;
- ✓ Si après une nuit au four l'échantillon semble toujours humide, prolonger la période de chauffage;

#### *Utilisation du dessicateur*

- ✓ Deux dessicateurs sont à votre disposition. Lorsque vous devez déplacer le dessicateur (lorsque vous allez chercher vos échantillons au four, par exemple), veuillez utiliser le dessicateur noté MOBILE;
- ✓ Il est possible de laisser refroidir les échantillons secs sur le comptoir si on utilise des couvercles étanches;
- ✓ Toujours s'assurer que le dessicant est sec avant d'utiliser le dessicateur, en cas de doute, faire sécher au four le dessicant sur un plateau.

## Détermination de la Capacité d'Echange Cationique (CEC)

 Chaire industrielle CRSNG <i>en assainissement et gestion des sites</i>	PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL
Protocole # : P33-B	Nombres de pages : 5
Version: 2/2	Date : 16/02/99
Auteur(s): Kahina Oudjehani	
Approuvé par :	Signatures :
<u>Gérald Zagury</u>	<input checked="" type="checkbox"/>
<u>Manon Leduc</u>	<input type="checkbox"/>
<u></u>	<input type="checkbox"/>
<u></u>	<input type="checkbox"/>
<b>Titre :</b> Méthode de détermination de la Capacité d'Échange cationique (CEC) pour un résidu minier	
<b>Mots clés :</b> CEC, NaOAc, NH <sub>4</sub> OAc, cations, métaux, absorption atomique.	

## 1. OBJECTIF

L'objectif principal de la CEC est d'estimer la quantité de cations échangeables dans le résidu minier. Celle ci nous permettra par la suite de connaître sa capacité de rétention ou de relargage des métaux lourds.

## 2. PRINCIPE

La méthode de détermination de la CEC est simple, elle s'effectue en trois étapes. La première étape consiste à enlever les cations échangeables adsorbés sur le résidu et les remplacer par le sodium ( $\text{Na}^+$ ) et cela par un premier lavage avec la solution d'acétate de sodium ( $\text{NaOAc}$ ). La deuxième étape est un lavage successif du résidu avec l'alcool isopropylique pour enlever l'excès de sodium. Enfin, la troisième étape est un dernier lavage qui consiste cette fois ci à récupérer le sodium en le remplaçant par l'ion ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) contenu dans la solution d'acétate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{OAc}$ ). Le sodium qui a occupé les sites vacants des cations échangeables est ensuite dosé par absorption atomique.

## 3. MATÉRIELS ET RÉACTIFS

### 3.1. Matériels

**Note :** La verrerie et les tubes à centrifugeuse doivent être préalablement lavés à l'acide ;

**Procédure :** Faire un premier trempage dans l'acide nitrique (10%) (laisser environ 3 heures), ensuite rincer 3 fois à l'eau distillée et 3 fois à l'eau purifiée. Refaire un deuxième trempage toujours dans l'acide nitrique (10 %) (Laisser environ 3 heures), puis rincer 3 fois à l'eau distillée et 3 fois à l'eau purifiée.

- ✓ Balance de 0.01 de précision ;
- ✓ Agitateur de type Wrist action et de marque Burrel ;
- ✓ Centrifugeuse ;
- ✓ Agitateur magnétique ;
- ✓ Barreau magnétique ;
- ✓ Cylindre gradué de 50 ml ;
- ✓ Tubes à centrifugeuse 50 ml en polypropylène de base ronde et de col étroit.
- ✓ Pipettes neuves et stériles 10 ml (jetables) (ne pas laver à l'acide) ;
- ✓ Pipette 50 ml ;

- ✓ Spatules en acier inoxydable ;
- ✓ Bouteilles en HDPE ou en PE (pour l'entreposage des solutions finales) ;
- ✓ Bêcher en verre 500 ml ;
- ✓ Poire à pipette ;
- ✓ Pipetman 1ml ;
- ✓ pH mètre ;
- ✓ Ballon volumétrique (100, 1000 et 2000 ml).

### 3.2. Réactifs

- ✓ Acétate de sodium  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ou bien Acétate de sodium anhydre  $\text{CH}_3\text{COONa}$
- ✓ Acide acétique glacial (99.5%) ;
- ✓ Eau purifiée (eau nanopure, résistivité  $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ) ;
- ✓ Solution de NaOH, 10 N;
- ✓ Hydroxyde d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) ;
- ✓ Alcool isopropylique 99% ;
- ✓ Acide nitrique 10% ( $\text{HNO}_3$ ) ;
- ✓ Acétate d'ammonium  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  (au cas où vous choisissez la deuxième possibilité de préparer l'acétate d'ammonium 1 N).

## 4. MÉTHODOLOGIE

### 4.1. Préparation des solutions :

**Acétate de sodium (NaOAc), 1 N :** Peser 136 g de  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ou bien 82 g d'acétate de sodium anhydre ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) dans un ballon de 1000 ml. Dissoudre avec 500 ml d'eau purifiée, puis agiter la solution sur l'agitateur magnétique pendant 15 mn, mettre le chauffage à 4 (ceci va permettre d'accélérer la dissolution des cristaux). Une fois que la solution est bien homogène, compléter jusqu'à 980 ml. Le pH de cette solution doit être 8.2. Au besoin, ajouter quelques gouttes d'acide acétique ou bien d'une solution de NaOH (selon le cas) pour ramener la solution d'acétate de sodium à pH=8.2. Lorsque le pH devient égal à 8.2 compléter la dilution jusqu'au volume de 1000 ml.

**Acétate d'ammonium (NH<sub>4</sub>OAc) 1 N :** Dans un ballon volumétrique de 2000 ml, mesurer 114 ml d'acide acétique glacial (99.5%) à l'aide des pipettes de 50 et 10 ml.

Ajouter environ 1000 ml d'eau purifiée, ensuite ajouter 138 ml d'hydroxyde d'ammonium concentré ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ). Compléter avec de l'eau purifiée jusqu'au volume de 1980 ml. Vérifier le pH pour la solution résultante. Rajouter au besoin du ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) ou de l'acide acétique glacial pour obtenir une solution de  $\text{pH} = 7$ , puis compléter jusqu'au volume 2000 ml avec de l'eau purifiée.

Acétate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{OAc}$ ) 1 N (deuxième possibilité) :

Il y a une autre façon plus simple de préparer la solution d'acétate d'ammonium 1 N ; Peser 77.08 g de  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  dans un ballon volumétrique de 1000 ml, dissoudre avec environ 300 ml d'eau purifiée ensuite compléter avec de l'eau purifiée jusqu'à environ 980 ml. Lire le pH de la solution résultante. Rajouter au besoin du ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) ou de l'acide acétique glacial pour obtenir une solution de  $\text{pH} = 7.0$ , puis compléter jusqu'au volume 1000 ml avec de l'eau purifiée.

#### 4.2. Procédure d'extraction :

Note: À réaliser en duplicata.

1. Peser 4 g de résidu minier dans le tube à centrifugeuse.
2. Déterminer en parallèle sur un autre échantillon la teneur en eau (PSO A7), (les résultats seront exprimés en poids sec).
3. Mesurer 33 ml de la solution NaOAc 1 N dans un cylindre de 50 ml, ensuite les ajouter dans le tube à centrifugeuse. Fermer bien le tube puis agiter pendant 5 mn dans l'agitateur Wrist action à vitesse 5.
4. Centrifuger à 10,000 rpm jusqu'à ce que le surnageant soit clair (approximativement 10mn).
5. Pipetter le surnageant à l'aide des pipettes 10 ml et s'en défaire en évitant de prendre des particules de sols (prendre des pipettes neuves pour chaque échantillon). NB : pour pipetter le fond du tube utiliser le pipetman 1 ml.
6. Répéter les étapes 3, 4 et 5 deux autres fois.
7. Mesurer maintenant 33 ml d'alcool isopropylique 99% à l'aide du cylindre gradué 50 ml, ajouter les ensuite dans le tube à centrifugeuse. Fermer bien le tube puis agiter pendant 10 mn dans l'agitateur Wrist action à vitesse 5.

8. Faire exactement les étapes 4 et 5.
9. Refaire les étapes 7 et 8 deux autres fois.
10. Ajouter maintenant 33 ml de NH<sub>4</sub>OAc *IN*, fermer bien le tube puis agiter pendant 5 mn dans l'agitateur Wrist action à vitesse 5.
11. Centrifuger à 10,000 rpm jusqu'à ce que le surnageant soit clair (approximativement 10 mn).
12. Retirer à l'aide des pipettes 10 ml le surnageant et le récupérer dans un ballon volumétrique de 100 ml (prendre des pipettes neuves pour chaque échantillon).
13. Répéter les étapes 10, 11 et 12 deux autres fois en additionnant les surnageants de l'étape 12 dans le même ballon de 100 ml.
14. Diluer la solution récupérée dans le ballon jusqu'au volume exact de 100 ml avec la solution de NH<sub>4</sub>OAc *IN*, (car le volume total récupéré sera inférieur à 100 ml).
15. Le sodium Na est dosé par absorption atomique.

## 5. CALCUL

Où,

$$CEC = \left( \frac{a}{10} \right) \times \left( \frac{1}{23} \right) \times \left( \frac{100}{b} \right) \quad [meq / 100g \text{ residu sec}]$$

a = Concentration de sodium (mg/l);

b = Masse du résidu sec (g).

### Remarques

- ✓ Ne pas laisser les solutions de sodium dans les ballons volumétriques une fois l'expérience finie, entreposer les dans des bouteilles en HDPE ou en PE à 4 °C et doser les à l'absorption atomique le plutôt possible.
- ✓ On peut réaliser l'expérience de la CEC pour 4 échantillons en duplicata en même temps, mais pas plus, car on ne peut utiliser que 8 tubes à centrifugeuse à la fois.

## 6. RÉFÉRENCES

Chapman, H.D. 1965. Cation exchange capacity. Methods of soil analysis, part 2. Chemical and microbiological properties, 891-901.

Bower, C.A., Reitmeir, R.F., and Fireman, M. 1952. Exchangeable cation analysis of saline and alkali soils. Soil Science. A : 63-79.

## 7. RECOMMANDATIONS

La détermination de la CEC est une expérience délicate à réaliser. Pour ce faire, il faut toujours s'assurer qu'au moment de pipetter le surnageant, les particules de résidu ne soient pas prises.

- ✓ Il est recommandé de réaliser cette expérience en duplicita ou en triplicata pour pouvoir comparer vos résultats. Pour réaliser cette expérience en triplicata vous ne pouvez l'effectuer que sur 2 échantillons à la fois, car l'espace dans la centrifugeuse est disponible uniquement pour 8 tubes. Par contre vous pouvez l'effectuer sur 4 échantillons si vous décidez de la faire en duplicita.
- ✓ Il est à conseiller d'envoyer avec les échantillons pour le dosage du sodium un blanc (juste de l'eau purifiée), et une solution dont la concentration en Na est connue (préparée avec du NaCl).
- ✓ Si vous avez plusieurs échantillons à faire en même temps, utilisez des pipettes propres (jetables) pour chacun des échantillons et pour chacun des réplicats.

**Détermination des solides volatiles à 550°C**

		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # :P33-A	Nombres de pages :04		
Version :	Date :08/06/99		
Auteur(s): <u>Jean-Philippe Bertrand</u> <u>Kahina Oudjehani</u>			
Approuvé par :	Signatures :	Date :	
Gérald Zagury	<input checked="" type="checkbox"/>	_____	
Sandra Estrela	<input checked="" type="checkbox"/>	_____	
Titre : Détermination de la matière organique par combustion à 550°C.			
Mots clés : Matière organique, matière volatile, cendres, résidu.			

### 1. OBJECTIF

La méthode de détermination de la matière organique par combustion du résidu à 550°C permet de déterminer le pourcentage des cendres (matière minérale). Cette donnée est ensuite utilisée pour calculer le pourcentage de la matière organique contenue dans le résidu. L'étape de séchage à 105°C permet également de déterminer le pourcentage d'eau.

### 2. MATÉRIELS

- ✓ Four à 550 °C ;
- ✓ Creuset en porcelaine, 30 ml résistant à des températures élevées, préalablement nettoyé ;
- ✓ Dessiccateur ;
- ✓ Balance analytique (précision de 0.0001 g) ;
- ✓ Spatule, cuillère, etc. (propres) ;
- ✓ Four réglable à une température constante et uniforme de 105 °C ± 5 °C ;
- ✓ Gants de protection contre la chaleur ;
- ✓ Paire de pinces en acier à long manche.

### 3. MÉTHODOLOGIE

#### À réaliser en duplicita

1. Peser environ précisément 5 g de résidu dans un creuset de porcelaine préalablement pesé;
2. Mettre à sécher dans le four à 105 °C pendant 12 h au minimum ;
3. Placer au dessicteur pendant 30 mn au minimum ;
4. Peser le creuset ;
5. Remettre à l'étuve pour une période de deux heures et reprendre les étapes 3 et 4 ;
6. Reprendre l'étape 5 jusqu'à l'obtention d'un poids constant (différence de 5 mg au maximum) ;
7. Placer le creuset + résidu dans le four à 550 °C ;
8. Laisser l'échantillon dans le four pendant un minimum de 16 h ;
9. Placer l'échantillon dans le dissicateur, le laisser au minimum 1 h ;
10. Peser l'échantillon après refroidissement dans le dessiccateur ;

11. Noter le poids creuset + cendres ;
12. Remettre l'échantillon dans le four à 550 °C pour environ 2 h ;
13. Répéter les opérations 9 à 11 ;
14. Si le poids entre la première pesée et la deuxième est constant (différence de 5 mg au maximum) passer aux calculs, sinon refaire les étapes 12 et 13 jusqu'à ce que le poids soit constant.

#### **4. CALCULS**

Calcul du % d'eau

$$\% \text{ d'eau} = [(a-c)-(b-c)]/(a-c) \times 100$$

Où, a = poids initial (g) du creuset + échantillon humide

b = poids final (g) du creuset + échantillons sec

c = poids du creuset vide

Calcul du % des cendres

$$\% \text{ Cendres} = [(a - c)/(b - c)] \times 100$$

Où, a = poids final (g) du creuset + cendres

b = poids initial (g) du creuset + résidu (séché à 105 °C)

c = poids (g) du creuset vide

Calcul du % de la matière organique

$$\% \text{ matière organique} = 100 - \% \text{ cendres} (\text{calculé dans 2})$$

**Notes:**

- ✓ Les poids sont notés à 0.0001 g près.
- ✓ Les creusets ne doivent pas être manipulés à main nues.
- ✓ Les manipulations dans le four à 550 °C se font à l'aide de gants de protection contre la chaleur et d'une paire de pinces à long manche.
- ✓ Avant de mettre l'échantillon dans le four à 550 °C, il est préférable de maintenir la température de celui-ci à 375 °C pendant 1 h. Ensuite mettre l'échantillon. Dans notre cas le four n'est pas réglable, donc il nous est impossible d'obtenir un profil de température.

## 5. RÉFÉRENCES

ASTM D2974 1988 (Soil Sampling and Methods of Analysis. M.R. Carter (Ed) Canadian Society of Science.

Protocole P33-A version 1/2

## Procédure d'extraction séquentielle (PES) du Hg de sol contaminé

 Chaire industrielle CRSNG <i>en assainissement et gestion des sites</i>	<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>
Protocole # : 53B	Nombres de pages : 8
Version: 2/2	Date : 10 août 2003
Auteur(s): Carmen-Mihaela Caras	
Approuvé par :	Signatures :
<u>Gérald Zagury</u>	<input checked="" type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>
<u>Manon Leduc</u>	<input type="checkbox"/>
<b>Titre :</b> Protocole pour la détermination de la spéciation du mercure dans des sols contaminés, à l'aide d'une procédure d'extraction séquentielle (PES).	
<b>Mots clés :</b> procédure d'extraction séquentielle (PES), mercure, sols contaminés par résidus d'usines chlore-alkali	

### 1. OBJECTIF(S)

La mobilité et la biodisponibilité des métaux sont fonction de leur spéciation. Afin d'évaluer qualitativement et quantitativement les formes du mercure présentes dans des matrices contaminées (des sols), on peut appliquer une procédure d'extraction séquentielle (PES). La méthode développée est une modification des techniques appliquées par Di Giulio et Ryan (1986), Revis *et al.* (1989), Panda *et al.* (1989, 1990 et 1992), Lechler *et al.* (1997) et Wallschläger *et al.* (1998).

Les étapes à suivre seront :

1. Analyse du mercure total (THg) (Akagi et Nishimura, 1991)
2. Analyse du mercure élémentaire ( $Hg^0$ ) (Lechler *et al.*, 1997; Sladek et Gustin, 2000)
3. Séparation des 4 fractions :
  - Soluble dans l'eau (Di Giulio et Ryan, 1986)
  - Échangeable (Panda *et al.*, 1989, 1990 et 1992; McLaughlin *et al.*, 2000)
  - Organique (OHg) (Lechler *et al.*, 1997)
  - Résiduelle (les sulfures et les silicates principalement) (Akagi et Nishimura, 1991)

### 2. MATÉRIEL

REACTIFS	QUANTITE REQUISE
$HNO_3$ (acide nitrique), concentré (70% p/v)	2 ml*3éch.*(22-26) = 132-156 ml
$HClO_4$ (acide perchlorique), concentré 70% (p/v)	2 ml*3éch.*(22-26) = 132-156 ml
$H_2SO_4$ (acide sulfurique), concentré 98% (p/v)	10 ml*3éch.*(22-26) = 660-780 ml
$CaCl_2$ (chlorure de calcium), 1M	20 ml*3éch.*(3-4) = 180-240 ml
$NaOAc$ (acétate de sodium) – EDTA 0,5M	20 ml*3éch.*(3-4) = 180-240 ml
$NaOH$ 0,2N	20 ml*3éch.*(6-8) = 360-480 ml
$CH_3COOH$ 4% (v/v)	20 ml*3éch.*(6-8) = 360-480 ml

<b>VERRERIE</b>	<b>QUANTITE REQUISE</b>
Ballon jaugé de 1000 ml en verre avec bouchon	4
Ballon jaugé de 250 ml en verre avec bouchon	1
Ballon jaugé de 100 ml en verre avec bouchon	Min.15
Bouteilles de 1000 ml en verre avec bouchon	4
Bécher de 100 ml en verre	5
Pipettes volumétriques 20ml, 10ml	1+1
Micropipettes 10ml, 5ml, 1ml	1+1+1
Erlenmeyer avec entonnoirs pour filtration à vide	10

<b>AUTRES MATERIELS</b>	<b>QUANTITE REQUISE</b>
pH-mètre et solutions tampons standard	1
Balance analytique Mettler Toledo AB204 ou PB302 (précision de $\pm 0,002\text{g}$ )	1
Centrifugeuse Beckman J2+Rotor pouvant aller jusqu'à 10 000 rpm	1
Agitateur de type Wrist Action	1
Étuve pouvant être fixée à 45°C	1
Four pouvant être fixé à 180°C	1
Plaque chauffante pouvant être fixée à 250°C	1
Tubes à centrifugation de 40 ml en polypropylène copolymérisé (PPCO) avec bouchons	Au moins 8
Bac de lavage pour la verrerie	1
Bac de rinçage pour la verrerie	1
Barreaux magnétiques	2
Support à tubes	1
Spatules en téflon	3
Dessiccateur	1
Coupelles en aluminium (pour $\text{Hg}^0$ )	7
Bouteille PP, 50 ml	Au moins 50 pour chaque échantillon $[5\text{THg} + 5\text{Hg}^0 + 8 * (\text{F1} + \text{F2} + 2 * \text{F3} + \text{F4})]$
Papier filtre Wattman	Au moins 45 filtre

### 3. MÉTHODOLOGIE

#### 3.1. Lavage du matériel

Avant de débuter l'expérience, s'assurer de bien laver toute la verrerie de même que le matériel en Téflon et en PPCO à l'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) 10%(v/v) puis de la rincer.

Pour ce faire, laver tout d'abord la vaisselle à l'aide d'un détergent doux et d'eau distillée, puis rincer à l'eau distillée. Une fois la vaisselle lavée, déposer (à l'aide de gants en nitrile) le matériel propre dans le bac de lavage No.1 à l'acide nitrique 10% (v/v) situé sous la hotte #4 pour la nuit. Le lendemain, sortir la vaisselle du bac à l'aide des gants et d'un bac à vaisselle et rincer 3 fois à l'eau distillée au-dessus de l'évier. Une fois la vaisselle rincée à l'eau distillée, remettre dans le second bac de lavage à l'acide nitrique 10%(v/v) situé sous la hotte #4 pour une heure. Au bout d'une heure, sortir le matériel et le rincer 3 fois à l'eau distillée et 3 fois à l'eau déionisée. Après, sécher toute la verrerie dans les hottes chimiques, sur des plateaux propres.

#### 3.2. Préparation des solutions

##### 1 000 ml de $\text{HNO}_3$ 10%(v/v):

- Verser 500 ml d'eau déionisée dans un ballon de 1000 ml;
- Transférer 100 ml de solution de  $\text{HNO}_3$  concentrée (70% p/v) dans le ballon de 1000 ml et agiter, de façon circulaire (**Ne pas inverser le ballon à ce moment!**);
- Compléter à la jauge avec de l'eau déionisée ;
- Bien agiter par inversion complète.

##### 1 000 ml 1M $\text{CaCl}_2$

- Peser 110,99 g  $\text{CaCl}_2$  (chlorure de calcium anhydre) et les déposer dans un ballon de 1000 ml;
- Ajouter un peu d'eau déionisée pour dissoudre les cristaux;
- Compléter jusqu'à la jauge avec l'eau déionisée et bien agiter.

1 000 ml 0.5M NH<sub>4</sub>Ac-EDTA

- Peser 38,54 g NH<sub>4</sub>Ac (acétate d'ammonium) et les déposer dans un bécher;
- Ajouter un peu d'eau déionisée pour dissoudre les cristaux;
- Transférer la solution obtenue dans un ballon de 1000 ml ;
- Peser 186,12 g EDTA\*2H<sub>2</sub>O #37560-300 Anachemia (le sel disodique de l'acide éthylène diammino tetraacétique) et les déposer dans un autre bécher;
- Ajouter un peu d'eau déionisée. Le pH de cette solution, doit être ajusté à 8. Noter le pH de cette solution puis ajouter quelques gouttes d'hydroxyde d'ammonium (NH<sub>4</sub>OH) concentré, 28% (p/v) à l'aide d'une pipette Pasteur jusqu'à l'obtention d'un pH de 8.
- Transférer la solution obtenue dans le même ballon de 1000 ml, qui contient déjà la solution de NH<sub>4</sub>Ac (acétate d'ammonium);
- Mélanger, compléter avec l'eau déionisée jusqu'à la jauge et bien agiter.

1 000 ml 4% (v/v) CH<sub>3</sub>COOH

- Verser 500 ml d'eau déionisée dans un ballon de 1000 ml;
- Transférer 40 ml de solution acide acétique glaciale dans le ballon de 1000 ml, à l'aide d'un cylindre gradué ;
- Compléter avec l'eau déionisée jusqu'à la jauge et agiter pour bien homogénéiser la solution.

**3.3. Procédure d'extraction séquentielle (PES)**

Les analyses sur les échantillons de sol seront effectuées au moins en triplicata. Après

chaque étape, les extraits seront envoyés à un laboratoire spécialisé pour l'analyse du Hg.

Les étapes à suivre sont les suivants :

**Étape 1: Analyse du mercure total (THg)**

1. Peser directement, à l'aide d'une balance analytique,  $1,0000 \pm 0,0050$  g de sol contaminé dans un ballon de 100 ml;
2. Ajouter dans le ballon 2 ml d'acide nitrique concentré, 10 ml d'acide sulfurique concentré et 2 ml d'acide perchlorique concentré, à l'aide de micropipettes (pipetman);
3. Mettre le bouchon, pas serré, et placer le ballon sur une plaque chauffante, sous la hotte chimique;
4. Chauffer le ballon à  $250^{\circ}\text{C}$  (#4) pendant 1 h. **Ne pas laisser sécher l'échantillon!**
5. Fermer le chauffage, retirer le ballon des plaques à l'aide de gants isolants et attendre qu'il refroidisse dans la hotte chimique;
6. Une fois le digestat refroidi, filtrer avec beaucoup de soin, sur un papier Wattman, dans des Erlenmeyer pour filtration à vide;
7. Transférer le filtrat dans des ballons de 100 ml;
8. Bien rincer les Erlenmeyers, compléter jusqu'à la jauge avec de l'eau déionisée et bien agiter;
9. Verser 50 ml du contenu du ballon jaugé dans une bouteille de PP de 50 ml;
10. Les bouteilles de PP de 50 ml contenant les digestats seront envoyées chez Philip Corporation pour l'analyse du mercure.

Précautions :

Tous les contenants doivent être numérotés.

Pour chaque fraction analysée, faire un blanc, en parallèle avec les échantillons. Travailler dans les mêmes conditions mais au lieu de l'échantillon, utiliser de l'eau distillée.

## Étape 2: Analyse du mercure volatile

### 2.1 Déterminer la concentration du mercure résiduel (RHg)

1. Peser 5 g de sol contaminé ( $n=5$ ) dans une cupule d'aluminium, séchée au préalable, jusqu'au poids constant (comme pour la détermination de l'humidité), à  $45^{\circ}\text{C}$ ;
2. Garder l'échantillon pendant 48 heures à une température de  $180^{\circ}\text{C}$ , dans un four, sous la hotte;
3. Sortir le résidu du four et le garder dans un dessiccateur, pendant une heure, pour se refroidir;
4. Digérer 1 g du résidu de chaque cupule d'aluminium, comme pour le mercure total (THg) suivant les points 1 à 10 de l'étape 1;
5. Envoyer les bouteilles chez Philip Corporation pour l'analyse du mercure.

### 2.2 Déterminer la concentration du mercure élémentaire

Déterminer la concentration du mercure volatil, par différence entre le mercure total (THg), déterminé à l'étape 1 et le mercure résiduel (RHg), déterminé à l'étape 2.1 :

$$\text{THg-RHg} = \text{Hg volatil}$$

Étape 3: Séparation des 4 fractions (PES proprement dite) :

### 3.1 La fraction soluble dans l'eau ( $F_1$ )

1. Peser  $2,0000 \pm 0,0050$  g de sol dans 6 tubes à centrifugeuse 40ml PPCO;
2. Ajouter 20 ml d'eau déionisée à chaque tube à centrifugation à l'aide d'une micropipette de 20 ml;
3. Boucher les tubes et les fixer sur un agitateur Wrist-Action (fixer la vitesse à 5), faire agiter pendant 2h à la température de la pièce ( $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ );
4. Centrifuger les tubes pendant 20-30 minutes à 10 000 rpm, à  $10^{\circ}\text{C}$ ;
5. Pipeter le surnageant à l'aide d'une micropipette de 1ml et de 5 ml (en prenant soin de ne pas prélever de particules solides) et le déposer dans une bouteille de PP de 50 ml;
6. Rincer deux fois (20ml+10ml) avec de l'eau distillée et déionisée ajoutée à l'aide d'une pipette de 10 ml, et refaire les étapes de 3 à 5, mais agiter 15 minutes et déposer le surnageant dans la même bouteille de PP de 50 ml avec le premier extrait;
7. Envoyer les bouteilles pour l'analyse du mercure;

8. Conserver le culot pour l'étape suivante.

### **3.2 La fraction échangeable ( $F_2$ )**

Les deux solvants proposés sont :

Variante 1 : utiliser une solution de 0.5M NH<sub>4</sub>Ac-EDTA, pour évaluer la fraction échangeable (potentielle biodisponible, selon Panda *et al.*, 1989, 1990 et 1992; McLaughlin *et al.*, 2000);

Variante 2 : utiliser une solution de 1M CaCl<sub>2</sub> pour évaluer la fraction totale échangeable (Panda *et al.*, 1989, 1990 et 1992; McLaughlin *et al.*, 2000).

Les deux solvants proposés vont être utilisés pour tous les échantillons.

9. Ajouter 20 ml de solution NH<sub>4</sub>Ac-EDTA de 0.5M à 3-4 tubes obtenus à l'étape 8 à l'aide d'une pipette volumétrique de 20 ml à la température de la pièce;
10. Ajouter 20 ml de solution de CaCl<sub>2</sub> de 1M aux autres 3-4 tubes obtenus à l'étape 8 à l'aide d'une pipette volumétrique de 20 ml à la température de la pièce;
11. Boucher les 6-8 tubes et les fixer sur un agitateur Wrist-Action (ajusté à 5), faire agiter pendant 2h à température de la pièce (21±2°C);
12. Centrifuger les tubes pendant 20-30 minutes à 10 000 rpm, à 10°C;
13. Pipeter le surnageant à l'aide des micropipettes de 10 ml et de 5 ml (en prenant soin de ne pas prélever de particules solides) et le déposer dans une bouteille de PP de 50 ml;
14. Rincer deux fois (20ml+10ml) avec de l'eau distillée et déionisée ajoutée à l'aide d'une pipette de 10 ml, et refaire les étapes de 3 à 5, mais agiter 15 minutes et déposer le surnageant dans les mêmes bouteilles de PP de 50 ml avec les premiers extraits, pour chaque variante de la méthode, respectivement;
15. Envoyer les bouteilles pour déterminer le mercure comme THg;
16. Conserver le culot pour l'étape suivante.

### **3.3 La fraction organique, OHg ( $F_3$ )**

17. Ajouter 20 ml de 0.2N NaOH aux 6-8 tubes à centrifugation contenant les culots obtenus à l'étape 16 à l'aide d'une micropipette de 20 ml;

18. Boucher les tubes et les fixer sur un agitateur Wrist-Action (ajusté à 5), faire agiter pendant 2h à température de la pièce ( $21\pm2^{\circ}\text{C}$ );
19. Centrifuger les tubes pendant 15 minutes à 10 000 rpm, à  $10^{\circ}\text{C}$ ;
20. Pipeter le surnageant à l'aide des micropipettes de 10 ml et de 5 ml (en prenant soin de ne pas prélever de particules solides) et le déposer dans une bouteille de PP de 50 ml;
21. Ajouter 20 ml 4% CH<sub>3</sub>COOH (v/v) aux 6-8 tubes à centrifugation contenant les culots obtenus à l'étape 20 à l'aide d'une pipette de 10 ml (2 x 10 ml);
22. Boucher les tubes et les fixer sur un agitateur Wrist-Action (ajusté à 5), faire agiter pendant 2h à température de la pièce ( $21\pm2^{\circ}\text{C}$ );
23. Centrifuger les tubes pendant 15 minutes à 10 000 rpm, à  $10^{\circ}\text{C}$ ;
24. Pipeter le surnageant à l'aide d'une micropipette de 10 ml et de 5ml (en prenant soin de ne pas prélever de particules solides) et le déposer dans une bouteille de PP de 50 ml;
25. Rincer deux fois (20ml+10ml) avec de l'eau distillée et déionisée ajoutée à l'aide d'une pipette de 10 ml, et refaire les étapes de 3 à 5, mais agiter 15 minutes et déposer le surnageant dans les bouteilles de PP de 50 ml avec les extraits à l'acide acétique;
26. Envoyer les bouteilles pour déterminer le mercure comme THg;
27. Conserver le culot pour l'étape suivante.

#### **3.4. La fraction résiduelle, RHg (F<sub>4</sub>)**

28. Extraire le mercure résiduel des 6-8 culots comme pour le THg (répéter avec les culots obtenus à l'étape 27, toutes les étapes de l'analyse du THg, de 1 à 10);  
**Attention! Pour la digestion des culots de la PES respecter exactement le rapport sol : mélange oxydant, 1 : 7 comme pour la digestion du sol frais.**

#### 4. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akagi, H. et Nishimura, H. (1991) *Speciation of mercury in the environment*, Advances in Mercury Toxicology, Edited by T. Suzuki et al., Plenum Press, New York: 53-76.
- Estrela, S., Zagury, G.J. et Leduc, M. (1999) Détermination de la répartition des métaux (Cr et Cu) dans chacune des fractions de sol de six sites entourant des poteaux appartenant à Bell Canada à l'aide de la technique d'extraction séquentielle sélective (ESS), Protocole expérimental #: PE 32D, version: 2.
- Di Giulio, R.T. et Ryan, E.A. (1986) *Mercury in soils, sediments, and clams from a North Carolina peatland*, Water, Air, and Soil Pollution 33: 205-219.
- Lechler, P.J., Miller, J.R., Hsu, L.C. et Desilets, M.O. (1997) Mercury mobility at the Carson River Superfund Site, west-central Nevada, USA: interpretation of mercury speciation data in mill tailings, soils, and sediments, Journal of Geochemical Exploration 58: 259-267.
- McLaughlin, M.J., Zarcinas, B.A., Stevens, D.P. et Cook, N. (2000) *Soil Testing for Heavy Metals*, Communications in Soil Science and Plant Analysis 31(11-14): 1661-1700.
- Panda, K.K., Lenka, M. et Panda, B.B. (1992) Monitoring and assessment of mercury pollution in the vicinity of a chloralkali plant. II Plant-availability, tissue-concentration and genotoxicity of mercury from agricultural soil contaminated with solid waste assessed in barley (*Hordeum vulgare* L.), Environmental Pollution 76: 33-42.
- Panda, K.K., Lenka, M. et Panda, B.B. (1988) Allium micronucleus (MNC) assay to assess bioavailability, bioconcentration and genotoxicity of mercury from solid waste deposits of a chloralkali plant, and antagonism of L-cysteine, The Science of the Total Environment 79: 25-36.
- Panda, K.K., Lenka, M. et Panda, B.B. (1990) Monitoring and assessment of mercury pollution in the vicinity of a chloralkali plant. I. Distribution, availability and

genotoxicity of sediment mercury in the Rushikulya Estuary, India, *The Science of the Total Environment* 96: 281-296.

Revis, N.W., Osborne, T.R., Holdsworth, G. et Hadden, C. (1989) *Distribution of mercury species in soil from a mercury-contaminated site*, *Water, Air, and Soil Pollution* 45: 105-113.

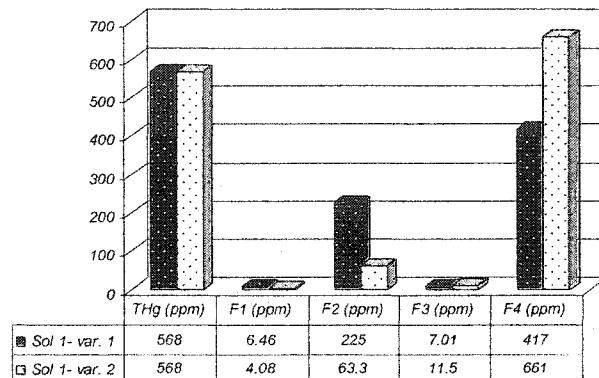
Sladek C, Gustin MS. (2003) Evaluation of sequential and selective extraction methods for determination of mercury speciation and mobility in mine waste. *Applied Geochemistry* 18: 567-576.

Wallschläger, D., Desai, M.V.M., Spengler, M. et Wilken, R.D. (1998) *Mercury Speciation in Floodplain Soils and Sediments along a Contaminated River Transect*, *Journal of Environmental Quality* 27: 1034-1044.

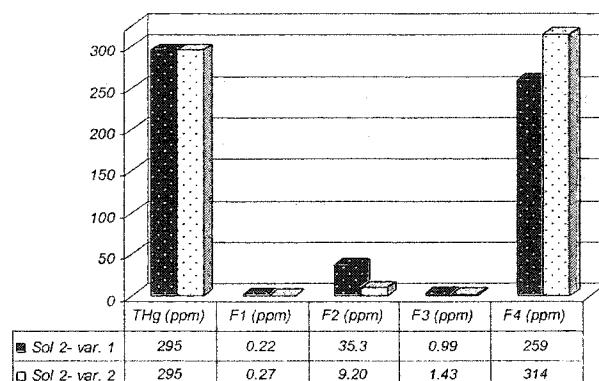
**ANNEXE II : RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX**

### Résultats de la partition du Hg par les deux variantes de PES

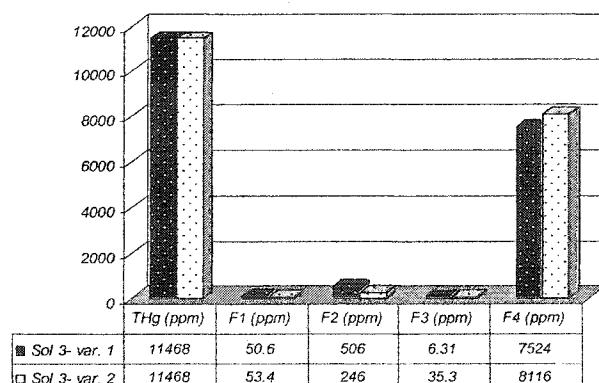
Graphique 1. PES – Sol 1



Graphique 2. PES – Sol 2



Graphique 3. PES – Sol 3



### Résultats des essais écotoxicologiques

Graphique 4. Inhibition de la croissance de l'orge – Sol 1

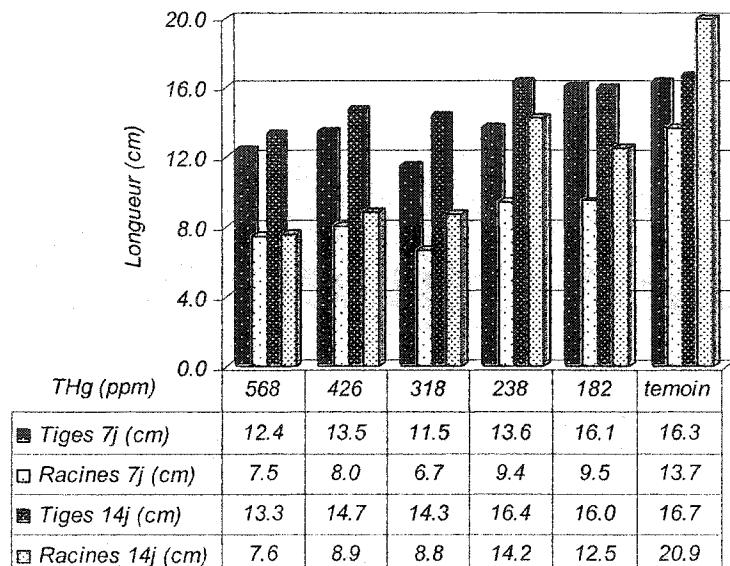


Tableau 1. Sol 1 (t-student)

THg (mg/kg)	568	426	318	238	182
Tiges 7j	0,002	0,009	0,002	0,011	0,760
Racines 7j	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Tiges 14j	0,018	0,113	0,114	0,794	0,706
Racines 14j	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Tableau 2 . Sol 1 (% inhibition)

THg (mg/kg)	568	426	318	238	182
Tiges 7j	23,6	17,2	29,5	16,2	1,33
Racines 7j	45,3	41,3	51,3	31,3	30,5
Tiges 14j	20,2	11,5	14,0	1,80	3,74
Racines 14j	63,7	57,5	58,0	32,0	40,2

Graphique 5. Inhibition de la croissance de l'orge – Sol 2

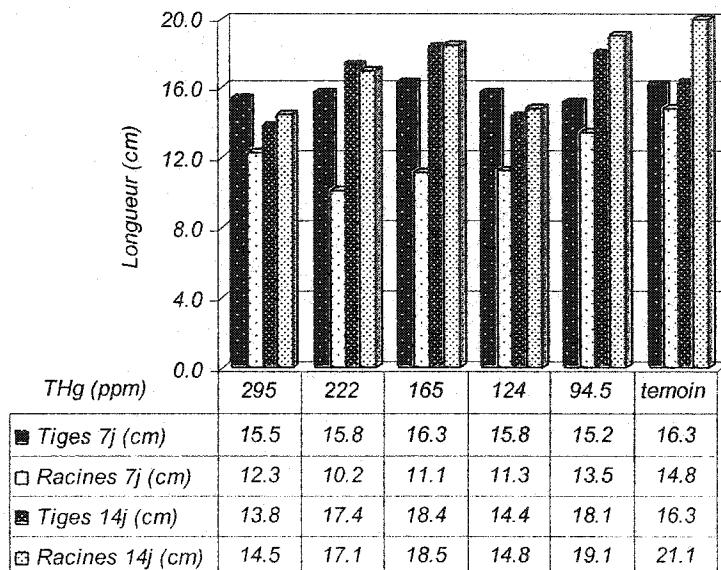


Tableau 3. Sol 2 (t-student)

THg (mg/kg)	295	222	165	124	94,5
Tiges 7j	0,262	0,377	0,878	0,708	0,059
Racines 7j	0,001	0,000	0,000	0,003	0,034
Tiges 14j	0,124	0,303	0,048	0,303	0,072
Racines 14j	0,001	0,006	0,037	0,007	0,182

Tableau 4. Sol 2 (% inhibition)

THg (mg/kg)	295	222	165	124	94,5
Tiges 7j	4,92	2,87	-0,46	2,77	6,46
Racines 7j	17,3	31,5	25,0	23,8	9,10
Tiges 14j	15,2	-6,99	-13,3	11,6	-11,1
Racines 14j	31,0	19,0	12,0	29,6	9,18

Graphique 6. Inhibition de la croissance de l'orge – Sol 3

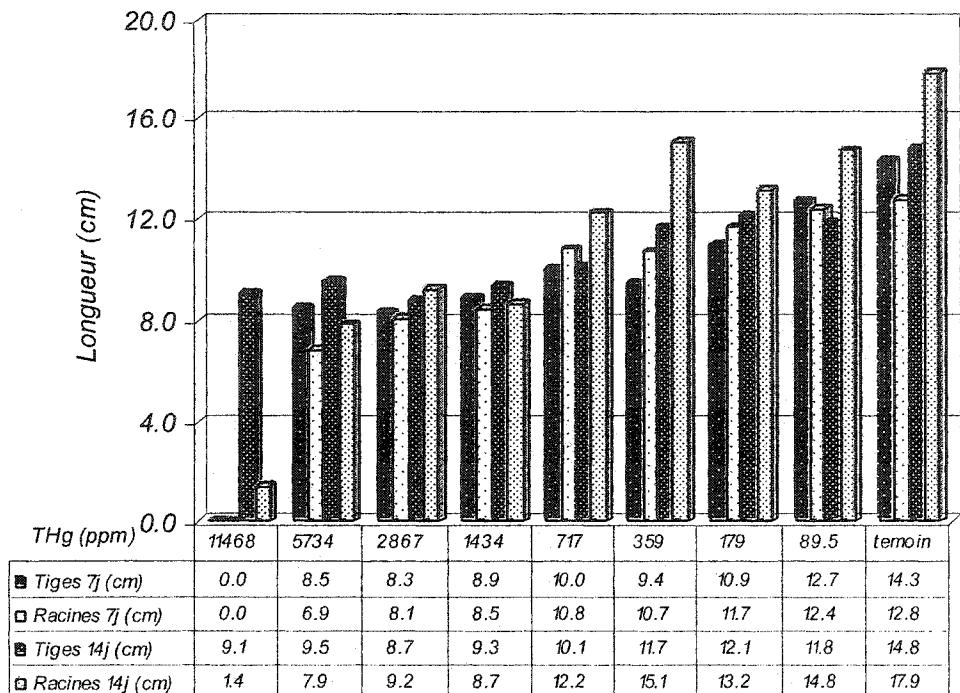


Tableau 5. Sol 3 (t-student)

THg (mg/kg)	11500	5734	2867	1434	717	359	179	89,5
Tiges 7j	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,003	0,011
Racines 7j	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,001	0,024	0,200
Tiges 14j	0,000	0,002	0,000	0,000	0,006	0,016	0,056	0,074
Racines 14j	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,044	0,012	0,068

Tableau 6. Sol 3 (% inhibition)

THg (mg/kg)	11500	5734	2867	1434	717	359	179	89,5
Tiges 7j	100	41,0	42,0	38,1	30,1	34,4	23,7	11,3
Racines 7j	100	46,3	37,0	33,7	15,5	16,1	8,7	3,3
Tiges 14j	38,8	35,8	41,1	37,0	32,0	21,2	18,3	20,1
Racines 14j	92,2	56,0	48,4	51,4	31,4	15,6	26,3	17,3

Graphique 7. Effets toxiques sur l'orge

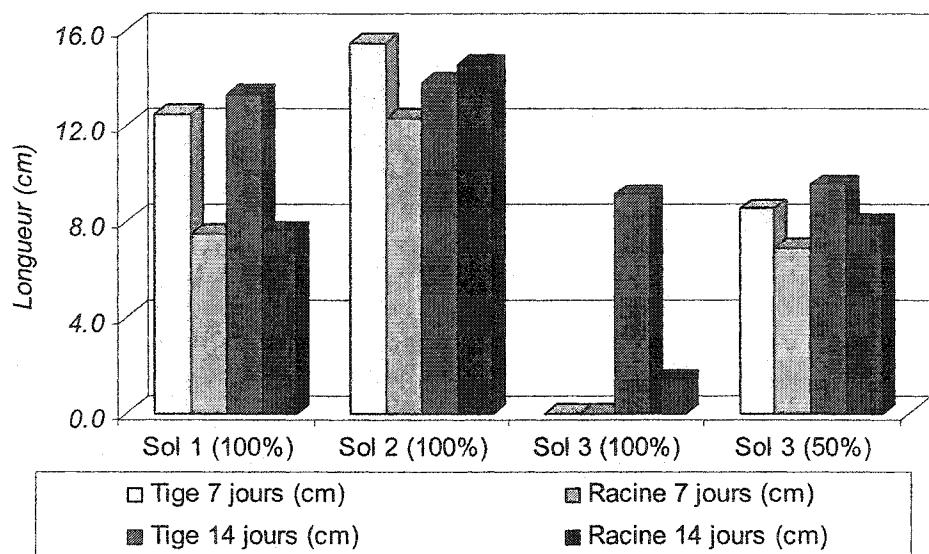


Tableau 7. Sol 1, Sol 2, Sol 3 (% Inhibition)

	Sol 1 (100%)	Sol 2 (100%)	Sol 3 (100%)	Sol 3 (50%)	Sol 3 (25%)	Sol 3 (12,5%)	Sol 3 (6,25%)	Sol 3 (3,13%)	Sol 3 (1,56%)	Sol 3 (0,78%)
THg (mg/kg)	568	295	11500	5734	2867	1434	717	359	179	89
Tiges 7j	23,6	4,92	100	41,0	42,0	38,1	30,1	34,4	23,7	11,3
Racines 7j	45,3	17,3	100	46,4	37,0	33,7	15,5	16,1	8,72	3,26
Tiges 14j	20,2	15,2	38,8	35,8	41,1	37,0	32,0	21,2	18,3	20,1
Racines14j	63,7	31,0	92,2	56,0	48,4	51,4	31,4	15,6	26,3	17,3

Graphique 8. Concentrations du Hg dans les tissus de l'orge

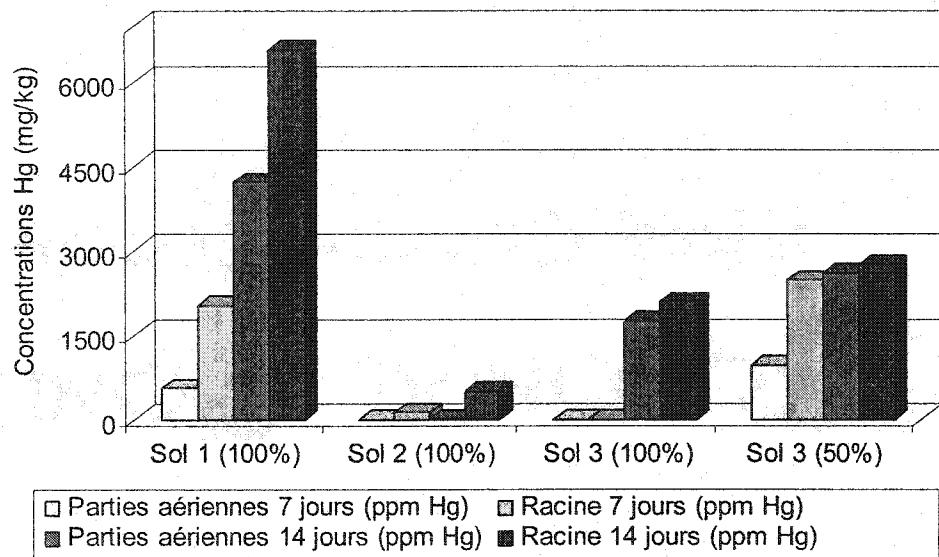


Tableau 8. Concentrations du Hg dans les tissus de l'orge

	Sol 1 (100%)	Sol 2 (100%)	Sol 3 (100%)	Sol 3 (50%)
Parties aériennes 7j (mg/kg)	558±453	6,90±3,98	0,00	955±31,1
Racines 7j (mg/kg)	2020±870	134±36,3	0,00	2469±564
Parties aériennes 14j (mg/kg)	4205±1066	20,6±17,4	1747±168	2594±427
Racines 14j (mg/kg)	6559±237	510±298	2085±321	2726±248

Graphique 9. Concentrations du Hg dans les tissus de ver de terre

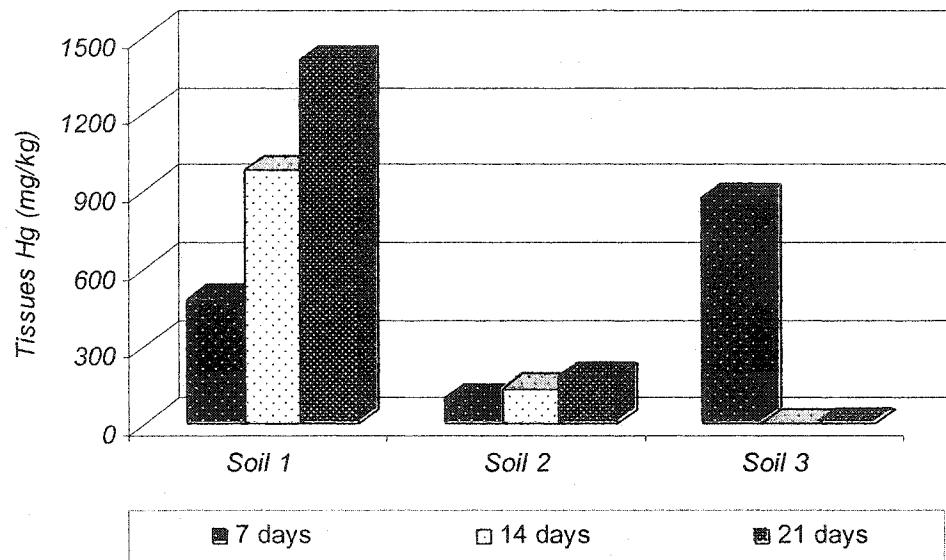


Tableau 9. Concentrations du Hg dans les tissus du ver de terre

	Sol 1 (100%)	Sol 2 (100%)	Sol 3 (100%)
7j (mg/kg)	480±36.0	94.7±8.55	870
14j (mg/kg)	979±56.4	139±36.8	-
21j (mg/kg)	$1.41 \times 10^3 \pm 116$	178±33.3	-

Graphique 9. BCF orge – Sol 1, Sol 2, Sol 3

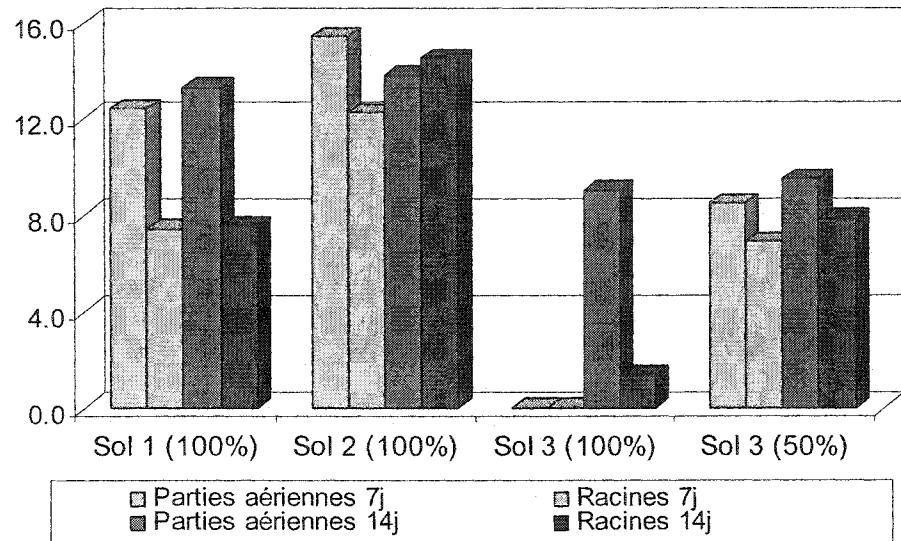
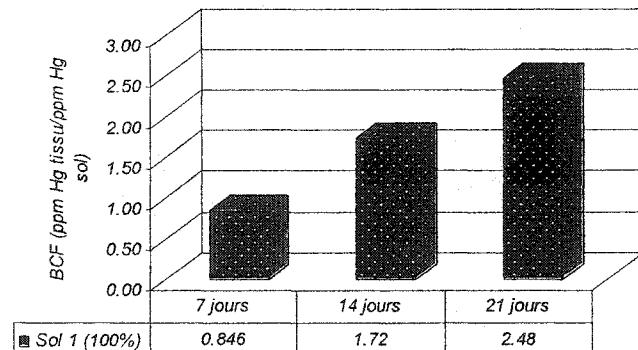


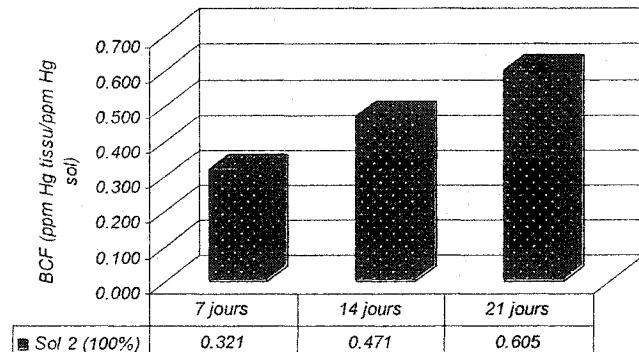
Tableau 9. BCF orge

	Sol 1 (100%)	Sol 2 (100%)	Sol 3 (100%)	Sol 3 (50%)
Parties aériennes 7j	$0,983 \pm 0,799$	$0,023 \pm 0,013$	0,00	$0,166 \pm 0,005$
Racines 7j	$3,56 \pm 1,53$	$0,452 \pm 0,123$	0,00	$0,431 \pm 0,098$
Parties aériennes 14j	$7,41 \pm 1,88$	$0,070 \pm 0,059$	$0,152 \pm 0,015$	$0,452 \pm 0,075$
Racines 14j	$11,6 \pm 0,418$	$1,73 \pm 1,01$	$0,182 \pm 0,028$	$0,475 \pm 0,043$

Graphique 10. BCF ver de terre - Sol 1



Graphique 11. BCF ver de terre - Sol 2



Graphique 12. BCF ver de terre - Sol 3

