



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Ecole Doctorale Ressources, Procédés, Produits et Environnement
Laboratoire des Interactions Microorganismes Minéraux Matière Organique dans les Sols
Université de Lorraine-CNRS UMR 7137
Laboratoire Sols et Environnement, Université de Lorraine-INRA UMR 1120

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Lorraine
Spécialité : Sciences Agronomiques

Par

Fabien LAURENT

Impact de l'oxydation chimique et de la refonctionnalisation sur des paramètres physico-chimiques et biologiques de terres contaminées aux HAP

Soutenue le 12 Mars 2012

Corinne LEYVAL , Directrice de Recherche, CNRS (UMR LIMOS),	Co-Directrice
Christophe SCHWARTZ , Professeur, Université de Lorraine (UMR LSE),	Co-Directeur
Cécile DELOLME , Ingénieur Divisionnaire, ENTPE (UMR LEHNA),	Rapporteur
Sabine HOUOT , Directrice de Recherche, INRA (UMR EGC),	Rapporteur
Jean Louis MOREL , Professeur, Université de Lorraine (UMR LSE),	Examineur
Christian MOUGIN , Directeur de Recherche, INRA (UMR PESSAC),	Examineur
Jean Charles MUNCH , Professeur, Helmholtz Zentrum München,	Examineur

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire des Interactions Microorganismes, Minéraux et Matière Organique dans les Sols (LIMOS) et au sein du Laboratoire Sols et Environnement (LSE). Ce travail a été financé par la région Lorraine et l'Agence Nationale pour la Recherche.

En premier lieu, je tiens à remercier mes deux encadrants, Corinne LEYVAL et Christophe SCHWARTZ, de m'avoir retenu pour un tel projet. Tout n'a pas été simple pendant ces 3 ans, mais leur confiance et leur soutien de tous les instants ont permis de surmonter les problèmes et faire ressortir le meilleur.

Je remercie Cécile DELOLME, Sabine HOUOT, Christian MOUGIN, Jean Charle MUNCH, d'avoir accepté d'être membre du jury. Les remarques et les discussions ayant suivies la soutenance ont été très enrichissantes et ont permis de montrer à quel point ce travail est exploratoire. Un remerciement particulier pour Jean Louis MOREL qui a accepté de présider la soutenance et qui a eu l'occasion de suivre ce travail pendant ces trois années.

Mes prochains remerciements vont à l'ensemble du personnel du LIMOS et du LSE, pour leur accueil, leur disponibilité et les multiples échanges que nous avons pu avoir. Je tiens à souligner le réel plaisir que j'ai eu à travailler avec eux dans la joie et la bonne humeur.

Il est toujours agréable (ou désagréable) de partager ses angoisses, ses problèmes d'expérimentation, d'analyse ou tout simplement les moments du quotidien. En cela, je tiens à remercier :

- Mes « OXY SOL partner's » : Lucas CHARROIS (« riz man »), Cindy MESSANA, Remy BALDO (« le tamiseur de SPP »), un grand nombre d'échantillons est passé entre leurs mains. Le carottage des lysimètres n'a plus de secret pour eux. Merci à Sophie GUIMONT, cela aura été un véritable plaisir de travailler avec toi. Ton engagement de tout les instants a été très appréciable ! Merci à Noele RAOULT. Merci de m'avoir intégré dans cette plateforme GISFI, lieu d'échanges scientifiques privilégié. J'ai également une pensée particulière pour Julien LEMAIRE et notre folle expérimentation de novembre 2009. Mes remerciements vont également à son encadrante, Marie Odile SIMMONOT.

- Mes collègues « Week end dans les Vosges » : Jean Marc (« zouk man 1), Cédric (« zouk man 2 »), Sophie (vive l'Alsace !), Hermine (“Abdul’s wife”), Sarah (“les briques c’est sa grande passion !”), Audrey (« ici la passion ce sont les chapeaux bizarres »), Frederic (« Childos »).
- Titi (visca el Tour de França) ! tes conseils, ta bonne humeur, ta gentillesse....tu es toujours là quand il faut !
- Mes collègues du Phi : Jess (ma « clasheuse » préférée !), la pépette (Cécile lauper !), Fab (ah les bonnes petites scéances de côtes !), Dams (bakayaro san !!), ma vieille bique Olive !, Norbert (« the king »), Marie (« coco-girl »), Olivia (vive les bouclettes !), Tom (vive la bricole !).
- Mes supers collègues de bureau : c’est plus que des remerciements pour Benjamin (le frère) et Lucette (la jumelle) qui ont subi de plein fouet mon esprit râleur !

Je n’ai aucun doute sur le fait que ces rencontres ne sont que le début de superbes aventures à venir !

Mes dernières pensées vont à ma famille, sans qui tout cela n’aurait pu avoir lieu. Merci de m’avoir permis d’aller si loin et de m’avoir fait confiance et soutenu des années durant !

Cette dernière ligne pour celle qui m’apporte plus que tout au monde...Emma..mon pilier...merci pour tout !

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	3
SOMMAIRE	5
INTRODUCTION	10
CHAPITRE 1 – Synthèse bibliographique	14
1. Anthropisation et contamination des sols.....	14
1.1 L’anthropisation des sols.....	14
1.2 La contamination des sols	15
1.3 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques	16
2. Le traitement de la pollution	20
2.1 Les techniques de dépollution	20
2.2 L’oxydation chimique	23
3. De l’évaluation des fonctions du sol aux stratégies de réhabilitation	27
3.1 Qualité et fonctions des sols.....	27
3.2 Perturbation, résilience et résistance des fonctions du sol	30
3.3 Impact des procédés d’oxydation chimique sur les caractéristiques des sols	31
3.4 Stratégie de réhabilitation.....	35
4. Objectifs de la thèse.....	38
CHAPITRE 2 – Matériels et Méthodes.....	40
1. Matériels.....	40
1.1 Les terres	40
1.2 Les matériaux d’amendement	42
1.3 Les dispositifs expérimentaux.....	44
2. Méthodes.....	46
2.1 Contamination de la terre <i>Ch</i> par du phénanthrène et du pyrène	46
2.2 Protocole d’oxydation des terres contaminées	47
2.3 Analyses physico-chimiques	47

2.4	Analyses biologiques et microbiologiques.....	51
2.5	Analyses statistiques	60
2.6	Proposition d'un indice de qualité.....	60

CHAPITRE 3 – L'oxydation par la réaction de Fenton en conditions insaturées affecte les propriétés physico-chimiques et biologiques d'une terre contaminée par des HAP .. 64

1.	Introduction	64
2.	Matériel et méthodes	65
2.1	Protocole d'oxydation chimique	65
2.2	Echantillonnage et analyse	65
3.	Résultats	66
3.1	Teneurs en polluants et paramètres physico-chimiques	66
3.2	Paramètres biologiques	67
4.	Discussion	70
4.1	Evolution de la teneur en HAP dans la terre oxydée par réaction de Fenton.....	70
4.2	Impact de la réaction de Fenton sur les paramètres physico-chimiques et sur la croissance des plantes	71
4.3	Evolution de la densité et de l'activité microbienne dans la terre oxydée par la réaction de Fenton.....	72
5.	Conclusion	73

CHAPITRE 4 –Impact de deux oxydants sur les caractéristiques physico-chimiques et biologiques de trois terres contaminées en colonnes insaturées..... 74

1.	Introduction	74
2.	Matériels et méthodes.....	75
2.1	Choix des terres.....	75
2.2	Protocole d'oxydation chimique	76
2.3	Echantillonnages et analyses	77
3.	Résultats	78
3.1	Teneur en HAP.....	78
3.2	Caractéristiques physico-chimiques des trois terres après traitements	79
3.3	Quantification des bactéries cultivables et des activités de types hydrolases dans les trois terres après traitement	82

3.4	Caractérisation des percolats après traitement	83
4.	Discussion	87
4.1	Evolution des paramètres physico-chimiques	87
4.2	Impact de l'oxydation sur les fonctions biologiques.....	90
4.3	Evolution de la teneur en HAP dans les terres oxydées en conditions insaturées.....	91
5.	Conclusion	92

CHAPITRE 5 – Etude en vases de végétation de la refonctionnalisation par des amendements de deux terres oxydées..... 94

1.	Introduction	94
2.	Matériel et méthodes	95
2.1	Préparation des terres	95
2.2	Protocole d'oxydation chimique	95
2.3	Protocole de refonctionnalisation.....	96
2.4	Plan expérimental et analyses	97
3.	Résultats	99
3.1	Teneurs en HAP	99
3.2	Biomasse racinaire et foliaire	100
3.3	Paramètres biologiques	101
3.4	Paramètres physico-chimiques.....	109
4.	Discussion	114
4.1	Impact de l'oxydation et des amendements sur la dynamique des HAP	114
4.2	Impact de l'oxydation et des amendements sur les paramètres physico- chimiques	115
4.3	Dynamique des paramètres biologiques dans les sols après oxydation et amendements.....	118
5.	Conclusion	123

CHAPITRE 6 – Etude en lysimètres de l'impact de l'oxydation chimique et de la refonctionnalisation sur une terre de friches industrielles..... 124

1.	Introduction	124
2.	Matériel et méthodes	125
2.1	Site et dispositif.....	125

2.2	Protocole d'oxydation chimique	125
2.3	Protocole de refonctionnalisation des terres traitées	127
2.4	Prélèvements, échantillonnages et analyses	130
3.	Résultats	131
3.1	Impact de l'oxydation in situ sur les paramètres de la terre	131
3.2	Impact de la refonctionnalisation	150
3.3	Suivi des éléments majeurs et traces dans les eaux de percolations	157
4.	Conclusion	164
DISCUSSION GENERALE		166
1.	Introduction	166
2.	Synthèse des résultats	167
2.1	De l'impact de l'oxydation sur les caractéristiques et les fonctions des sols... ..	169
2.2	De la nécessité de la refonctionnalisation	174
3.	Limites et perspectives	176
3.1	Limites expérimentales et analytiques	176
3.2	Perspectives	177
CONCLUSION GENERALE		180
BIBLIOGRAPHIE		182
ANNEXES.....		194
Liste des figures		194
Liste des tableaux		204

INTRODUCTION

Le sol est l'épiderme vivant de la terre et représente une ressource fondamentale, non renouvelable, remplissant à la fois des fonctions physiques, chimiques et écologiques. Ce milieu se situe à la fois aux interfaces biologiques et géochimiques, et l'équilibre fragile qui le caractérise permet de maintenir le fonctionnement des écosystèmes. L'importance portée au sol a longtemps résidé dans le fait qu'il représente avant tout le support des activités agricoles. Cependant, notre environnement subissant des transformations de plus en plus rapides, les raisons de se préoccuper de l'état des sols ont évolué et se sont diversifiées. En effet, si le sol est avant tout considéré comme un réservoir d'éléments nutritifs nécessaire au développement de la vie, ses fonctions d'accumulation et d'épuration ne sont pas négligeables. Le sol recycle ainsi les différentes substances organiques et minérales issues des déchets produits par les activités humaines. Le sol a largement été dégradé au cours du dernier siècle, suite au développement intense des activités anthropiques et particulièrement industrielles. De ce fait, un grand nombre de sites industriels ont été recensés et classés dans les sites pollués suite au rejet de divers déchets issus des industries. Parmi ces pollutions issues des activités industrielles, celle aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), présents à de fortes concentrations sur les anciens sites métallurgiques, représente une menace à la fois pour les sols et pour la santé humaine. En effet, ces polluants s'accumulent fortement dans les sols et les organismes, et leurs propriétés cancérigènes et reprotoxiques peuvent entraîner de réels problèmes environnementaux. Diverses solutions de remédiation ont été développées et sont utilisées pour gérer et maîtriser ces pollutions, cependant, l'impact de ces techniques sur les paramètres biologiques et physico-chimiques du sol n'est que rarement pris en compte.

Ce travail de thèse s'intègre dans un projet porté par le GISFI (Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles), financé par le programme PRECodd¹ de l'Agence Nationale de la Recherche, intitulé « OXYSOL ». Ce projet avait pour objectif de construire une filière de traitement *in situ* des sols contaminés prenant en compte l'impact du traitement sur les fonctions du sol, et la restauration de ces fonctions. Ce projet se base sur l'utilisation de l'oxydation chimique en vue de traiter des sols contaminés par des HAP. Si cette technique de remédiation est en plein essor, très peu d'études ont été réalisées sur l'impact que peut

¹ Programme de Recherche sur les Ecotechnologies et le Développement Durable

avoir un tel traitement sur les fonctions du sol (support de végétation, de diversité, réserve en nutriments). Ce projet avait pour objectif d'évaluer cet impact et de restaurer les fonctions impactées par un procédé de refonctionnalisation.

Dans le cadre de ce projet, tandis que la thèse de Lemaire (2011) était dédiée à l'étude du procédé d'oxydation, ce travail de thèse avait pour objectif d'identifier et d'étudier différents paramètres affiliés aux différentes fonctions du sol et d'observer leurs évolutions après un traitement par oxydation chimique. En fonction des différents impacts mesurés après oxydation, différents procédés de refonctionnalisation ont été proposés afin de restaurer le fonctionnement du sol. Pour aborder ces différentes parties, plusieurs dispositifs allant du laboratoire au terrain ont été utilisés. La thèse a été réalisée dans deux laboratoires aux compétences complémentaires, le Laboratoire Sol et Environnement (LSE-INRA Nancy Université), et le Laboratoire des Interactions Microorganismes Minéraux Matière Organique dans les Sols (LIMOS, Nancy Université), sous la co-direction de C.Schwartz et C.Leyval, et en collaboration avec les autres partenaires du projet Oxysol (Valtera, LRGP, G2R, GISFI).

Ce manuscrit est découpé en plusieurs chapitres :

- Le **premier chapitre** est consacré aux acquis scientifiques sur les différents sujets abordés dans ce travail, que sont : i) la pollution aux HAP, ii) l'oxydation chimique et iii) l'impact de ces traitements sur le fonctionnement du sol.
- Le **deuxième chapitre** expose les différents matériels et méthodes utilisés dans les expériences réalisées. Cependant, les différents plans expérimentaux utilisés sont précisés en début de chaque chapitre expérimental et ne sont donc pas décrits dans ce chapitre.
- Le **troisième chapitre** présente des résultats obtenus en batch sur l'impact de l'oxydation chimique via la réaction de Fenton sur les paramètres physico-chimiques et biologiques d'un sol contaminé. Ce chapitre a fait l'objet d'une publication parue dans Chemosphere.
- Le **quatrième chapitre** expose les résultats acquis en colonnes de laboratoire sur l'impact de deux oxydants, les réactifs de Fenton et le persulfate activé, sur les paramètres physico-chimiques et biologiques de trois terres présentant des caractéristiques physico-chimiques différentes. Ce chapitre renseigne également sur le transfert des éléments majeurs ou traces dans la solution du sol pouvant survenir suite à l'oxydation.

- Le **cinquième chapitre** présente les résultats d'une expérimentation en vases de végétation qui visait à étudier la restauration des conditions physico-chimiques et du fonctionnement biologique de deux terres, impactées par l'oxydation par Fenton, par l'apport de matériaux technogéniques et d'une végétation.
- Dans le **sixième chapitre** expérimental, l'impact de l'oxydation et la refonctionnalisation d'une terre contaminée ont été étudiés *in situ*, à l'échelle du lysimètre, et suivis au cours des 13 mois suivants le traitement par oxydation. Les mêmes paramètres physicochimiques et biologiques des terres mesurés dans les différents chapitres ont été suivis.
- Enfin le **dernier chapitre** présente la synthèse et discute des différents résultats obtenus, en proposant des indices de fonctionnement des sols basés sur les paramètres impactés par l'oxydation, et présente des perspectives à ce travail en vue de clarifier l'impact que peut avoir l'oxydation chimique sur les fonctions du sol et dans quelles mesures des procédés de refonctionnalisation peuvent être utilisés.

CHAPITRE 1 – Synthèse bibliographique

La thèse fait appel à de nombreuses notions, à la fois contextuelles, chimiques, biologiques et agronomiques. Le sujet de thèse traitant à la fois des pollutions et des techniques de dépollution et de leurs effets respectifs sur le fonctionnement du sol, la synthèse est découpée en trois parties. Premièrement, ce chapitre est introduit par une partie dédiée aux pollutions industrielles, notamment celles induites par la présence d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Par la suite, les différentes techniques de dépollution pouvant être mises en œuvre sont présentées et plus particulièrement les procédés de traitement par oxydation chimique. La troisième partie introduira les notions de qualité des sols et de mesure d'impact, afin de synthétiser les acquis de la littérature concernant l'impact de l'oxydation chimique. Cette synthèse permettra par la suite de discuter des différentes techniques de réhabilitation couramment utilisées pour restaurer ou améliorer les fonctions primaires du sol (support de végétation, de biodiversité). Pour conclure, les différentes questions qui peuvent se poser au vu des lacunes de la littérature sur ce sujet seront abordées.

1. Anthropisation et contamination des sols

1.1 L'anthropisation des sols

Le terme général d'anthropisation implique la transformation d'un paysage ou d'un milieu naturel sous l'action de l'Homme. Dans ce cadre, les sols dit « anthropisés » sont définis comme des surfaces ayant été modifiées par l'action humaine. Ces surfaces incluent entre autres, les réseaux routiers, les zones industrielles et commerciales, les mines et les zones urbaines et agricoles. Ces sols sont inclus depuis une vingtaine d'années dans la classe des Anthroposols dans le Référentiel Pédologique Français (Baize et Girard, 2008) et depuis 5 ans dans la World Reference Base for Soil Resources (WRB) dans la classe des Technosols (Lehmann, 2006). S'il existe plusieurs sous classes d'anthroposols, les principaux processus « anthropo-pédogénétiques » qui les caractérisent sont d'après Baize et Girard (2008) :

- le travail profond (labour supérieur à 40 cm de profondeur)
- la surfertilisation (*e.g.* lisiers, compost, engrais)
- l'irrigation répétée avec des eaux contenant des quantités non négligeables de sédiments

- la troncature de la partie supérieure du solum
- le compactage par le trafic ou la construction de bâtiments
- la « fermeture » des surfaces par des revêtements (imperméabilisation)
- le dépôt de matériaux pédologiques ou géologiques et de sous-produits
- la pollution par des métaux ou des molécules organiques

La France connaît un accroissement conséquent de ces surfaces artificialisées (EEA, 2002), qui occupaient en 2006 un peu plus de 5% du territoire (Pageau et Carré, 2009). Le suivi de l'occupation des sols entre 2000 et 2006 indique que les espaces artificialisés présentent un accroissement de 3% (+136 km²/an) aux dépens des terres agricoles et espaces verts. Cet accroissement est, en partie, dû à l'expansion du tissu urbain (+58 km²/an) mais aussi des zones industrielles (+38km²/an) (Pageau et Carré, 2009). Parmi les paramètres de l'anthropisation, la contamination par des polluants minéraux ou organiques apparaît comme un facteur aggravant majeur. Les sites ayant connu une activité industrielle représentent des cas extrêmes de dégradation des sols, car ces sites, outre la perturbation physique induite par l'implantation des installations, présentent de fortes pollutions persistantes issues des procédés industriels.

1.2 La contamination des sols

La contamination des sols résulte de l'incorporation dans le sol de différents composés (organiques et métalliques) considérés comme polluants et issus des activités humaines (agricoles, urbaines, industrielles). La France recense, en 2011, selon la base de données BASOL, 4456 sites ou sols potentiellement pollués par divers contaminants (organiques ou métalliques) dont 380 se situent en Région Lorraine. Ces sites industriels, plus ou moins contaminés, représentent des espaces non négligeables et problématiques tant en termes d'impact environnemental qu'en santé humaine. La prise de conscience, en termes de vigilance, de la pollution industrielle des sols est récente. Des lois, comme celle du 13 juillet 1992 relative à l'élimination des déchets ainsi qu'aux installations classées pour la protection de l'environnement, ou la loi «BARNIER» de 1995 (Loi n° 95-101) reprenant le principe pollueur-payeur adopté par l'OCDE en 1972 ont ainsi permis d'avancer dans la gestion des pollutions en France. Des taxes sur les déchets industriels spéciaux permettent de financer la dépollution des sites "orphelins" dont les propriétaires ne sont pas solvables (ADEME, 2006). Le programme des Nations Unies pour l'Environnement assurant la promotion des technologies propres, du management environnemental et de la réduction des risques

industriels, préconise une dynamique de préservation et de gestion des sols. Parmi les contaminants présents sur ces sites, les HAP sont au cœur des préoccupations de par leurs propriétés cancérigènes (INERIS, 2003) et leur présence sur de nombreux sites pollués (103 sites en Lorraine, BASOL 2011).

1.3 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques

1.3.1 Caractéristiques principales

Les HAP représentent une forte proportion des produits formés à la suite d'une combustion incomplète de composés contenant du carbone et de l'hydrogène. La combustion des énergies fossiles constitue aujourd'hui la source principale de formation de ces composés. Ces molécules, organiques, formées de cycles benzéniques ont été classées comme polluants par l'Environmental Protection Agency (INERIS, 2005) et 16 de ces composés font partie de la catégorie « polluants prioritaires » (Figure 1).

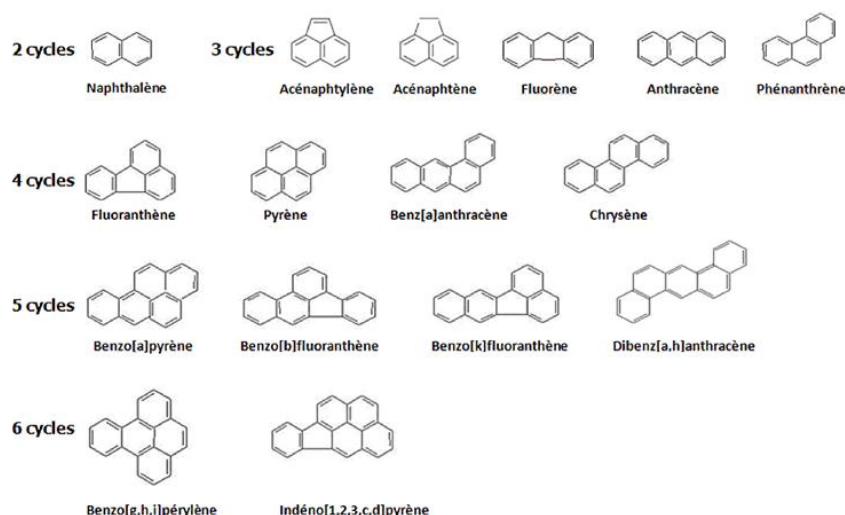


Figure 1 : Structure des 16 HAP classés comme polluants prioritaires par l'EPA (Environmental Protection Agency)

Les HAP sont classés en deux catégories basées sur le nombre de cycles. On caractérise ainsi les HAP de faibles poids moléculaires (2 à 4 cycles) et les HAP de haut poids moléculaire (5 cycles et plus) (CCME, 2008). Excepté pour les composés les plus légers (2 et 3 noyaux), la solubilité et la volatilité des HAP sont très faibles, impliquant leur forte tendance à persister dans les sols et les eaux par adsorption sur des molécules hydrophobes telles que les molécules organiques (Chen et al., 2007). En effet, pour la plupart des HAP, le coefficient de partage octanol/eau (logKow) est supérieur à 3, traduisant un caractère très lipophile et une forte capacité à être bio-accumulés dans les organismes vivants. Ceci implique des risques de

bio-concentration tout au long de la chaîne alimentaire. De manière générale, la sorption des polluants sur la phase solide hydrophobe a pour effet de diminuer leur biodisponibilité et ainsi de ralentir leur biodégradation. Il est admis que la biodégradabilité des HAP est inversement proportionnelle au nombre de cycles (Johnsen et al., 2005). Ceci est directement relié à leurs propriétés physico-chimiques et notamment à la solubilité et à la volatilité qui diminuent avec l'augmentation du nombre de cycles.

1.3.2 Origines des HAP dans les sols de friches industrielles

Les sources de HAP dans l'environnement peuvent être naturelles ou anthropiques. Les sources naturelles sont multiples, avec entre autres, les feux de forêt, les éruptions volcaniques ou encore des processus géologiques associés à la formation de combustibles fossiles. Cependant, les principales sources de HAP sont anthropiques et essentiellement en lien avec les procédés de combustion ou de pyrolyse de combustibles d'origine fossile comme le charbon ou le pétrole. Il faut également citer l'utilisation de ces combustibles pour différents usages (*e.g.* traitement du bois à l'aide de créosote (Achten et Hofmann, 2009) ; activités quotidiennes de chauffage au fuel ou émission de gaz d'échappement (Monsérié, 2009). Wilcke (2000) a estimé à $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ la concentration en HAP dans les sols issus des processus naturels. Dans leurs travaux, (Jones et al., 1989) estiment quant à eux, qu'un sol non contaminé présente des teneurs en HAP de l'ordre de 0,1 à 55 mg.kg^{-1} . Dans les sols contaminés, les teneurs sont régulièrement supérieures à 500 mg.kg^{-1} en fonction du type d'industrie ayant eu une activité sur le site (Juhasz et Naidu, 2000).

Ce travail de thèse porte sur ces sols fortement pollués et plus particulièrement sur des sols issus de friches industrielles ayant accueilli des activités en lien avec la fabrication de l'acier. Les différentes étapes d'extraction ou de préparation du minerai de fer utilisent en effet des procédés de pyrolyse et de combustion. La pyrolyse utilisée, par exemple pour la transformation de la houille en coke ou en gaz de ville à des fins énergétiques, génère des dépôts atmosphériques et un sous-produit, le goudron de houille, présentant des teneurs massiques en HAP relativement variables (2 à 35%) (Lee et al., 1992). Le dépôt de ces résidus sur les sites d'exploitation a contribué à la contamination des sols. Les différentes étapes de fabrication de l'acier génèrent différents déchets organiques et minéraux, contenant à la fois des HAP et des oxydes métalliques, issus de l'utilisation de ferro-alliages (Monsérié, 2009). Les sols de ces friches industrielles présentent alors souvent une multi-contamination, à la fois en polluants organiques et métalliques.

1.3.3 Exposition et risque sanitaire

Les HAP peuvent pénétrer dans le corps humain par inhalation, contact cutané ou ingestion, ces deux dernières voies d'exposition étant directement en lien avec les sols. Même s'il semble que l'accumulation de HAP dans certaines plantes ou légumes terrestres (Menzie et al., 1992) résulte majoritairement du contact avec des dépôts atmosphériques contaminés, le passage des HAP dans la plante par transfert racinaire n'est pas nul (Fismes et al., 2004, Kipopoulou et al., 1999). En milieu aquatique, la bioconcentration de ces polluants est aussi démontrée (Pavoni et al., 2003). Des concentrations en HAP supérieures à $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ont été retrouvées dans des algues utilisées à des fins alimentaires ou cosmétiques (Pavoni et al., 2003). Le risque d'excès unitaire pour le benzo[a]pyrène, par exemple, est de 5 ng.kg^{-1} de poids corporel. j^{-1} (INERIS, 2003). Ces valeurs ne peuvent toutefois être reliées à un risque donné, car le danger majeur causé par le contact avec les HAP est relié à une toxicité chronique (INERIS, 2003). Cette toxicité est en particulier due à la métabolisation des HAP par les organismes, transformant les molécules en composés plus polaires et également plus réactifs, pouvant causer des adduits à l'ADN et ainsi engendrer des processus cancérogènes (INERIS, 2003). Ces implications potentielles pour la santé humaine posent alors la question de l'accumulation de tels composés persistants dans les sols de même que leurs effets globaux sur l'environnement.

1.3.4 Devenir des HAP dans les sols

Si les HAP peuvent être volatilisés (pour les HAP les plus légers comme le naphthalène) ou photo-oxydés, la persistance et le devenir des HAP dans les sols sont particulièrement liés à leur capacité de sorption vis-à-vis de la matrice du sol et à leur biodégradation potentielle par certains microorganismes (Johnsen et al., 2005).

1.3.4.1 *Une capacité de sorption*

La biodisponibilité est directement liée à la sorption des HAP, le lien entre ces deux notions étant largement décrit dans la littérature (Chiou et al., 1998 ; Hatzinger et Alexander, 1995; Weissenfels et Langhoff, 1992) . Il est régi par des mécanismes complexes qui évoluent avec le temps. Or, si les HAP persistent dans les sols sous forme de résidus liés à la phase solide, ils sont difficilement accessibles aux microorganismes pour être dégradés et constituent un risque de pollution à long terme. La faible accessibilité des polluants et leur protection par la matrice solide du sol sont des mécanismes aujourd'hui invoqués pour expliquer la persistance de ces polluants organiques dans les sols (Hatzinger et Alexander, 1995). Différentes études

expliquent que la séquestration du polluant commence par des interactions avec les colloïdes du sol, plus particulièrement avec les régions hydrophobes de la matière organique avec lesquelles ils peuvent former des liaisons plus au moins stables (Hatzinger et Alexander, 1995 ; Ncibi et al., 2007). Au cours du temps, la molécule peut diffuser dans les microaggrégats et devenir partiellement inaccessible, c'est la séquestration (Barnier, 2009 ; Vessigaud, 2007) (Figure 2). Ce phénomène est communément appelé le vieillissement de la pollution. Ainsi, les résultats de biodégradation obtenus sur des échantillons de terre artificiellement et récemment contaminés par des HAP ne sont, par exemple, pas comparables aux résultats obtenus sur un sol de friche industrielle pollué depuis plusieurs décennies.

1.3.4.2 *Dégradation des HAP dans les sols*

Comme évoqué précédemment, des processus abiotiques tels que la volatilisation ou la photo-oxydation peuvent intervenir dans la dégradation des HAP (Douben, 2003). Cependant, elle peut aussi être réalisée de manière biotique par les microorganismes présents dans le sol. Les HAP sont dégradés soit directement en servant de source de carbone, soit indirectement par co-métabolisme. La biodégradation transforme un composé métabolisable en un composé plus simple, qui peut être plus ou moins toxique que le composé d'origine et peut aboutir à la formation finale de dioxyde de carbone (Peng et al., 2008). Les HAP de faibles poids moléculaire peuvent être entièrement biodégradés, contrairement aux HAP de poids moléculaire plus élevé dont la biodégradation est plus difficile (Juhasz et al., 2000). Les mécanismes de biodégradation peuvent être induits à la fois par des bactéries et par des champignons (Cerniglia, 1997 ; Juhasz et al., 2000), dans des conditions aérobies ou anaérobies (Meckenstock et Mouttaki, 2011). La biodégradation est réalisée par des microorganismes possédant des systèmes enzymatiques comme par exemple les dioxygénases, les monooxygénases ou les laccases (Liu et al., 1992). Ces enzymes induisent des réactions oxydatives, qui, par transfert d'électrons vont permettre la fission des différents cycles des HAP (Douben, 2003 ; Peng et al., 2008). Cependant, les processus de biodégradation dépendent fortement de l'accessibilité des polluants et des conditions du milieu (Douben, 2003). Dans certains cas, les plantes peuvent contribuer à dégrader ces polluants en stimulant l'activité biologique aux alentours de la rhizosphère (Binet et al., 2000 ; Corgié et Leyval, 2003 ; Gan et al., 2009) ou en augmentant la disponibilité des polluants (production d'exudats racinaires, de surfactants) (Gao et al., 2010 ; Ouvrard et al., 2006) vis-à-vis des microorganismes.

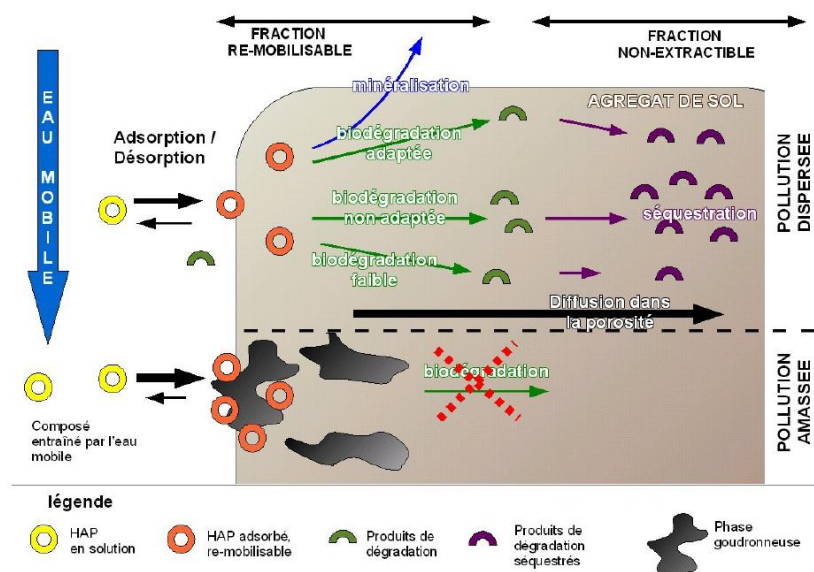


Figure 2 : Schéma synthétisant les processus auxquels sont soumis les HAP dans les matrices polluées, présentant soit une pollution dispersée soit une pollution amassée (Vessigaud, 2007)

2. Le traitement de la pollution

La gestion de ces polluants passe donc par l'utilisation de techniques de dépollution thermiques, chimiques ou biologiques, afin d'atténuer la concentration en polluants via des procédés de destruction ou de biodégradation. Ces différentes techniques présentent toutes des avantages et des inconvénients et sont plus ou moins applicables dans certaines situations. Cependant, parmi ces techniques, certaines sont en plein développement, c'est le cas de l'oxydation chimique.

2.1 Les techniques de dépollution

La décontamination des sols consiste principalement à atténuer la concentration en polluants au niveau d'un seuil ne représentant ni un risque pour la santé humaine ni un danger environnemental. Les techniques de traitement utilisent des méthodes physiques, chimiques et/ou biologiques (Gan et al., 2009) visant à concentrer, transformer voire éliminer les contaminants. L'application de ces techniques dépend principalement du type de pollution (organique et/ou minérale) et des caractéristiques du polluant (accessibilité, biodégradabilité, persistance). Le choix du procédé de traitement dépend aussi des paramètres intrinsèques des techniques (*e.g.* spécificités de mise en œuvre, coût, rendement de dépollution) et des contraintes spécifiques au site à traiter (Colombano et al., 2010).

Il existe plusieurs types de techniques de dépollution pouvant être classées en fonction de leurs mises en œuvres (Colombano et al., 2010) :

- **le traitement hors site** (*ex situ*) consiste à excaver ou à extraire le milieu pollué (déchet, sol, eau) et à l'évacuer vers un centre de traitement adapté
- **le traitement sur site** (*on site*) consiste à excaver puis à traiter sur site, le milieu pollué.
- **le traitement en place** (*in situ*) consiste à dégrader, fixer ou extraire le polluant du milieu sans excavation
- **le confinement** (*in situ*) consiste à empêcher ou à limiter la migration des polluants.

Il faut souligner que la législation de chaque pays fixe les seuils d'acceptabilité et les valeurs limites des concentrations des différents polluants dans les sols. En France, aucune norme n'existe actuellement pour définir le seuil de contamination des HAP. Pour le traitement des polluants organiques, il existe différentes techniques physiques, biologiques, chimiques et thermiques dont l'applicabilité est fonction du type de polluants (Tableau 1). Les principaux procédés utilisés dans le traitement des HAP regroupent les traitements biologiques et les traitements thermiques.

Les traitements biologiques (*ex ou in situ*) se basent sur la biodégradation des polluants et utilisent le potentiel de minéralisation des HAP par les microorganismes. L'inoculation de microorganismes spécifiques ou l'apport de nutriments à des fins de stimulation permettent d'augmenter les rendements de dégradation, dans des conditions de température (20°-37°C), de pH (6-8), de perméabilité ($> 10^{-6}$ m/s) contrôlées (Colombano et al., 2010). Les rendements de ces techniques sont très variables, dépendant des conditions du milieu. Si ces techniques peuvent dégrader jusqu'à 90 % d'une pollution organique (COV, pesticides, solvants), dans la plupart des cas elles ne permettent pas d'éliminer la totalité des polluants présents (Colombano et al., 2010 ; Norini, 2007).

La désorption thermique (*ex situ*) consiste à chauffer entre 400 et 600°C les HAP afin de les volatiliser, les gaz et les poussières étant ensuite filtrés. Cependant, cette technique est très énergivore et ne peut donc pas être appliquée sur de grandes surfaces, les coûts engendrés étant alors trop élevés. Si cette technique permet d'éliminer la majeure partie de la pollution (95 à 98%), elle induit de graves altérations des sols de par la perturbation de ses propriétés mécaniques et l'impact écologique et microbiologique provoqué par la chaleur (Colombano et al., 2010).

Les techniques chimiques présentent une alternative aux traitements conventionnellement utilisés pour traiter les HAP (désorption thermique, biodégradation) (Sirguey et al., 2008). Parmi celles-ci, les techniques d'oxydations *in situ* sont largement étudiées. Cependant, elles

sont dans la plupart des cas utilisées dans le traitement des eaux usées, des nappes phréatiques et des zones saturées en eau et pour des polluants autres que les HAP, comme les composés organiques volatils (COV), hydrocarbures halogénés (Huling et Pivetz, 2006). L'intérêt pour l'application de ces techniques d'oxydation chimique à la zone non saturée du sol est cependant grandissant (Huling et Pivetz, 2006).

Ce travail de thèse s'intégrant dans un projet ANR (OXY SOL) visant à étudier l'utilisation *in situ* de l'oxydation chimique sur des sols industriels contaminés par des HAP, cette technique fera l'objet d'une présentation détaillée.

Tableau 1 : Matrice d'applicabilité des techniques de dépollution pour les polluants organiques
(adaptée de Colombano et al., 2010) (+ : envisageable ; - : non envisageable ; S : zone non saturée et sédiments ; W : zone saturée et eaux superficielles)

	Milieu concerné	Lieu	COV	Hydrocarbures halogénés	Hydrocarbures non halogénés	HAP	PCB	Dioxines et furannes	Pesticides et herbicides
Confinement									
Confinement – couverture	S	<i>in situ</i>	+	+	+	+	+	+	+
Confinement hydraulique	W	<i>in situ</i>	+	+	+	+	+	+	+
Confinement vertical	S, W	<i>in situ</i>	+	+	+	+	+	+	+
Excavation et enfouissement	S	<i>ex et in situ</i>	+	+	+	+	+	+	+
Procédés biologiques									
Atténuation naturelle	W	<i>in situ</i>	+	+	+	+	-	-	+
Biotertre	S	<i>ex situ</i>	+	-	+	+	-	-	+
Bioventing	S	<i>in situ</i>	+	+	+	+	-	-	+
Biosparging	S, W	<i>in situ</i>	+	+	+	+	-	-	+
Landfarming	S	<i>ex situ</i>	+	-	+	+	-	-	+
Traitement sous forme de boue	S	<i>ex situ</i>	+	+	+	+	-	-	+
Andain	S	<i>ex situ</i>	+	-	+	+	-	-	+
Procédés chimiques									
Oxydation chimique	S, W	<i>ex et in situ</i>	+	+	+	+	-	-	+
Déshalogénéation chimique	S	<i>ex et in situ</i>	+	+	-	-	+	+	-
Lavage chimique	S	<i>in situ</i>	+	+	+	+	-	-	-
Extraction par solvants	S	<i>ex situ</i>	+	+	+	+	+	+	+
Amendements en surface	S	<i>in situ</i>	-	-	-	-	-	-	-
Procédés physiques									
Extraction multiphase	S, W	<i>in situ</i>	+	+	+	-	-	-	-
Air sparing	W	<i>in situ</i>	+	+	+	-	-	-	-
Venting	S	<i>in situ</i>	+	+	+	-	-	-	-
Barrière perméable réactive	W	<i>in situ</i>	+	+	+	+	+	+	+
Lavage	S		-	+	+	+	+	-	-
Procédés de solidification et de stabilisation									
Liants hydrauliques (ciment,...)	S		-	-	?	+	+	+	?
Vitrification	S	<i>ex situ</i>	+	+	+	+	+	+	+
Procédés thermiques									
Incinération	S	<i>ex situ</i>	+	+	+	+	+	+	+
Désorption thermique	S	<i>ex situ</i>	+	+	+	+	+	-	+

2.2 L'oxydation chimique

L'oxydation chimique s'applique essentiellement à des polluants organiques tels que les polluants halogénés ou les hydrocarbures (Huling et Pivetz, 2006), présents dans les eaux, sols ou sédiments, *in situ* et *ex situ*. Les réactions d'oxydation chimique *in situ* (aussi appelées ISCO) impliquent l'injection d'un oxydant dans le milieu afin de transformer des contaminants en molécules moins nocives. Plusieurs oxydants sont actuellement utilisés, parmi les plus courants : le permanganate (MnO_4^-), le persulfate ($\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$), l'ozone (O_3) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Huling et Pivetz, 2006). Les réactions associées à ces oxydants sont caractérisées par des paramètres spécifiques (pH, température, potentiel redox) (Tableau 2) qui régissent donc les conditions d'utilisation et d'application. Leur application peut dépendre à la fois des polluants, des temps de traitements et des caractéristiques du sol (Touzé et al., 2005). Si un grand nombre d'études sont effectuées en laboratoire afin d'étudier l'action de ces procédés sur les HAP, il est difficile de trouver des cas ayant été appliqués sur le terrain.

Tableau 2 : Potentiel redox et persistance des oxydants utilisés pour les techniques ISCO, adapté de (Huling and Pivetz, 2006)

Oxydant	Potentiel redox maximum (V)	Persistance
Permanganate	1,7	> 3 mois
Fenton (peroxyde d'hydrogène)	2,8	Minute/Heure
Ozone	2,8	
Persulfate	2,6	Heures/semaines

Dans le cadre du projet, deux réactions d'oxydation ont été retenues suite aux essais expérimentaux réalisés antérieurement (Lemaire, 2011), la réaction de Fenton associant le peroxyde d'hydrogène aux ions ferreux et la réaction du persulfate activé, associant le persulfate de sodium au peroxyde d'hydrogène.

2.2.1 La réaction de Fenton

La réaction de Fenton est un des procédés d'oxydation les plus utilisés, essentiellement basée sur la décomposition du peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène étant un oxydant dont la cinétique n'est pas assez rapide, la réaction est donc catalysée par l'ion ferreux (Fe^{2+}) et génère ainsi des radicaux libres ($\bullet\text{OH}$) qui sont très réactifs vis-à-vis des molécules aromatiques (Figure 33, eq.5). Cependant, les radicaux libres ($\bullet\text{OH}$) peuvent réagir avec de nombreuses espèces présentes dans le sol (NO_3^- , SO_4^{2-} , Cl^- , HPO_4^{2-} , HCO_3^- , CO_3^{2-}) et ainsi

affecter l'efficacité de la réaction. Le rapport molaire, utilisé dans la littérature, entre le peroxyde d'hydrogène et le fer est approximativement de 1 :10 (Kulik et al., 2006 ; Nam et al., 2001 ; Valderrama et al., 2009). La réaction complète transforme la molécule hydrocarbonée en eau et dioxyde de carbone. Certaines études ont montré que cette réaction peut être catalysée sans ajout d'ions ferreux dans des sols riches en fer (Jonsson et al., 2007; Palmroth et al., 2006 ; Yeh et al., 2003) et que son efficacité peut être augmentée en conditions acides (Valderrama et al., 2009). Néanmoins, des études ont démontré l'efficacité de cette réaction sans acidification (Palmroth et al., 2006 ; Nam et al., 2001). Cependant, si quelques rares revues ont comparé et analysé les données acquises dans la littérature sur l'efficacité de la réaction de Fenton et sur les variables qui interviennent dans la réaction (Tsitonaki et al., 2008 ; Sahl and Munakata-Marr, 2006 ; Yap et al., 2011), les données concernant les doses utilisées ne sont pas facilement comparables. En effet, la majorité des publications précisent les volumes, les concentrations, et parfois la masse d'oxydant utilisés, sans que les quantités d'oxydants utilisées ne soient rapportées à la quantité de molécules cibles présentes dans le sol. La quantité d'oxydant utilisée est souvent largement supérieure à la demande naturelle en oxydant (quantité d'oxydant nécessaire pour abattre une concentration définie en polluants), du fait principalement d'une compétition avec d'autres composés non-cibles (matières organiques, composés chimiques réduits (Huling and Pivetz, 2006)). Toutefois, pour une application potentielle *in situ*, la quantité d'oxydant doit être raisonnée et optimisée en termes d'efficacité et de rendement.

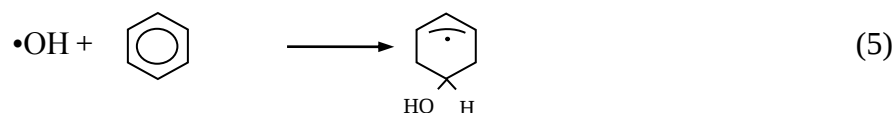
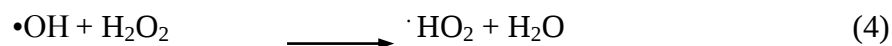
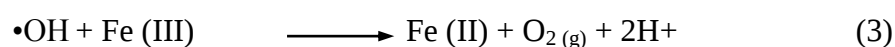
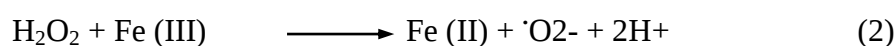
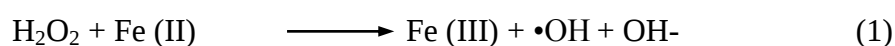


Figure 3 : Principales réactions dérivées de la réaction de Fenton

Le Tableau 3 permet de comparer certaines études réalisées sur la réaction de Fenton, à la fois au niveau de l'efficacité rapportée à la dose totale d'oxydant injectée, ainsi qu'à la quantité de polluants initialement présents. Selon ce tableau, on peut observer que les doses utilisées sont très élevées et toutes supérieures à 100 g de peroxyde d'hydrogène pur par gramme de HAP

présent dans le sol. Seuls les travaux de Sirguy et al. (2008) et Ferrarese et al. (2008) ont utilisé de faibles doses d'oxydants et démontré une efficacité élevée de la réaction (>70 % d'abattement de la teneur en HAP). Cependant, pour l'étude de Sirguy et al. (2008), la réaction a été réalisée sous un éclairage ultraviolet, ce qui de par les propriétés photosensibles des HAP permet d'améliorer la dégradation. Dans les autres études, l'efficacité est très variable et s'étend de 18 % à 100 % de dégradation des molécules cibles ce qui souligne que la composition de la pollution, son âge et la nature du substrat sur lequel elle est adsorbée sont des paramètres déterminants. La plupart des études ont été réalisées en « batch » avec un ratio solide sur liquide inférieur à 1. Si le contact entre les oxydants et les polluants est favorisé par ce type de traitement de matériaux sous forme de boues, l'extrapolation de ces résultats à des conditions *in situ* et sans déstructuration n'est pas possible. Quelques études ont tout de même été réalisées en colonne et ont montré la faisabilité de l'oxydation chimique dans des conditions hydriques insaturées (Palmroth et al., 2006).

2.2.2 Le persulfate activé

Le persulfate a longtemps été utilisé dans les industries pour initier les réactions de polymérisation et le nettoyage des piscines (Block et al., 2004). Malgré les travaux peu nombreux, l'intérêt de l'utilisation du persulfate à des fins de décontamination des sols est croissant ces dernières années (Block et al., 2004). La réaction du persulfate, à l'origine des radicaux sulfate ($\text{SO}_4^\cdot$), peut être activée par la lumière, la présence d'ion ferreux (Fe^{2+}) (Figure 4, eq. 6 et 8), des bases fortes ou du peroxyde d'hydrogène.

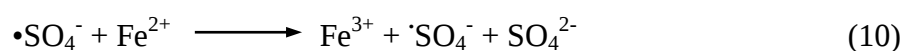


Figure 4 : Principales réactions dérivées de l'oxydation du persulfate (Huling and Pivetz, 2006)

Le persulfate est préférentiellement utilisé sous forme de persulfate de sodium et non de potassium, du fait d'une solubilité plus élevée (respectivement 560 g.l⁻¹ au lieu de 50 g.l⁻¹). Le persulfate est un oxydant beaucoup plus stable que le peroxyde d'hydrogène (Huling and Pivetz, 2006) et peut donc persister plus longtemps dans la zone traitée.

Tableau 3 : Synthèse des doses de peroxyde d'hydrogène proposées dans des communications scientifiques pour le traitement des sols par réaction de Fenton en laboratoire (Créosote : site contaminé par des huiles chargées en créosote pour le traitement du bois. MGP : Manufactured Gaz production, site contaminé par sous déchets de production du gaz, - : pas de données, ** : expérimentation sous UV). Les doses sont ramenées en gramme de peroxyde d'hydrogène pour homogénéiser les résultats des différentes études.

	HAP (mg.kg ⁻¹)	Site ou type de pollution	Dose minimum (gH ₂ O ₂ .kg ⁻¹ de sol)	Dose maximum (gH ₂ O ₂ .kg ⁻¹ de sol)	Efficacité minimum	Efficacité maximum	ratio solide/ liquide	Dose minimum gH ₂ O ₂ /1g HAP	Dose maximum gH ₂ O ₂ /g ⁻¹ HAP
(Valderrama et al.,2009)	1203	ancienne, créosote	267	802	42%	80%	4 : 20	222	667
(Palmroth et al.,2006)	3318	ancienne, créosote	-	400	n.a	50%	colonne	-	121
(Lee and Hosomi,2001)	500	artificielle, sol	-	118	n.a	100%	1 : 1,85	-	236
(Kulik et al.,2006)	1419	artificielle, sable	43	172	73%	88%	15 : 100	30	121
	2370	artificielle, tourbe	133	266	40%	63%	3 : 100	56	112
(Nam et al.,2001)	600	artificielle, sol	20	200	18%	70%	10 : 20	33	333
	3722	ancienne, MGP	-	400	n.a	42%	5 : 20	-	107
(Jonsson et al.,2006)	140	ancienne, MGP	-	678	n.a	40%	20 : 50	-	4843
	3400	ancienne, créosote	-	678	n.a	80%	20 : 50	-	199
(Jonsson et al.,2007)	90	ancienne, MGP	-	165	n.a	8,8%	20 : 60	-	1833
	1700	ancienne, créosote	-	165	n.a	43 %	20 : 60	-	97
(Ferrarese et al.,2008)	2816	sédiment	57	226	91%	98%	30 : 100	20	80
(Sirguey et al.,2008)**	701	artificielle, sol agricole	-	10	n.a	99%	5 : 10	-	14
	2107	artificielle, sol agricole	-	32	n.a	84%	5 : 10	-	15
	3264	Ancienne, cokerie	-	76	n.a	74%	5 : 10	-	23

Son association avec le peroxyde d'hydrogène est de plus en plus étudié (Huling and Pivetz, 2006). Ferrarese et al. (2008) ont montré dans des expériences en batch avec un ratio solide : liquide 30 :100, qu'une dose de persulfate de 471 g associée à une dose de peroxyde d'hydrogène de 57 g, pouvait dégrader 90% des HAP présents dans des sédiments contaminés à hauteur de 2816 mg.kg⁻¹. Une étude comparative entre l'évolution des teneurs en HAP mesurées dans des sols après 3 semaines de biodégradation et après une courte oxydation par persulfate a émis l'hypothèse que le persulfate pourrait être utilisé afin d'estimer l'accessibilité des HAP dans les sols et sédiments contaminés (Cuypers et al., 2000).

De manière générale, on remarque que les rendements de dégradation des HAP sont plus élevés pour des sols artificiellement contaminés et que peu de travaux ont porté sur l'oxydation chimique en conditions insaturées. De plus, les doses apparaissent comme étant relativement trop élevées pour une éventuelle application sur le terrain (Valterra Dépollution Réhabilitation, *communication personnelle*).

3. De l'évaluation des fonctions du sol aux stratégies de réhabilitation

De manière générale, les techniques de dépollution ont pour principal objectif de diminuer la concentration en polluants représentant un danger potentiel pour la santé humaine et l'environnement. Cependant, malgré le fait que certains procédés de dépollution, comme la désorption thermique, puissent fortement altérer le sol (Norini et al., 2007), l'évaluation de la qualité du sol n'est que rarement prise en compte après de tels traitements.

3.1 Qualité et fonctions des sols

La qualité des sols et ses perturbations peuvent se définir sur la base de fonctions et d'usages spécifiques (Lal et al., 1997). Elle peut être mesurée par des indicateurs spécifiques qui ont été proposés pour évaluer l'état d'un sol et regroupent donc les différentes fonctions du sol (Tableau 4). Tous ces indicateurs sont liés de manière directe ou indirecte et conditionnent la qualité du sol d'un point de vue physique, chimique et/ou biologique (Figure 5). Une des fonctions principales du sol est d'être un support de vie (production, biodiversité). Ce support permet par exemple d'établir un couvert végétal en vue d'une production agricole. Ce potentiel découle de différents paramètres qui caractérisent la stabilité nécessaire pour résister aux perturbations climatiques et géochimiques. Ainsi, cette fonction

peut être évaluée à travers la production de biomasse et par les paramètres physico-chimiques (Tableau 4) du sol qui conditionnent l'équilibre du système et l'apport des nutriments à travers la solution de sol (Gobat, 1998). La biomasse végétale est ainsi le reflet du bon fonctionnement d'un sol et de nombreux auteurs considèrent la biomasse comme un indicateur de la qualité du sol (Bastida et al., 2008 ; Karlen et al., 1997). Cette mesure est aussi largement utilisée comme indicateur de toxicité dans les sols ou les sédiments (Czerniawska-Kusza et al., 2006 ; Eom et al., 2007 ; Manzo et al., 2008).

Tableau 4 : Liste non exhaustive d'indicateurs utilisés pour mesurer certains paramètres du sol en lien direct avec la qualité du sol. (Adapté de Franzluebner et Halley, 2006). Les **V représentent les indicateurs utilisés dans ce travail**

PARAMETRES PHYSIQUES	Indication sur		
stabilité des agrégats	Résistance à l'érosion	Arshad et al. (1996)	X
Distribution des agrégats	Structure du sol et résistance à l'érosion	Arshad et al. (1996)	X
Masse volumique apparente	Compaction, porosité	Arshad et al. (1996)	X
Capacité de rétention en eau	Capacité de stockage en eau, porosité	Lowery et al. (1996)	V
Porosité totale	Compaction et proportion entre l'air et l'eau dans le sol	Lowery et al. (1996)	V
PARAMETRES CHIMIQUES	Indication sur		
Carbone organique total (C_{org})	Réserve et cycle des nutriments	Sikora and stott (1996)	V
Azote total (N_{tot})	Réserve en azote et cycle des nutriments	Sikora and stott (1996)	V
pH	Accessibilité des nutriments	Sikora and stott (1996)	V
Azote inorganique	Azote accessible pour la croissance des plantes	Allan and Killorn (1996)	X
Phosphore inorganique (P_{olsen})	Phosphore accessible pour la croissance des plantes	Allan and Killorn (1996)	V
Potassium (K) assimilable	Potassium accessible pour la croissance des plantes	Allan and Killorn (1996)	V
Capacité d'échange cationique (CEC)	Réserve potentiel en nutriments cationique	Summer and Miller (1996)	V
Contaminants organiques	Pollution organique	Moorman (1996)	V
PARAMETRES BIOLOGIQUES	Indication sur		
Biomasse microbienne (Carbone)	Microflore du sol	Rice et al. (1996)	X
Biomasse microbienne (Azote)	Fraction biologiquement active de l'azote du sol	Rice et al. (1996)	X
Respiration du sol (flux de CO₂)	Activité microbienne globale du sol	Parkin et al. (1996)	V
Activité enzymatique (uréase, hydrolyse de la fluoréscéine diacetate, phosphatase, amidase, aminopeptidase,...)	Activités microbiennes potentielles liés aux cycles de nutriments particuliers (C, N, P, S)	Dick et al. (1996)	V
Copie de gène d'acide désoxyribonucléique (ADN)	Communautés microbiennes spécifiques ou totales	Sadowsky (1994)	V
Vers de terres	Réseau trophique alimentaire du sol, structure du sol	Blair et al. (1996)	X
Biomasse végétale	Capacité de support de végétation	Karlen et al., (1994)	V

D'autres indicateurs, comme la biomasse ou l'activité microbienne apparaissent comme étant des indicateurs pertinents de la qualité des sols (Bastida et al., 2008). La diversité bactérienne peut renseigner sur le fonctionnement du sol (Nannipieri et al., 2003), une diminution de la diversité des espèces pouvant altérer certaines fonctions, comme la production de biomasse ou la dynamique des nutriments (Naeem et al., 1994).

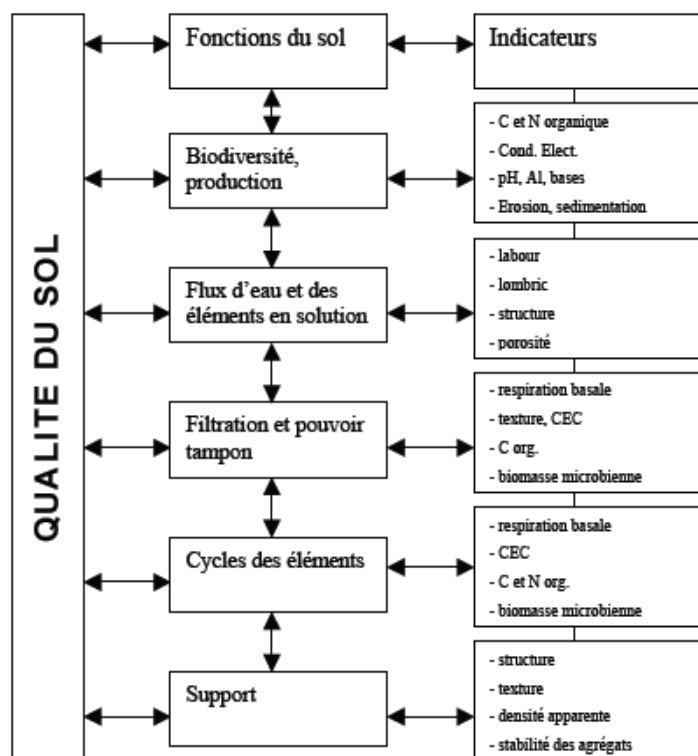


Figure 5 : Représentation schématique du concept de qualité des sols utilisant des indicateurs en relations avec les fonctions du sol (d'après Maubasch et Tugel, 1997, modifié par Gros R, 2002)

Parallèlement, la mesure de l'activité des microorganismes, reflet des processus biogéochimiques liés aux cycles des éléments comme le carbone (C), l'azote (N) ou le phosphore (P), est régulièrement prise en compte dans les mesures de qualité du sol (Karlen et al., 1997 ; Kang et al., 2005 ; Masto et al., 2007). La mesure de dégagement de CO₂ en conditions d'humidités contrôlées (les différences observées sont ainsi uniquement liées à la microflore et aux substrats) est une des méthodes les plus courantes pour évaluer l'activité microbienne d'un sol (Sánchez-Monedero et al., 2008). L'utilisation d'indicateurs enzymatiques permet quant à elle d'évaluer des activités microbiennes spécifiques liées aux cycles biochimiques majeurs (Karlen et al., 1997). Si les activités enzymatiques ont souvent été utilisées afin d'évaluer la qualité de sols agricoles (Bastida et al., 2008), certains auteurs les utilisent afin d'évaluer des perturbations anthropiques plus marquées

(Floch et al., 2011 ; Gianfreda et al., 2005). Les indicateurs enzymatiques sont relativement variés, allant des mesures d'activité globale (*e.g.* déshydrogénases (Camiña et al., 1998), hydrolases (Adam et Duncan, 2001), à des mesures plus spécifiques du cycle du carbone (cellobiohydrolase, β -glucosidase), de l'azote (leucine/alanine-aminopeptidase) ou du phosphore (phosphomonoestérase) (Afnor, 2010 ; Marx et al., 2001).

Outre ces fonctions de support de production ou de vie, le sol possède un véritable rôle de filtre et de tampon dans l'écosystème (Figure 5), ce qui régule les flux en éléments dans les eaux de percolation qui rejoignent les eaux souterraines. Il est donc nécessaire d'évaluer la capacité du sol à « conserver » ses nutriments et à immobiliser des polluants pouvant être toxiques pour les organismes vivants. Comme le représente la Figure 5, les différentes fonctions d'un sol sont interdépendantes et l'altération d'un paramètre peut avoir de fortes répercussions sur les fonctions du sol.

Dans ce travail, plusieurs indices ont été utilisés, indiqués dans le tableau 4, afin de refléter l'état du sol. Il s'agit de paramètres physiques et chimiques, et de paramètres biologiques permettant de quantifier le nombre de microorganismes (bactériens ou fongiques) ainsi que leur diversité, l'activité biologique du sol (mesures globales et spécifiques de certains éléments) et la fonction support de végétation.

3.2 Perturbation, résilience et résistance des fonctions du sol

Deux concepts principaux régissent le fonctionnement du sol face à une perturbation : la résistance et la résilience (Seybold et al., 1999). La résistance est définie comme la capacité du système « sol » à fonctionner sans changement après une perturbation (Pimm, 1984). La résilience est définie comme la capacité du sol à retrouver, après perturbation, un état d'équilibre, plus ou moins proche de l'état initial (Pimm, 1984). Les sols pollués sont des systèmes dont l'équilibre, en termes de fonctionnement, se met en place au cours du temps de la même façon que pour des systèmes sains. Même si ces sols sont fortement pollués et perturbés, ils sont caractérisés par: i) des densités en organismes, ii) des activités biologiques, iii) une capacité de support de végétation, tous représentatifs des fonctions que peut remplir ce sol et d'un état d'équilibre (Cébron et al., 2011)

D'un point de vue scientifique, l'impact de la pollution sur la qualité et les fonctions des sols est largement pris en compte en écotoxicologie. Des bioindicateurs sont développés et testés dans ce but (Programme ADEME : Bioindicateurs de qualité des sols, projet « Environmental Assessment of Soil for Monitoring »). Cependant, même si la Loi n°76-629 du 10 juillet 1976,

relative à la protection de la nature, énonce l'obligation de prendre en compte l'environnement à l'occasion de toute action ou décision publique ou privée risquant d'avoir un impact sur l'environnement, l'impact des traitements de dépollution sur la qualité et les fonctions du sol fait encore l'objet de peu d'études (Norini, 2007).

A partir des quelques données disponibles dans la littérature, l'impact que peut avoir un traitement par oxydation chimique sur les fonctions du sol sera abordé dans le chapitre suivant.

3.3 Impact des procédés d'oxydation chimique sur les caractéristiques des sols

Il est difficile de proposer une synthèse précise et à caractère générique de l'impact de l'oxydation chimique sur les propriétés des sols. L'état de l'art comporte en effet des études peu nombreuses et non centrées sur cette question. Si quelques données sont acquises sur l'effet de la réaction de Fenton sur les fonctions du sol, il est souvent nécessaire d'extrapoler les effets mesurés avec le peroxyde d'hydrogène seul, beaucoup plus décrit dans la littérature. De plus, les effets varient en fonction des types de sols (Sirguy et al., 2008) et sont la plupart du temps observés sur des sols traités en conditions saturées en eau et en « batch ». Concernant l'impact que peut avoir le persulfate activé sur le sol, aucune étude n'a été réalisée.

3.3.1 Impact de l'oxydation chimique sur les paramètres physico-chimiques

Comme énoncé précédemment (cf.3.2.1), l'oxydation est le plus souvent optimale à certaines valeurs de pH. Par exemple, l'oxydation chimique par réaction de Fenton est plus efficace en conditions acides avec des baisses de pH allant jusqu'à 4 unités (Ferguson et al., 2004 ; Sirguy et al., 2008 ; Villa et al., 2008). La baisse de pH n'est pas sans conséquences sur les caractéristiques physico-chimiques du sol et contribue fortement à la dissolution des métaux (Lopes et al., 2008 ; Villa et al., 2008). Après un traitement par réaction de Fenton, Monahan et al. (2005) ont observé une mobilisation de Cd, Cu et Zn préalablement adsorbés sur de la kaolinite. Ces transferts sont alors susceptible d'engendrer des contaminations métalliques défavorables pour de nombreux organismes vivants (Boularbah et al., 2006 ; Delhaize et al., 1995 ; Illmer, 1995). L'acidification peut aussi avoir un impact sur la capacité d'échange cationique et donc sur la capacité du sol à fournir des cations échangeables essentiels aux organismes (K^+ , Mg^{2+} , Na^+). L'oxydation chimique par la réaction de Fenton avec ajustement du pH à des valeurs inférieures à 7 déstabilise donc fortement le milieu, malgré le fait que

dans certains cas le pH semble pouvoir augmenter au cours du temps après le traitement (Ferguson et al., 2004). Les données de la littérature sur la teneur en carbone, azote, et phosphore assimilable, qui peuvent représenter en partie le potentiel fertile d'un sol, dans les sols oxydés par la réaction de Fenton ou du persulfate activé sont relativement lacunaires. Mais il y a davantage de travaux portant sur l'action du peroxyde d'hydrogène seul, beaucoup plus décrit dans la littérature. Les réactions d'oxydation par le peroxyde d'hydrogène interfèrent avec un ensemble de molécules organiques, induisant des pertes en Corg pouvant atteindre 90% (Leifeld et Kögel-Knabner, 2001). De telles pertes pourraient s'avérer désastreuses pour la structure du sol, l'agrégation dépendant en majeure partie de la matière organique (Abiven et al., 2009). Ces réactions oxydatives sembleraient avoir des interactions plus élevées avec les molécules aromatiques (Westerhoff et al., 1999), même si toutefois certaines structures condensées comme celle de la matière organique anthropique peuvent résister à l'action de telles réactions oxydatives (Mikutta et al., 2005). Les composés azotés sont eux aussi soumis à l'impact du peroxyde d'hydrogène. Yasuo et Akio (1977) ont démontré que le traitement par le peroxyde d'hydrogène d'un sol entraînait la formation de résidus azotés principalement solubles dans l'eau et dominés à 70% par des molécules azotées inorganiques. L'ammoniac, issu de la désamination des acides aminés par la réaction chimique appliquée à des acides humiques, est une des formes azotées inorganiques principalement formées (Mikutta et al., 2005 ; Sirguey et al., 2008).

3.3.2 Impact de l'oxydation chimique sur les paramètres biologiques

Les composés radicalaires pouvant être générés suite à l'oxydation chimique sont connus pour avoir des effets nocifs sur les composants cellulaires des microorganismes et peuvent endommager la structure de l'ADN (Bui et Cotton, 2002), entraînant ainsi des mutagénèses ou des morts cellulaires et la dégradation des protéines ou lipides des cellules (Izawa et al., 1996). Néanmoins, il existe des mécanismes cellulaires qui permettent aux organismes de résister à des stress oxydatifs (Sies, 1993 ; Izawa et al., 1996). C'est le cas des catalases, enzymes permettant de protéger des cellules exposées à de fortes concentrations en peroxyde d'hydrogène (Sahl et Munakata-Marr, 2006). Outre ces études ciblées sur l'effet des processus oxydatifs sur les cellules, des données ont été acquises sur l'impact de l'oxydation chimique sur les communautés microbiennes. Elles mettent en avant un impact négatif de l'oxydation directement après traitement du sol, avec une diminution des populations microbiennes (Ferguson et al., 2004 ; Buyuksonmez et al., 1998 ; Palmroth et al., 2006 ; Tsitonaki et al., 2008). Les diminutions des densités microbiennes peuvent parfois être telles

que la quantification des microorganismes par les techniques habituelles est difficile. Cet impact toxique n'est cependant pas définitif et la recolonisation du milieu traité par des organismes est possible. Le temps pour revenir à des densités proches ou supérieures à celles de l'état initial est plus ou moins long, allant de quelques jours (Miller et al., 1996) à quelques mois (Hrapovic et al., 2005), voire quelques années (Ferguson et al., 2004). Cet effet a été observé pour différents oxydants, que ce soit le permanganate, le persulfate ou le peroxyde d'hydrogène (Sahl et Munakata-Marr, 2006). En ce qui concerne l'impact des réactions d'oxydation sur la diversité microbienne, seuls les travaux de Miller et al., (1996) ont montré une baisse de la diversité suite à un traitement par réaction de Fenton. Néanmoins, le test a été réalisé en culture liquide sur des solutions extraites de sol et ne permet pas une transposition aux sols *in situ*. Les quelques études concernant les activités microbiennes montrent de manière générale des variations contrastées suite au traitement par oxydation chimique (Palmroth et al., 2006 ; Tsitonaki et al., 2008). Palmroth et al. (2006) ont ainsi montré que le taux de dioxyde de carbone mesuré dans des incubations de sol traités par réaction de Fenton augmentait au cours du temps, de même que l'activité de la leucine aminopeptidase, enzyme spécifique du cycle de l'azote. La réaction de Fenton diminuerait cependant les activités des estérases, résultat également observé par (Tsitonaki et al., 2008) après un traitement par le persulfate de sodium.

Si de nombreuses études ont été menées sur l'impact que peut avoir un traitement par oxydation chimique sur la microflore et en particulier sur celle présente dans le sol, c'est avant tout pour son rôle clé dans les techniques de bioremédiation. Par nature, les bactéries ou les champignons sont capables de dégrader, en conditions aérobies ou anaérobies, des polluants organiques (Diaz, 2004). Dans le cas particulier des HAP, de nombreuses études ont montré la capacité de dégradation des HAP par les bactéries et les champignons (Cerniglia, 1997 ; Corgié et al., 2003 ; Juhasz et al., 2000), cette biodégradation pouvant être augmentée à proximité des racines des plantes (Corgié et al., 2003). La littérature est assez fournie concernant la biodégradation des HAP après un traitement par oxydation chimique (Kulik et al., 2006 ; Palmroth et al., 2006 ; Nam et al., 2001 ; Sahl et Munakata-Marr, 2006). Ainsi, le couplage oxydation/biodégradation conduirait à des taux de dégradation plus forts que les techniques prises séparément (Nam et al., 2001). Nam et al. (2001) suggèrent que l'oxydation par réaction de Fenton oxyderait préférentiellement les HAP de 4 à 5 cycles quand la biodégradation serait plus efficace sur les HAP de 2 à 3 cycles. L'oxydation chimique apparaîtrait alors comme un prétraitement efficace en vue d'un traitement par

biodégradation. Kulik et al. (2006) suggèrent que le traitement par oxydation chimique peut affecter une partie de la matière organique, permettant à la fois d'augmenter la disponibilité des HAP fortement liés à celle-ci ainsi que de stimuler l'activité microbienne en fournissant une autre source de nutriments. La formation de dioxygène pendant la réaction pourrait aussi être un mécanisme permettant de stimuler la dégradation des HAP par les microorganismes (Kulik et al., 2006)

3.3.3 Impact de l'oxydation sur la fonction de support de végétation

Une des principales fonctions d'un sol est la fonction de support de végétation. Or il n'existe à ce jour qu'une seule étude ayant testé cette fonction après un traitement par oxydation, comparant l'utilisation du permanganate et d'un réactif de Fenton (Sirguy et al., 2008). L'utilisation du permanganate peut entraîner la précipitation de MnO_2 (Huling et Pivetz, 2006 ; Sirguy et al., 2008) et entraîner une baisse de la perméabilité du sol. Indirectement, cela peut engendrer des conditions anaérobies défavorables à l'établissement de la végétation. La réaction de Fenton présente dans ce contexte l'avantage d'éviter la formation de dioxyde de manganèse, cependant, les valeurs de pH inférieures à 5 conduisaient à une diminution de la croissance des plantes. La réaction de Fenton pouvait cependant dans certains cas permettre une meilleure germination et croissance de la végétation, dans le cas où les sols présentaient un fort caractère hydrophobe (Sirguy et al., 2008).

Tableau 5 : Synthèse des principaux effets de l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène sur les propriétés des sols

Oxydation	
Matières organiques	diminution ou altération (Leifeld et Kögel-Knabner, 2001; Sirguy et al., 2008)
Azote	diminution et altération (Yasuo et Akio, 1977; Sirguy et al., 2008)
pH	diminution (Sirguy et al., 2008)
CEC	diminution (Sirguy et al., 2008)
Transfert en éléments	potentiel (métaux, ions) (Monahan et al., 2005)
Densité en microorganismes	diminution temporaire (Palmroth et al., 2006)
Diversité des microorganismes	diminution (Miller et al., 1996)
Activité biologique (estérase, aminopeptidase)	diminution (Palmroth et al., 2006; Tsitonaki et al., 2008)
Support de végétation	baisse de germination et de croissance (Sirguy et al., 2008)

3.4 Stratégie de réhabilitation

La dégradation de sols par les activités humaines est parfois telle qu'il est nécessaire d'avoir recours à des stratégies de réhabilitation afin de permettre au sol de retrouver ses fonctions. Dans le cas de sols pollués, la dépollution est alors la première étape de la réhabilitation. Toutefois, les techniques de dépollution ne permettent pas forcément au sol de conserver ou de restaurer ses fonctions primaires qui peuvent dans certains cas être fortement altérées (Norini, 2007). Dans ce cas, des interventions liées au génie pédologique peuvent compléter les techniques de dépollution afin de réhabiliter les fonctions des sols.

3.4.1 Concept

Le concept de génie pédologique est récent et a été défini dans le référentiel pédologique (2008). Il regroupe les opérations volontaires de construction de sol, en vue d'obtenir un milieu plus fertile pour la végétalisation du sol. Ce concept dérive des notions de réhabilitation ou de restauration utilisées dans le cadre de l'ingénierie écologique des sites dégradés. Si l'on reprend les définitions tirées de travaux de Séré (2007) et Chambers et Wade (1992)

- La « restauration » (en anglais *restoration*) décrit un retour fidèle de l'écosystème à l'état initial ;
- La « réhabilitation » (en anglais *rehabilitation*) désigne la création d'un écosystème identique (en termes de structures et de fonctions) à celui qui était présent avant perturbation, avec la possibilité d'introduire des éléments différents, mais capable d'assurer les mêmes fonctions. Dans ce cadre-là, ce terme est associé au terme de refonctionnalisation, traduisant un retour des fonctions primaires du sol

Le sol doit alors être restauré sur la base de ses fonctions naturelles : i) support pour la production de biomasse, ii) filtre, tampon et transformation, iii) support de vie, de diversité (Séré et al., 2008). Pour cela, la restauration, outre l'élimination des polluants présents, doit intervenir sur certains paramètres comme, par exemple, la capacité de rétention en eau, les teneurs en nutriments, l'accumulation de matières organiques (Carter et al., 2002 ; Sourková et al., 2005).

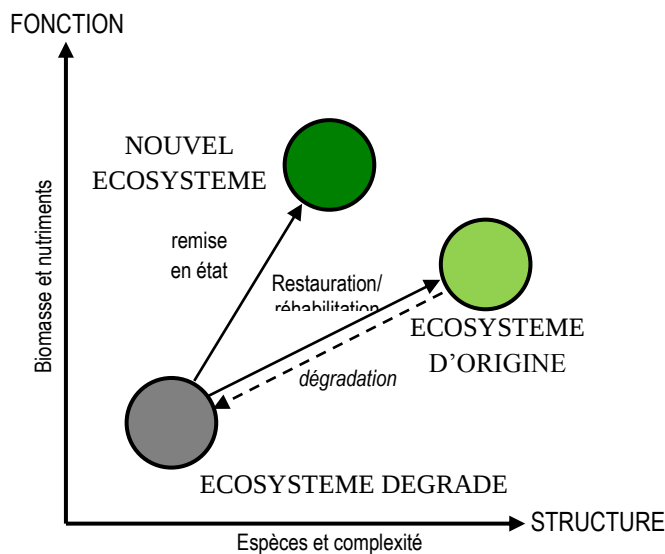


Figure 6 : Différentes trajectoires de la restauration écologique
(tiré de Séré, 2007)

3.4.2 Techniques/méthodes de réhabilitation des propriétés de sols

En fonction des contraintes physiques ou chimiques des sols dégradés, une incorporation de terre dite végétale (issue de l'horizon supérieur de sols forestiers ou agricoles pourvue en nutriments et en matières organiques) (Bradshaw, 2000 ; Séré et al., 2007), d'amendements organiques et/ou minéraux en association avec des traitements physiques où l'implantation de végétaux peuvent être envisagés (Tableau 6). Les plantes sont à l'interface entre le sol et l'atmosphère, et participent aux différents cycles des éléments nécessaires à la fertilité du sol. L'installation d'une végétation influe sur les caractéristiques physiques, chimiques et biologiques du sol. Elle peut être ainsi utilisées pour restaurer l'écosystème (Harrington, 1999). Des actions de fertilisation, de travail du sol, d'amendements doivent être cependant parfois réalisées avant d'envisager un semis (Harrington, 1999). Parmi les matières organiques utilisées, les matières organiques exogènes issues des sous-produits industriels, aux propriétés fertilisantes présentent l'avantage d'être souvent disponibles à faibles coûts (Vetterlein et Hüttel, 1999). On peut citer l'exemple des sous-produits papetiers qui constituent un substrat adapté au développement microbien (Ribeiro et al., 2010) et utilisable afin d'améliorer les propriétés du sol (Nemati et al., 2000). Ces déchets ont également un pouvoir tampon permettant la neutralisation du pH (Pichtel et al., 1994) et sont parfois employés afin de stabiliser des polluants métalliques (Calace et al., 2005). Ces déchets ont fait l'objet d'une étude de construction de sol et ont montré leur capacité à établir des conditions propices au développement de la végétation (Séré et al., 2008). Les déchets organiques issus de stations

d'épuration des eaux usées urbaines (STEP) constituent également des substrats particulièrement bien adaptés au développement microbien. L'amendement de sols par des boues de STEP permet d'augmenter les activités microbiennes (Crecchio et al., 2004 ; Pascual et al., 1998). En plus des amendements organiques, divers minéraux peuvent être utilisés. Ainsi, pour stabiliser les métaux, des matériaux comme les amendements calciques, l'apatite ou les zéolites peuvent être employés (Deschamp et al., 2006).

Tableau 6 : Exemples d'utilisation d'amendements organiques ou minéraux associée à des traitements bio-physico-chimiques de sols pollués (d'après (Séré,2007; Bresson et al.,2001; Harrington ,1999 ; Tejada et al., 2008; Fierro et al., 1999)

Nature du problème		Traitement
Physique		
Texture	grossière	apport de matières organiques, fines
	fine	apport de matières organiques
Structure	compacte	traitement par labour ou scarification
	particulaire	apport de matières organiques, argiles
Stabilité	instable	apport de stabilisant, matières organiques
		plantation d'espèces végétales couvrantes
apport de sous produits papetiers		
Humidité	hydromorphie	traitement par drainage
	sec	apport de mulch
		traitement par irrigation
Chimique		
Carence	macro-nutriments	apport de fertilisants, chaux
	micro-nutriments	apport de fertilisants
Toxicité		
pH	acide	apport de chaux, sous produits papetiers
	basique	apport de déchets pyritiques, matières organiques
Salinité	élevée	traitement par désagrégation, irrigation
Pollution	éléments en traces	apport de matières organiques, zéolite, bentonite
		plantation d'espèces végétales tolérantes
		traitement par lavage, tri granulométrique
	polluants organiques	implantation d'espèces végétales tolérantes, micro-organismes dégradants
procédés de dépollution		

4. Objectifs de la thèse

La synthèse bibliographique a permis de constater les lacunes existantes sur l'impact que peut avoir un traitement de remédiation, et en particulier l'oxydation chimique, sur les caractéristiques et les fonctions du sol, et comment les restaurer. L'objectif de la thèse était d'évaluer l'impact de l'oxydation chimique en conditions insaturées, sur des paramètres physico-chimiques et biologiques du sol, permettant d'évaluer son fonctionnement. Pour atteindre ces objectifs, différentes expériences ont été réalisées à la fois avec des dispositifs de laboratoire, batch, colonnes, cultures en vases de végétation, permettant un contrôle des conditions expérimentales et des dispositifs de terrain, des lysimètres, afin de se rapprocher des conditions réelles. Ce travail de thèse s'est articulé autour de deux parties, comprenant chacune plusieurs questions scientifiques:

- **Impact de l'oxydation chimique en conditions insaturées sur les paramètres biologiques et physico-chimiques de terres contaminées**
 - Quels paramètres (cf. tableau 3) sont affectés par le traitement d'oxydation chimique en conditions insaturées ?
 - L'impact sur ces paramètres varie-t-il en fonction de l'oxydant utilisé ?
 - L'impact mesuré varie-t-il en fonction des caractéristiques physico-chimiques et biologiques des terres ?
 - Comment évoluent ces paramètres au cours du temps après l'oxydation ?
- **Refonctionnalisation des terres oxydées par des amendements**
 - Quels amendements pour quel type de terre ?
 - Quel est l'impact des amendements sur les paramètres physico-chimiques et biologiques des terres oxydées ?
 - L'effet des amendements se maintient-il au cours du temps ?

La comparaison des études menées en laboratoire avec les études menées sur des dispositifs de terrains en conditions climatiques réelles devait permettre d'évaluer si les réponses à chacune de ces questions étaient extrapolables entre les différents dispositifs étudiés. Les travaux réalisés devaient permettre aussi de proposer une démarche et des outils ou indicateurs pertinents pour évaluer l'impact d'un traitement (remédiation, restauration) sur les fonctions du sol.

CHAPITRE 2 – Matériels et Méthodes

Les travaux de la thèse s'articulent autour de plusieurs dispositifs expérimentaux, allant de l'échelle expérimentale du laboratoire jusqu'aux dispositifs de terrain en conditions climatiques réelles. Dans la première partie de ce chapitre dédié aux matériels et méthodes communs à toute la thèse, les terres et matériaux et les dispositifs utilisés sont décrits et leur choix justifié. Dans une deuxième partie sont décrites les analyses qui ont été réalisées sur les échantillons issus des différentes expériences. Les différents dispositifs et plans expérimentaux répondant à des objectifs précis, en lien avec des questions scientifiques ciblées ne sont pas décrits ici, mais en début de chaque chapitre de résultats afin d'en poser clairement les conditions expérimentales.

1. Matériels

Cette partie présente les différents matériaux ainsi que leurs propriétés et les dispositifs expérimentaux utilisés dans les différentes expérimentations.

1.1 Les terres

1.1.1 Choix des terres

Le principal critère de choix des terres mises en œuvre dans les différentes expérimentations était d'avoir des caractéristiques contrastées susceptibles d'induire des réponses extrêmes face à un stress tel que l'oxydation chimique. Les terres devaient en particulier présenter des teneurs en carbone organique, en calcaire et ainsi qu'une disponibilité des polluants différentes. Ces paramètres peuvent en effet majoritairement influencer l'oxydation chimique. Ainsi, l'impact de l'oxydation chimique sur deux terres de friche industrielle, avec des contaminations multiples anciennes (métaux, HAP), qui ont fait l'objet de nombreuses études (Cébron et al. 2009 ; Monsérié et al., 2009 ; Norini, 2007), a été confronté à celui mesuré sur une terre agricole artificiellement contaminée par des HAP. Cette contamination artificielle avait pour objectif de représenter une pollution, récente et disponible.

1.1.2 Caractéristiques des terres

Les 3 terres choisies ont en commun une texture sablo-limoneuse et leurs caractéristiques physico-chimiques sont par ailleurs variables. Il y a en particulier un contraste marqué entre les terres issues de friches industrielles et la terre agricole (Tableau 7).

La terre de Neuves-Maisons (dénommée *NM*) est utilisée en tant que terre de « référence » pour des études sur les friches industrielles, en particulier dans le cadre des travaux du GISFI (<http://www.gisfi.fr>) (Cébron et al., 2011 ; Ouvrard et al., 2011). Cette terre est issue du site de Neuves-Maisons (Meurthe et Moselle), ayant abrité des activités industrielles multiples de 1900 à 1983 (*e.g.* cokerie, usine métallurgique). Cette terre présente une forte teneur en carbone organique ($> 50 \text{ g.kg}^{-1}$) et en calcaire total ($> 20 \text{ g.kg}^{-1}$). La pollution présente est multiple et constituée de HAP avec une teneur totale supérieure à 1000 mg.kg^{-1} (16 HAP, US EPA) et de métaux (ex : teneur en zinc $> 1500 \text{ mg.g}^{-1}$). Le pH de la terre est proche de la neutralité (7,5).

La terre de Chenevières (dénommée *Ch*) est une terre agricole de parcelle cultivée (Chenevières (Ch), Meurthe et Moselle) dont l'historique de gestion est connu. Cette terre présente de faibles teneurs en carbone organique et calcaire total. La terre Ch a été artificiellement contaminée à hauteur de 1000 mg.kg^{-1} par deux HAP (pyrène (PYR) et phénanthrène (PHE)) en quantité équivalente. C'est une terre dont le pH est relativement acide ($5 < x < 6$). Les éléments traces métalliques (ETM) sont tous présents à des concentrations inférieures aux limites supérieures indiquées par la norme NF U44-551 pour les supports de culture.

La terre d'Homécourt (*Ho*) est issue du site d'une ancienne cokerie en fonctionnement de 1922 à 1980 (Homécourt, Meurthe et Moselle). La pollution par les HAP et par les métaux est historique, de même nature que celle de *NM*, avec une distribution des HAP légèrement différente, la proportion en HAP légers étant plus élevée pour la terre *Ho*. Les caractéristiques physico-chimiques de cette terre sont proches de la terre *NM*, avec un pH légèrement plus basique (8,4).

Tableau 7 : Caractéristiques physico-chimiques des terres utilisés dans les expérimentations (<Lq : Limite de quantification, nd : non détecté). Les deux valeurs définies pour certains paramètres représentent les valeurs extrêmes retrouvées dans les différents lots utilisés pour les expérimentations. Pour les paramètres présentant des valeurs stables entre les différents lots, aucun intervalle de valeur n'a été donné. Les teneurs en HAP sont celles des lots des HAP utilisés dans le chapitre 4 et représentent les valeurs moyennes retrouvées pour ces terres. Les HAP individuels sont exprimés en % de la somme totale.

Type	Chênevières (Ch) terre agricole contaminée artificiellement	Neuves-Maisons (NM) terre de friche industrielle contaminée	Homécourt (Ho) terre de friches industrielle contaminée
Sables (%)	57,0	61,3	65,9
Limons (%)	31,9	21,7	24,2
Argiles (%)	11,1	12,6	9,9
Corg (g.kg ⁻¹)	10 - 14	50 - 67	> 150
N total (g.kg ⁻¹)	0,96 - 1,05	2,2 - 2,47	3,6
C/N	10 - 13	23 - 26	55,1
CaCO ₃ (g.kg ⁻¹)	< Lq	21,0 - 37,7	369
P ₂ O ₅ (g.kg ⁻¹) (méthode Olsen)	0, 14 - 0,03	0,073 - 0,076	0,021
pH	5 - 6	7,1 - 7,5	8,4
CEC (cmol.kg ⁻¹)	2,2 - 5	9,2	8,9
Capacité au champ (%)	15,8	26,5	22,4
Cadmium (Cd) total (mg.kg ⁻¹)	< Lq	< Lq	< Lq
Chrome (Cr) total (mg.kg ⁻¹)	144,3	583,0 - 1794,6	217,9
Cuivre (Cu) total (mg.kg ⁻¹)	49,4	167,6	79
Nickel (Ni) total (mg.kg ⁻¹)	< Lq	98,5	< Lq
Plomb (Pb) total (mg.kg ⁻¹)	< Lq	131,7 - 719,0	55
Zinc (Zn) total (mg.kg ⁻¹)	76,4	1981	220
Naphtalène (%)	n.d	2,5	1,1
Acenaphtylene (%)	n.d	0,2	2,3
Acenaphthene (%)	n.d	2,4	6,2
Fluorene (%)	n.d	2,8	11,4
Phenanthrene (%)	500	9,6	15,6
Anthracene (%)	n.d	2,6	3,7
Fluoranthene (%)	n.d	16,6	19,6
Pyrene (%)	500	12,3	10,5
Benzo(a)Anthracene (%)	n.d	8,3	5,4
Chrysene (%)	n.d	5,5	4,75
Benzo(b)Fluoranthene (%)	n.d	10,8	5,7
Benzo(k)Fluoranthene (%)	n.d	5,4	2,5
Benzo(a)Pyrene (%)	n.d	7,3	3,7
Dibenzo(a,h)Anthracene (%)	n.d	1,2	0,8
Benzo(g,h,i)Perylene (%)	n.d	6,9	3,6
HAP totaux (mg.kg ⁻¹)		1254,1	876,1

1.2 Les matériaux d'amendement

1.2.1 Choix des matériaux

Le choix et la quantité des matériaux qui ont été utilisés afin de refunctionaliser les terres traitées par oxydation résultent de l'interprétation des résultats des différentes expérimentations et sera justifié plus en détail dans les chapitres concernés. Toutefois, les matériaux choisis et présentés ci-après ont déjà été utilisés dans différents travaux

(Pey, 2010 ; Séré, 2007) et leurs forts potentiels fertiles, structurant, hydriques ou tampon ont été montrés avec des terres traitées par désorption thermique (Séré et al., 2008).

1.2.2 Les sous-produits papetiers

Les boues de papèterie sont des sous-produits de l'épuration des eaux usées du procédé de fabrication du papier. Ces sous-produits papetiers (dénommés SPP) présentent de fortes teneurs en cellulose ($\approx 9\%$) et ont un pH moyen de 8. Les matériaux mis en œuvre dans la thèse sont âgés d'un mois maximum et n'ont pas subi de désencrage. Ils ont été fournis par la société Valterra (Vandœuvre-lès-Nancy, Meurthe et Moselle) et proviennent de la papèterie de Raon (Usine de Raon l'Etape, Vosges). Ces boues sont constituées de 90% de boues dites primaires et de 5 % de boues dites biologiques. La teneur totale en matière organique des SPP constituée de 17 % de fraction soluble facilement biodégradable et de 83 % de cellulose, lignine, hémicellulose constitutives des fibres végétales, représente 15,6 % du poids des boues SPP brutes (Tableau 8). Le potentiel d'apport d'humus stable est ainsi évalué par le laboratoire SADEF (Mulhouse, Haut-Rhin) à 50 kg.t^{-1} . Ces valeurs sont issues du dossier de demande d'autorisation pour l'extension du plan d'épandage de sous-produits papetiers (TVD, 2003) et représentent des valeurs moyennes retrouvées dans ce type de boues issues de la papèterie de Raon l'Etape.

1.2.3 Le compost

Le compost (CDV) est produit par la société Lorcompost (Bures, Meurthe et Moselle) et répond à la norme NFU 44-095. Il a subi 2 mois de fermentation, puis 3 mois de maturation en andains avec retournements, avant d'être criblé à 20 mm. Il est composé de déchets verts et de boues de station d'épuration urbaine. Les proportions de ces matériaux sont adaptées afin que le rapport C/N, la porosité et l'humidité soient optimaux. La teneur en carbone organique du compost est de 23,7 % et en azote organique de $21,4 \text{ g.kg}^{-1} \text{ MS}$ (Tableau 8). Il présente un rapport C/N de 9,7.

Tableau 8 : Propriétés agronomiques moyennes des boues de papèteries (SPP) et du compost de déchets verts (CDV) Source : Valterra Depollution/Rehabilitation. Les données sont exprimées par rapport à la matière sèche.

	SPP	CDV
Siccité % de produit brut	34,1	66,5
pH	8,1	8,4
C/N	66,5	9,7
Carbone organique (Corg) (%)	23,05	23,75
Matières organiques (%)	46,1	47,5
Phosphore total (g.kg ⁻¹)	1,4	32,6
K ₂ O total (g.kg ⁻¹)	0,5	10,4
MgO total (g.kg ⁻¹)	4,1	8,1
CaO total (g.kg ⁻¹)	248,7	98,5
Azote total (N _{tot}) (g.kg ⁻¹)	3,7	24,4
N organique (g.kg ⁻¹)	3,6	21,4
Cd (mg.kg ⁻¹)	0,3	1,1
Cr (mg.kg ⁻¹)	7,6	40,4
Cu (mg.kg ⁻¹)	30	166,9
Mercure (Hg) (mg.kg ⁻¹)	0,02	0,8
Ni (mg.kg ⁻¹)	3,4	22,6
Pb (mg.kg ⁻¹)	3,6	82,8
Zn (mg.kg ⁻¹)	24	464,9
Benzo (a) pyrène (mg.kg ⁻¹)	< 0,1	<0,2
Benzo (b) fluoranthène (mg.kg ⁻¹)	0,07	0,3

1.3 Les dispositifs expérimentaux

Différents dispositifs ont été utilisés dans la thèse depuis des dispositifs simplifiés au laboratoire, batch, colonnes, vases de végétation, jusqu'à des dispositifs *in situ*, des lysimètres. Les dispositifs sont brièvement présentés, et les conditions expérimentales seront détaillées dans les chapitres de résultats.

1.3.1 Dispositifs de laboratoire

1.3.1.1 *Expérimentation d'oxydation en batch (Chapitre 3)*

L'oxydation a été réalisée dans des cristallisoirs (Ø=19cm, H=9cm) de 2 L, qui ont permis de traiter de petites quantités de terre (< 2 kg) en conditions non saturées, et sans percolation des solutions.

1.3.1.2 *Expérimentation d'oxydation en colonnes de laboratoires (Chapitre 4)*

Des colonnes ont été réalisées sur mesure (Ø=6,3cm, H=16cm) par l'atelier technique du LRGP (ENSIC) (Figure 7, a et b). Une grille en inox et du tissu géotextile disposés au fond de

la colonne ont permis la filtration des percolats pendant le traitement chimique des terres. Les colonnes contenaient l'équivalent de 200 g de terre sèche. Un système de type « pommeau de douche » a permis une aspersion régulière de la surface de la colonne de terre pendant le traitement avec une alternance de différentes solutions injectées par des pompes péristaltiques (solution d'oxydant/solution de catalyseur).

1.3.1.3 *Expérimentation de refonctionnalisation en vases de végétation (Chapitre 5)*

Les vases de végétation utilisés pour cette expérimentation ($\varnothing=16\text{cm}$, $H=12\text{ cm}$) contiennent 750 g de terre sèche ou de mélange de matériaux (Figure 7). Les pots sont percés par le fond afin de drainer les supports de culture et d'éviter l'asphyxie des racines. Une coupelle a été disposée à la base des pots.

1.3.2 Dispositif de terrain (Chapitre 6)

Les essais de terrain ont été réalisés sur la station expérimentale du GISFI (Homécourt, Meurthe et Moselle). Les dispositifs utilisés sont des colonnes lysimétriques ($\varnothing=1,12\text{ m}$, $H=2\text{ m}$) (Figure 8). Les colonnes ont été remplies de terre NM, en septembre 2009, couche par couche jusqu'à une hauteur de 1,70 m en disposant un filtre drainant de sable de 15 cm de hauteur au fond du lysimètre. Les colonnes sont équipées de manière à suivre *in situ*, via des sondes, divers paramètres (humidité, température, potentiel redox) à différentes profondeurs (50, 100, 150 cm). De plus, des bougies poreuses permettent d'échantillonner la solution du sol à ces mêmes profondeurs, en complément de la collecte des eaux de percolation à la base des lysimètres. Pour les analyses de terre, des carottages sur la hauteur du lysimètre ont été effectués et différents horizons ont été distingués. Les horizons et la méthode de carottage seront détaillés dans le chapitre dédié aux essais de terrains.

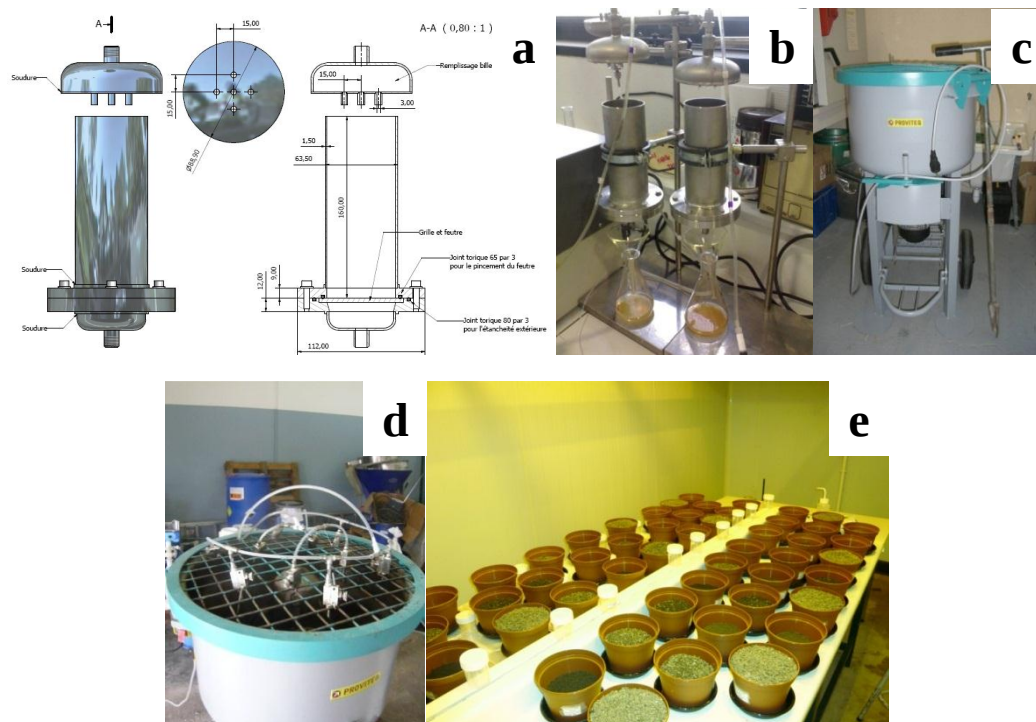


Figure 7 : Dispositifs de laboratoire utilisés dans les expérimentations (a et b: colonnes et système d'aspersion (source : Lemaire, 2011), c et d : malaxeur et système d'aspersion, e : disposition des pots dans la chambre de culture)

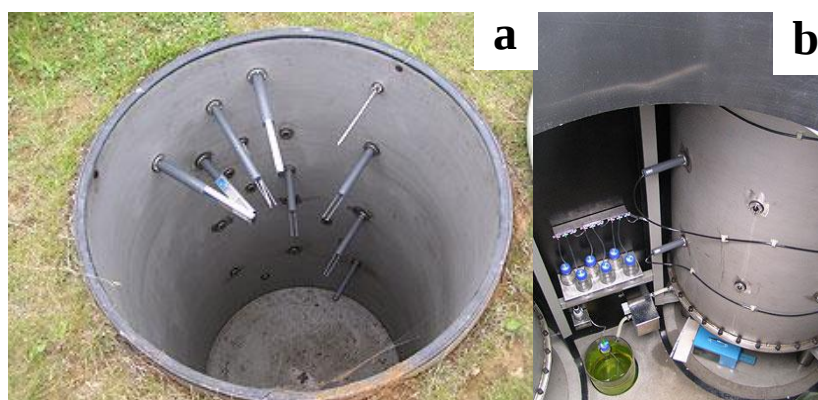


Figure 8 : Colonne lysimétrique avec les sondes de mesures (a : vue de la surface, b : vue de l'intérieur) (source : www.gisfi.fr)

2. Méthodes

2.1 Contamination de la terre *Ch* par du phénanthrène et du pyrène

La contamination artificielle a été effectuée par mélange d'une partie de la terre à polluer avec une solution de chloroforme contenant du phénanthrène (PHE) et du pyrène (PYR), puis évaporation du solvant et mélange avec le reste de terre (Leyval et Binet, 1998). Le chloroforme détruisant les membranes biologiques, et certains paramètres biologiques étant

suivis, seulement 10 % de la terre ont été contaminés et mélangés à la terre restante. Ainsi, 10 % du lot sont mélangés (rapport solide/solution 1 : 0,6) dans un cristalliseur en verre avec une solution de chloroforme avec des concentrations en PHE (Fluka, ref : 7740) et PYR (Sigma, ref : 82648) de $8,33 \text{ g.L}^{-1}$. Après mise en contact, le chloroforme s'évapore sous hotte à température ambiante. Les 10 % de la terre sont ainsi contaminés à hauteur de 5 g.kg^{-1} en phénanthrène et 5 g.kg^{-1} en pyrène. Les 10 % sont mélangés minutieusement avec les 90 % de la terre non contaminée afin d'obtenir un lot de terre contaminée à 500 mg.kg^{-1} en phénanthrène et 500 mg.kg^{-1} en pyrène. Lorsque le lot à contaminer dépasse 10 kg, plusieurs sous lots sont contaminés suivant le protocole décrit et sont ensuite soigneusement mélangés.

2.2 Protocole d'oxydation des terres contaminées

Les deux réactions d'oxydation utilisées ont été la réaction de Fenton et le persulfate activé. Pour la réaction de Fenton, l'oxydant (le peroxyde d'hydrogène, H_2O_2) a été mis en contact avec un catalyseur (sulfate de fer heptahydraté, $\text{FeSO}_4^{2-}, 7\text{H}_2\text{O}$). La réaction du persulfate activé a fait intervenir deux oxydants, le persulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$) et le peroxyde d'hydrogène, le dernier jouant le rôle d'activateur nécessaire à la formation des molécules radicalaires. Mis à part dans le chapitre 3, où le $\text{FeSO}_4^{2-}, 7\text{H}_2\text{O}$ a été introduit sous forme solide, dans les autres expérimentations, tous les oxydants et catalyseurs ont été utilisés en solution. Les protocoles précis, avec les concentrations, les volumes et les durées d'injections sont décrits en début de chaque chapitre expérimental. Pour l'oxydation des terres en laboratoires, nous avons utilisé les dispositifs décrits précédemment (Cf.2§1.3.1). Lorsque la quantité de terre à oxyder en laboratoire était supérieure à 30 kg (chapitre 5), l'oxydation chimique a été réalisée dans un malaxeur de grande taille ($\varnothing=70 \text{ cm}$, $H=60 \text{ cm}$) (Figure 7, c et d) à l'aide d'un système d'aspersion couplé à des pompes péristaltiques. Ce dispositif permet, à l'aide de bras rotatifs en acier, d'oxyder des terres de façon la plus homogène possible. L'oxydation *in situ* a été réalisée selon les mêmes principes et est détaillée dans le chapitre consacré aux essais de terrains.

2.3 Analyses physico-chimiques

Les analyses des terres et des eaux de percolations ont été réalisées par le Laboratoire d'Analyse des Sols (INRA, Arras), au LSE et au LIMOS selon les protocoles décrits ci-après. Le nombre de réplicats pour les différentes analyses est déterminée au début de chaque partie expérimentale.

2.3.1 Matrice solide

2.3.1.1 *Analyses chimiques*

Les échantillons de sols prélevés pour les différentes expérimentations ont été séchés à l'air, tamisés à 2 mm et caractérisés pour les paramètres suivants : pH_{eau} , carbone total (C_{tot}) et organique (C_{org}), azote total (N_{tot}), capacité d'échange cationique (CEC), bases échangeables (Calcium (Ca), Magnesium (Mg), Potassium (K)), phosphore assimilable (P_{Olsen}), calcaire total, éléments totaux (Al, Cd, Cr, Ca, Cu, K, Mg, Ni, P, Pb). Ces caractérisations n'ont pas été réalisées de manière systématique et les choix seront expliqués dans les différents chapitres.

Le pH_{eau} : une suspension de sol dans de l'eau est préparée avec un rapport volumique 1/5. La suspension est agitée 5 mn et laissée à l'équilibre pendant 1 h avant mesure.

C_{tot} , C_{org} , N_{tot} , CEC, bases échangeables et P_{Olsen} : Mises à part les données sur le C_{org} et N_{tot} du chapitre 4 qui ont fait l'objet d'un protocole particulier (Cf. Annexe I), les mesures ont été effectuées selon les normes respectives NF 10694, NF X 31-130, NF ISO 11263. Par ailleurs, des difficultés ont été rencontrées lors du broyage des échantillons contenant des boues de papeteries fraîches, ce qui a pu entraîner des prises des essais plus hétérogènes.

Dosage des éléments totaux : les éléments ont été mis en solution par fusion alcaline selon la norme NF ISO 14869-2. Un mélange constitué de 1 g de fondant (mélange de métaborate et de tétraborate de lithium, $LiBO_2/LiB_4O_7$ 80%/20%, SpectroFlux) et de 100 mg d'échantillon de sol finement broyé est préparé. Le produit vitreux obtenu après chauffage à 100°C est dissout dans de l'acide nitrique dilué. Le dosage des éléments a été effectué ensuite en ICP-AES au LIMOS.

2.3.1.2 *Analyse physique*

Mesure des humidités caractéristiques des terres (NF ISO 11464, X31-412) : La mesure consiste à soumettre des échantillons de sol préalablement saturés en eau à différentes pressions dans un récipient hermétiquement fermé où l'eau peut être évacuée par une membrane poreuse. Les mesures ont été réalisées pour déterminer la capacité au champ à pF 2 (0,1 bar) et le point de flétrissement à pF 15 (4,2 bar). Les mesures ont été effectuées au LSE sur des échantillons de sol tamisé à 5 mm.

Granulodensimétrie : Les analyses granulométriques ont été réalisées sans décarbonatation par le laboratoire d'analyse des sols de l'INRA selon la norme NF X 31-107.

Lames minces : Les lames minces de sols (chapitre 5) ont été réalisées par le Service Commun des Matériaux Friables (Fédération de Recherche Eau Sol Terre, Nancy). Dans un premier temps l'échantillon de terre est prélevé *in situ* de manière non destructive à l'aide d'une boîte de Kubiena (60 x 50 x 90 mm). Le protocole consiste ensuite à déshydrater l'échantillon avant de l'imprégner d'une résine liquide polyester (NOSORDINE 2983, PLEASE). Par la suite le bloc de résine est découpé en fine lame et poncé à l'aide de papier abrasif afin que l'épaisseur de la lame ne dépasse pas 50 μm (Note technique n°31, LSE).

Quantification de la porosité : la porosité a été mesurée, en collaboration avec N. Salifou, sur les images des lames minces préalablement scannées selon un protocole en cours de développement et de validation. Le protocole fait intervenir un traitement d'image numérique permettant de déterminer la porosité supérieure à 20 μm (Nouhou Salifou, *communication personnelle*).

2.3.1.3 Analyses des teneurs en HAP

Au moment du prélèvement, la terre est tamisée à 5 mm et homogénéisée. Ensuite, un échantillon de terre (>10 grammes) est congelé à -20°C . Il est ensuite lyophilisé (Bioblock, Christ alpha 1,2) avant broyage au broyeur à billes (Retsch, MM200) à une fréquence de 1200 c/s pendant 5 mn. L'extraction des HAP a été réalisée à l'aide d'un extracteur ASE (Accelerated Solvent Extraction, ASE 200, Dionex). Le principe est basé sur l'injection d'un solvant organique à haute pression (138 bars) et à haute température (100°C) à travers une cellule contenant la terre à extraire (Figure 9). Le solvant d'extraction utilisé est un mélange dichlorométhane à 100 % et d'acétone à 100 % en proportions équivalentes (50/50). Le protocole est adapté de Monsérié et al. (2009). L'échantillon (1g) est placé dans une cellule avec 1g de sulfate de sodium anhydre, 1g de Florisil et des billes de verre selon le schéma présenté dans la figure 9. Le sulfate de sodium anhydre permet de capter l'eau résiduelle. Le Florisil® (Sigma-Aldrich) est un silicate de magnésium captant les macromolécules autres que les HAP et purifiant l'extrait. Les filtres empêchent la dispersion du sol. Les billes de verre permettent de remplir le volume de cellule restant afin de réduire la quantité de solvant injecté.

Les 16 HAP sont analysés dans l'extrait par HPLC. Le solvant d'élution pour le dosage en HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) étant l'acétonitrile il a fallu remplacer le solvant d'extraction. Pour cela une première évaporation du mélange dichlorométhane/acétone est réalisée sous flux d'azote à l'aide d'un TurboVap LV (Caliper sciences). Une quantité d'acétonitrile connue est ajoutée, et une deuxième évaporation est

effectuée afin d'éliminer le dichlorométhane restant. La quantité d'acétonitrile utilisée pour la dilution de l'extrait est calculée à partir des mesures de masses effectuées à chaque étape. Les extraits sont ensuite conditionnés dans des flacons HPLC après filtration à 0,22 µm avec des filtres en membranes PES (polyéthersulfurone). Les HAP sont analysés sur une ligne HPLC (Dionex, Ultimate 300 RFSD) dotée d'une colonne Prosphère (Alltech).

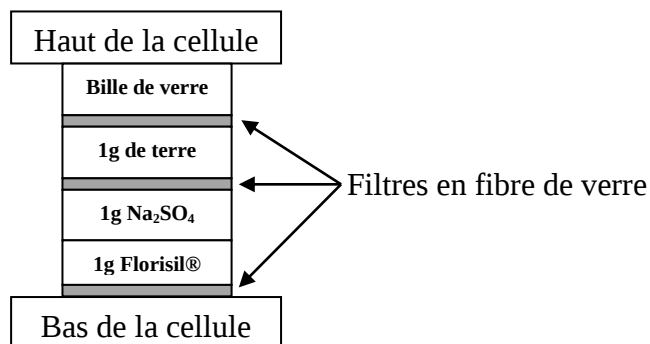


Figure 9 : Représentation schématique du remplissage d'une cellule d'ASE

2.3.2 Matrice liquide

Avant chaque analyse, les échantillons liquides provenant des eaux de percolations des colonnes ou des lysimètres, ainsi que les eaux provenant des bougies poreuses ont été filtrés à 0,45 µm.

2.3.2.1 *Analyse des cations et anions majeurs*

Les cations (NH_4^+ , Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+}) et les anions (NO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-}) ont été dosés par chromatographie ionique (IC 25, Dionex) au LSE. Des dilutions (10 ou 100 fois) ont souvent été nécessaires pour les dosages, principalement en raison des concentrations très élevées en ions sulfates et sodiques. Ces dilutions ont parfois induit une perte de sensibilité dans la quantification de certains ions. Les chromatogrammes ont été analysés à l'aide du logiciel chroméléon (Dionex, version 6.4).

2.3.2.2 *Analyse du carbone organique dissous (COD)*

Le carbone a été évalué sur des échantillons d'eau préalablement filtrés à 0,45 µm et dilués au $1/10^{\text{ème}}$. L'analyse a été réalisée à la station expérimentale du GISFI à Homécourt à l'aide d'un spectromètre par mesure de l'absorbance à 254 nm. Un facteur de correction de 45.934 (facteur de correction préalablement calculé entre les mesures d'absorbances et les mesures

obtenues à l'aide d'un COD Analyzer par le Service d'Analyse des Roches et de Minéraux, Nancy (SARM) a ensuite été appliqué afin d'obtenir la teneur en COD.

2.3.2.3 *Analyse des éléments en traces métalliques*

Les échantillons d'eau provenant des dispositifs lysimétriques ou colonnes ont été acidifiés à 1 % avec de l'acide nitrique à 69 % (Prolabo, VWR). Le dosage a été effectué en ICP-AES au LIMOS pour les éléments suivants : Al, Fe, Cd, Pb, Ni, Co, Cr, Cu, Mn, P, Si, Zn. Des dilutions ont été nécessaires car les fortes concentrations en ions perturbaient le dosage de certains éléments.

2.3.2.4 *Test de toxicité*

Le biotest de toxicité réalisé est le test Microtox®, selon la norme NF ISO 11348-3 (Microtox Analyzer M500, Azur environmental). Ce test mesure l'effet inhibiteur d'un échantillon d'eau sur l'émission de lumière par une bactérie luminescente *Aliivibrio fischeri*. Il est régulièrement utilisé dans les études écotoxicologiques afin de d'évaluer les contaminations organiques ou métalliques (Boluda et al., 2001).

2.4 **Analyses biologiques et microbiologiques**

2.4.1 Mesure de la minéralisation

La minéralisation a été évaluée en dosant le dégagement de CO₂ par spectrophotométrie infra-rouge (Quantin et al., 2005). Un échantillon de sol (20 g) est disposé dans un flacon de 150 ml avec un septum en Téflon. Toutes les humidités sont ajustées à 70 % de la capacité de rétention en eau des différents échantillons afin que les fluctuations observées ne soient le reflet que de l'activité de la microflore et de la disponibilité des substrats. Les flacons sont incubés à l'obscurité à 24°C. Au temps initial de la mise en place de l'échantillon dans le flacon, un prélèvement de 5 ml d'air issu du flacon sérum est réalisé avec une seringue à travers le septum en téflon et est injecté dans un spectrophotomètre (Binos). L'absorption est mesurée à 2325,6 cm⁻¹. Les prélèvements suivants sont réalisés à divers intervalles en fonction de l'expérimentation. Dans la thèse, la minéralisation a été évaluée de 2 façons :

Dans le chapitre 3, les incubations ont été réalisées sur 6 semaines, et les mesures de CO₂ effectuées 5 j par semaine pendant les 3 premières semaines, puis une fois par semaine pour les 3 dernières semaines. Les flacons sérum ont été aérés toutes les semaines pendant 1 h. Les courbes de dégagement de CO₂ cumulé en fonction du temps ont été tracées. Dans le chapitre 4, la minéralisation a été mesurée à la mise en place de l'échantillon dans le flacon et

24 heures après. La valeur de dégagement en CO₂ obtenue a été considérée comme étant le reflet d'une activité respiratoire potentielle pour une durée donnée. Les données sont exprimées soit en µmol de CO₂ dégagé par gramme de sol en fonction du temps, soit en équivalent carbone (C-CO₂) par gramme de sol et par jour.

2.4.2 Mesure des activités enzymatiques

La mesure des activités des microorganismes dans les sols peut être un indicateur pertinent du fonctionnement de ceux-ci. Pour cela, plusieurs activités enzymatiques, reflétant des mécanismes métaboliques microbiens particuliers, ont été mesurées. Toutes les activités enzymatiques ont été mesurées sur une solution de sol frais.

2.4.2.1 *Activité des hydrolases*

L'activité des hydrolases a été dosée par mesure de la dégradation de la fluorescéine diacétate (FDA). Ce substrat pouvant être hydrolysé par un grand nombre d'enzymes comme les protéases, les estérases, les lipases, sa dégradation permet d'avoir une mesure des activités enzymatiques globales dans les sols (Green et al., 2006).

Le protocole de mesure de cette activité a été adapté de Adam et Duncan (2001) (Cf. Annexe II). Le principe repose sur la mise en contact de 1 g de terre humide avec 200 µl de fluorescéine diacétate (Ref : F7378, Sigma-Aldrich) à 1 mg.ml⁻¹ dans 15 ml de tampon phosphate 60 mM. L'excès de substrat a été déterminé par des tests préliminaires. Un témoin est préparé sans sol afin d'évaluer la fluorescence non induite par le contact avec le sol. Le mélange est incubé 1 h à 28°C et à l'obscurité, à une fréquence d'agitation rotative de 100 rpm. Après incubation, la réaction est arrêtée en ajoutant dans un eppendorf de 2 ml, 1 ml de la solution incubée et 1 ml d'acétone à 100 %. On centrifuge à 10000 rpm et 3 réplicats de 200 µl sont déposés dans une microplaque de 96 puits à fond noir (Greiner bio-one, Fluotrac 600). La fluorescence est lue à l'aide d'un spectrofluorimètre-flx Xenius (SP2000, SAFAS) ($\lambda_{\text{émission}} = 523 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{excitation}} = 494 \text{ nm}$). La gamme étalon est réalisée à l'aide d'une solution de fluorescéine à 100 µg.ml⁻¹ (Ref : 46955, Sigma-Aldrich).

2.4.2.2 *Activités cellulases et peptidases*

Les mesures des activités cellulases et peptidases ont été adaptées de la norme XP ISO/TS 22939 et de (Marx et al., 2001). L'activité des cellobiohydrolases a été dosée par mesure de la dégradation du substrat 4-MUF-β-d-cellobioside. Le fluorochrome associé est le

méthylumbelliférone (MUF). Les cellobiohydrolases sont représentatives d'un potentiel de dégradation de la cellulose et sont associées au cycle du C (Afnor, 2010).

L'activité des leucines aminopeptidases a été dosée par mesure de la dégradation du substrat L-Leucine-AMC. Le fluorochrome associé est le 7-amino-méthylcoumarin (AMC). La leucine aminopeptidase est une enzyme qui coupe l'acide aminé terminal des protéines, et intervient donc dans la dégradation des oligopeptides. C'est une enzyme associée au cycle de l'N (Afnor, 2010).

Des extractions de sol ont été réalisées, en disposant 3 g de sol frais dans 40 ml de tampon d'extraction potassium-phosphate/acétate à 50 mM à pH=7 (Cf. Annexe Z) dans des tubes en plastique de 50 ml. Les tubes sont ensuite agités à 100 rpm, 1 fois 10 mn puis 5 mn. Une sonication des tubes est réalisée entre les agitations pendant 1 mn à 50 J.s⁻¹ afin de favoriser la libération des enzymes dans la solution du sol. Après agitation, 50 µl de la solution de sol sont déposés dans une microplaque à fond noir. Une solution mixte constituée du tampon d'extraction potassium-phosphate/acétate et d'un tampon MES (à 0,1 M pour les cellobiohydrolases) ou d'un tampon TRIZMA (0,05 M pour l'aminopeptidase) dans des proportions 1 : 2 est préparée. On ajoute ensuite 150 µl de cette solution mixte dans chaque puits de la microplaque contenant la solution du sol. Enfin, 50 µl de substrat (MUF-β-d-cellobioside (Ref : 6018, sigma) ou L-Leucine-AMC (Ref : 61888, sigma)) à 1 mM sont ajoutés. La microplaque est ensuite agitée pendant 1 mn à 1000 rpm (Eppendorf Mixmate) afin de mélanger correctement les différentes solutions. Des blancs sont réalisés avec 50 µl de substrat et 200 µl de la solution tampon mixte. La lecture se fait après 15 s de décantation par spectrofluorimètre-flx Xenius (SP2000, SAFAS).

Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission en fonction des fluorochromes sont les suivantes :

- MUF : $\lambda_{\text{émission}} = 330 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{excitation}} = 450 \text{ nm}$
- AMC : $\lambda_{\text{émission}} = 342 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{excitation}} = 440 \text{ nm}$

Les microplaques sont ensuite mises en incubation à l'obscurité à 28°C et lues toutes les 90 mn.

Les gammes étalon sont réalisées dans les solutions du sol à partir des fluorochromes MUF et AMC. Les mêmes volumes de solution sont disposés dans la microplaque, sauf le substrat qui est remplacé par la solution de fluorochrome. Les activités enzymatiques sont calculées à partir des pentes des essais et des pentes de la gamme étalon. Les facteurs de dilution sont pris

en compte pour le calcul final. Le protocole détaillé ainsi que la description de tous les produits utilisés se situent en annexe II.

2.4.3 Quantification des bactéries cultivables

Le sol frais est mis en suspension (≈ 1 g) dans 10 ml d'eau ultra pure stérile. Des billes de verre sont ajoutées (≈ 6 g, $\varnothing = 2$ mm) afin de faciliter l'extraction des bactéries du sol. Après une heure d'agitation, différentes dilutions successives sont réalisées (10^{-2} à 10^{-7}) dans une solution NaCl (0,85 %). Par la suite, 25 μ l des différentes dilutions sont ajoutées à 200 μ l d'une solution nutritive (Nutrient growth, 1 g.L⁻¹) dans des microplaques à 96 puits. Quarante puits sont utilisés par dilution. Les microplaques sont ensuite incubées pendant 48 h à 28°C. L'absorbance à 620 nm est mesurée après incubation et le nombre le plus probable (MPN) de bactéries par microlitre est calculé à l'aide d'un logiciel utilisant les tables de McCrady (Binet et al., 2000).

2.4.4 Quantification des bactéries et des champignons par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

2.4.4.1 *Extraction et amplification de l'ADN*

Les extractions d'ADN ont été réalisées à partir du kit d'extraction FastDNA[®] Spin kit pour les sols (MP Biomedicals). Les extractions ont été réalisées sur les échantillons congelés (≈ 1 g) au moment du prélèvement.

L'ADN extrait a été amplifié par la réaction de PCR qui, basée sur une succession de réplifications d'un fragment double brin d'ADN, permet d'obtenir d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. Les réactions ont été réalisées à l'aide de deux amorces oligonucléotidiques permettant de définir la séquence d'ADN à amplifier. La synthèse enzymatique des nouveaux brins a été réalisée dans le milieu réactionnel décrit dans le tableau 9 et contrôlée par des transitions de température répétées de manières cycliques 35 fois (Tableau 9) à l'aide d'un thermocycleur Icyclor MyIQ (BioRad). Seul l'amplification de l'ADN bactérien a été réalisée afin d'analyser ultérieurement la structure des communautés bactériennes.

Tableau 9 : Conditions de PCR pour amplifier les bactéries

		cycle	temps	température
dénaturation		1	5 min	94°C
amplification	dénaturation	35	30s	94°C
	hybridation		45s	58°C
	élongation		45s	72°C
élongation finale		1	7	72°C

Tableau 10 : Composition du milieu réactionnel utilisé pour amplifier l'ADNr 16S bactérien

Produit	Concentration	Volume (µl)	Fournisseur
Tampon MgCl₂	10X	5	Fermentas
MgCl₂	25 mM	2	Fermentas
dNTP (désoxyribonucléotides)	10 mM	1	Fermentas
Amorce 1401R	100 pmol/µL	1,5	Eurofins MWG Operon
Amorce 968 F-GC	100 pmol/µL	1,5	Eurofins MWG Operon
Bovine Serum Albumin (BSA)	3 %	0,5	Sigma
Dimethyl sulfoxyde (DMSO)	100 %	0,2	Prolabo
Taq Polymérase	5U	0,2	Fermentas
Eau ultra pure stérile	-	Qsp 50	-
ADN	-	2	-

2.4.4.2 *Quantification de l'ADN bactérien et fongique par PCR en temps réel*

La PCR en temps réel utilise le principe de base de la PCR classique (avec pour différence une amplification mesurée tout au long de la réaction). Après extraction, l'ADN est amplifié à l'aide d'un mélange réactionnel (Tableau 11) et d'un thermocycleur couplé à un spectrofluorimètre (Icycler MyIQ BioRad). A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent (SYBR GREEN, Biorad) dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité de copies produites. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et permet donc la quantification de l'ADN.

Tableau 11 : Composition du mélange réactionnel utilisé pour l'amplification par PCR en temps réel

Produit	Concentration	Volume (µl/tube)	Fournisseur
iQ SYBR GREEN SuperMix	-	10	BioRad
Amorce F	10µM	0,8	Eurofins MGW Operon
Amorce R	10µM	0,4	Eurofins MGW Operon
BSA	3 %	0,2	Sigma
DMSO	100 %	0,2	Prolabo
T4 gp32	-	0,08	MP Biomedicals
H2O stérile	-	qsp 19	-
ADN	-	1	-

Les amorces utilisées pour l'amplification des brins d'ADN des différentes communautés sont résumées dans le tableau 12. L'amplification d'un fragment du gène codant l'ARNr 16S et l'ARNr 18S permet d'évaluer la densité bactérienne et fongique (Cébron et al., 2011). Pour les communautés dégradant les HAP, les amorces utilisées sont spécifiques de bactéries Gram positives ou Gram négatives, et amplifient un gène codant pour une HAP dioxygénase, enzyme intervenant dans les premières étapes de la dégradation des HAP (Cébron et al., 2009).

Une gamme de calibration a été effectuée à l'aide d'échantillons standards de concentrations en copie de gène connues. Les conditions d'amplification pour les PCR temps réel sont résumées dans la figure 10, les différentes températures d'hybridation étant référencées dans le tableau 12.

Tableau 12 : Amorces et taille des fragments pour les différents gènes amplifiés

Populations	Gène cible	Noms des amorces	Taille du fragment	Température hybridation (Thy)	References
Champignons	18s RDNA	Fung5F	550 pb	50°C	Lueders <i>et al.</i> , 2004
		FF390R			
Bactéries	16 sRDNA	968F	433 pb	56°C	Feslke <i>et al.</i> , 1998
		1401R			
HAP dégradantes Gram positive	Gram positive PAH-RHD α	NDOGP1F	290 pb	56°C	Cebon <i>et al.</i> 2008
		NDOGP1R			
HAP dégradantes Gram négative	Gram négative PAH-RHD α	NDOGN3F	306 pb	54°C	Cebon <i>et al.</i> 2008
		NDOGN3R			

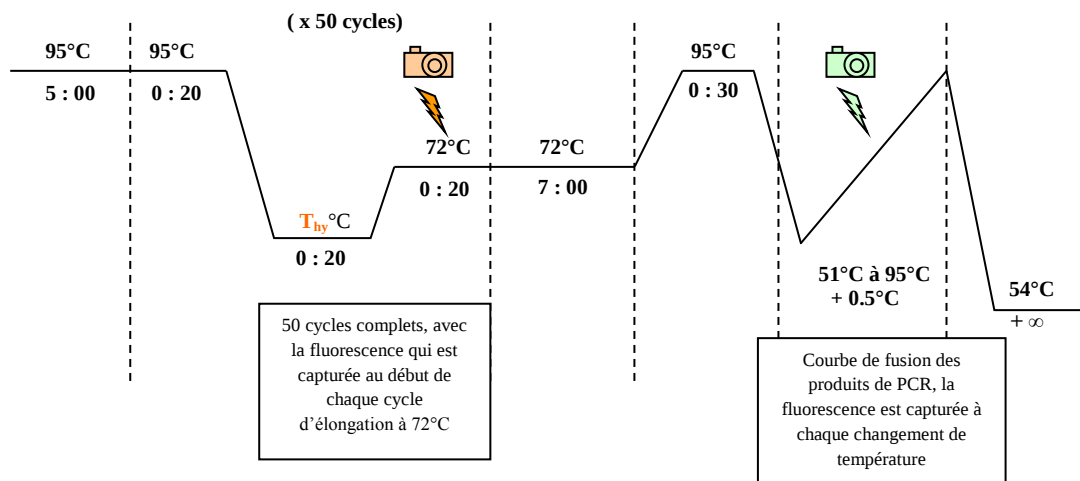


Figure 10 : Représentation schématique de conditions thermiques utilisées pour les PCR en temps réelles. Températures d'hybridation (T_{hy}) déterminées en fonction des communautés analysées

2.4.4.3 *Analyse de la structure des communautés bactériennes par TTGE (Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis)*

La TTGE est une technique qui permet de séparer, sur un gel d'acrylamide, les brins d'ADN de même taille préalablement amplifiés par la PCR (Cf.2§3.3.1). La composition du gel utilisé et les conditions de migration sont issues de la thèse de Norini (2007) (Tableau 13). La quantité d'ADN déposée (de 10 à 40 μ l) est dépendante de la quantité amplifiée par PCR.

Préparation du gel d'acrylamide et dépôt des échantillons

L'urée est dissoute dans 20 ml d'eau distillée. Par la suite, le glycérol, le tampon TAE 1,25x et la solution acrylamide/bisacrylamide sont ajoutés. Après avoir filtré le mélange à 0,45 μ m, la solution reçoit du TEMED et de l'APS afin de catalyser la réaction de polymérisation ($\approx$ 1h). La mise en place du gel dans le système électrophorèse suit les recommandations du constructeur (Dcode, Universal Mutation Detection System, Biorad). Le gel est ensuite placé dans un bain de tampon TAE 1,25x. Les échantillons d'ADN (issus de la PCR 2.3.3.1) sont ensuite déposés dans les puits après un mélange avec un tampon de charge (tampon de charge 2x : bleu de bromophénol à 0.5%, cynaol de xylène à 0.5 % et glycérol à 70 %). Les conditions de migrations sont présentées dans le Tableau . Après migration complète des échantillons, le gel est révélé après un bain de 15 mn dans du bromure d'éthidium (BET, 0,5 mg.l⁻¹) et observés sous lumière UV (Biorad, Transilluminateur Geldoc). L'analyse du gel est réalisée à l'aide d'un logiciel informatique (Quantity one, version 4.6.1). L'analyse

repose sur l'intensité et le nombre de bandes observées sur les gels et sur une analyse de données par ACP.

Tableau 13 : Composition du gel utilisé en TTGE pour séparer les fragments d'ADN bactérien et conditions de migration des fragments d'ADN

	concentration finale	quantité
acrylamide/bisacrylamide 30:1 w:v	6%	6 ml
urée	7,0 M	12,60 g
glycérol	0,20 % v/v	0,60 mL
TAE	1,25 x	0,75 ml
APS	10%	0,30 ml
TEMED		0,030 ml
eau distillée		qsp 30 ml
température initiale	57°C	
température finale	67°C	
incrément de température	2°C.h ⁻¹	
voltage	130 V	

2.4.5 Calcul des indices de diversité

La diversité spécifique bactérienne a été évaluée à l'aide de l'indice de Shannon-Weaver :

$$H' = - \sum_{j=1}^S \left(\frac{N_i}{N} \times \ln \left(\frac{N_i}{N} \right) \right) \text{ où } N_i \text{ représente le nombre d'individus d'une espèce donnée, } i \text{ allant de } 1 \text{ à } S; S \text{ représente le nombre total d'espèces et } N \text{ le nombre total d'individus.}$$

H' est minimal ($H' = 0$) si tous les individus du peuplement appartiennent à une seule espèce ou si dans un peuplement, chaque espèce est représentée par un seul individu. Ainsi, l'indice est maximal si tous les individus sont répartis d'une façon équitable dans toutes les espèces présentes. L'indice de Shannon-Weaver varie directement en fonction du nombre d'espèces, les espèces rares ayant moins de poids que les espèces communes (Hill et al., 2003). Cet indice a été calculé à partir des données de TTGE (Cébron et al., 2011), même si cette technique ne renseigne pas sur la diversité exhaustive mais uniquement sur les espèces majoritaires.

2.4.6 Mesures de germination et de croissance des plantes

2.4.6.1 *Choix des plantes*

Les plantes utilisées ont été choisies pour obtenir une croissance rapide et un couvert végétal dense. Le choix a porté sur une Poacée, le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.). Cette plante se développe relativement vite et est peu sensible à la présence de HAP (Smith et al., 2006). Lorsque des essais de germination et de croissance à court terme ont été effectués, seul le ray-

grass a été utilisé. Dans les expérimentations de refonctionnalisation en laboratoire et sur le terrain, une co-culture de ray-grass avec une Fabacée fixatrice d'azote atmosphérique, le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.) a été employée.

2.4.6.2 *Tests de germination et croissance à court terme*

Pour tous les tests, la terre a été humidifiée avec de l'eau déminéralisée à hauteur de 70 % de sa capacité de rétention en eau et l'humidité a été ajustée quotidiennement. Les pots ont été placés en phytotron avec une photopériode 16 h jour/8 h nuit, des températures respectives de 24°C/20°C, et une intensité lumineuse de 250 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-2}$. Le nombre de graines germées était relevé chaque jour. Les parties aériennes et racinaires des plantes ont été récoltées à la fin de l'expérimentation, lavées délicatement sur un tamis et séchées à l'étuve à 105°C pendant 24 h avant d'être pesées.

En fonction des expérimentations, différents protocoles ont été utilisés :

Dans le chapitre 3, 100 g de terre ont été placés dans des pots de 100 cm³. Vingt graines ont été semées dans chaque pot et seules 5 plantules de même stade ont été laissées (après 5 jours) pour les mesures de croissance, qui ont été réalisées après une période de 30 jours.

Dans le chapitre 5, 10 graines de ray-grass et 5 graines de trèfle blanc ont été semées dans les pots contenant 750 g de terre amendée ou non. Cinq plantules de ray-grass et 2 plantules de trèfle ont été laissées pour les mesures de croissance, qui ont été effectuées au bout de trois mois. Dans cette expérimentation, la densité racinaire étant forte dans les pots, il s'est avéré très difficile de séparer les racines de la terre sans procéder à un lavage à l'eau sur tamis. C'est pourquoi un lavage à l'eau a été appliqué sur une moitié (préalablement pesée) du pot afin de récupérer la biomasse racinaire, tandis que l'autre moitié a servi à récupérer la terre pour les différentes analyses. La biomasse racinaire a ensuite été ramenée à la totalité de la masse de terre. Les biomasses des parties aériennes et racinaires du ray-grass et du trèfle n'ont pas été évaluées séparément.

Dans le chapitre 6, des mesures de germination et de croissance ont été réalisées sur une petite quantité de terre prélevée lors du carottage de la colonne de sol des lysimètres. Les tests de germination et de croissance ont été réalisés sur 20 g de terre, avec 10 graines de ray-grass pendant 2 semaines dans des petits pots de 20 cm³. Par ailleurs, des mesures de croissance ont aussi été effectuées sur les plantes issues du semis réalisés sur les lysimètres au moment de la refonctionnalisation. La biomasse a été récoltée au bout de 4 et 5 mois, en réalisant une coupe à 5 cm du sol.

2.5 Analyses statistiques

Différents tests statistiques ont été réalisés sur les données expérimentales à l'aide du logiciel XLStats 2008. Les comparaisons à un seul niveau ont été réalisées par une analyse de variance de type ANOVA ($\alpha = 5\%$) dans le cas où l'égalité des variances par test de Levene ($\alpha = 5\%$) et la normalité des résidus par test de Shapiro-Wilk ($\alpha = 5\%$) étaient vérifiées. Dans le cas contraire, un test non paramétrique Kruskal-Wallis a été appliqué ($\alpha = 5\%$). Les comparaisons multiples ont été effectuées dans le cas de l'ANOVA par un test de Tukey ($\alpha = 5\%$) avec correction de Bonferroni, et un test de Dunn dans le cas des tests par Kruskal-Wallis. Pour les comparaisons à deux niveaux de comparaisons (chapitre 5), une ANOVA à 2 facteurs prenant en compte l'effet modalité et l'effet temps a été appliquée lorsque l'égalité des variances par test de Levene ($\alpha = 5\%$) et la normalité des résidus par test de Shapiro-Wilk ($\alpha = 5\%$) étaient vérifiées. Pour les analyses portant sur le nombre de copies de gène, les données ont été transformées en log10 avant d'appliquer les tests statistiques. Les résultats issus des tests statistiques ont été présentés de deux manières, soit sur les graphiques par l'intermédiaire de signes ou de lettres, soit sous forme de tableaux quand le nombre de comparaison était trop élevé.

Certaines données ont fait l'objet d'une analyse en composantes principales (ACP) (Pearson, $\alpha = 5\%$) à l'aide du logiciel XLStats 2008. Afin de recréer des groupes sur la base de tests statistiques, une analyse par classification non supervisée de type k-means a été utilisée (500 itérations). Cette classification permet de diviser un ensemble de données en K groupes sur la base de la distance minimale mesurée entre les observations et les K groupes et donc de rassembler les observations en plusieurs groupes.

Pour construire graphiquement les données en fonction la profondeur ou au cours du temps, les différents points ont été reliés. Si théoriquement cela n'est pas concevable cela a permis une meilleur visualisation des évolutions de certains paramètres.

2.6 Proposition d'un indice de qualité

La qualité des sols est couramment définie à l'aide d'indices (Andrew et al., 2004; Glover et al., 2000; Kang et al., 2005; Lee et al., 2006; Mastro et al., 2007), cependant, ces données sont la plupart du temps acquises dans le cadre de la gestion des sols agricoles et la pollution n'est pas prise en compte. A partir de ces travaux, et dans l'objectif de synthétiser les résultats

obtenus lors de cette thèse, trois indices, représentant chacun divers paramètres ont été calculés :

- **l'activité biologique** : nombre de copies de gène 16S, activité FDA, respiration (CO₂)
- **les paramètres physico-chimiques** : C_{org}, P_{Olsen}, pH, CEC, K_{échangeable}, C/N
- **la teneur en polluant** : concentration en HAP

Afin de calculer ces différents indices, il a été nécessaire de normaliser les valeurs mesurées pour les différents paramètres. Les paramètres mesurés pour l'activité biologique et les paramètres physico-chimiques suivent les courbes théoriques « more is better » (Masto et al., 2007), signifiant que, plus la valeur mesurée est importante, plus le score qui lui est attribué est important. Seul le pH ne suit pas cette loi et suit une courbe théorique « optimum » (Masto et al., 2007). Pour l'ensemble des expériences réalisées dans la thèse, le pH ne dépassant pas les valeurs de 7.5, il a été décidé de le considérer comme un paramètre suivant une courbe « more is better », en considérant que pour un pH inférieur à 4.5, aucun score n'est attribué pour ce paramètre (Glover et al., 2000 ; Lee et al., 2006) . La normalisation des valeurs mesurées a été effectuée à l'aide de la formule suivante:

$$I_{ij} = \frac{A_{ij}}{Th(\sum i)_j} \text{ où } I_{ij} \text{ est la valeur indice du paramètre } j \text{ mesuré dans la modalité } i, A_{ij} \text{ est}$$

la valeur mesurée du paramètre j dans la modalité i et Th_{ij} la moyenne arithmétique des valeurs mesurées dans toutes les modalités ($\sum i$) de l'expérience, pour le paramètre j . Cette moyenne arithmétique est considérée comme étant la valeur seuil (Kang et al., 2005). Cette normalisation n'est réalisable qu'au sein d'une expérience, et l'ensemble des valeurs seuils (Th_{ij}) a été réévaluée pour chaque expérience. Le score lié à la densité bactérienne a été calculé à partir du log du nombre de copies de gène d'ADNr 16S. Pour calculer la valeur indice du C/N et afin qu'un score plus élevé soit accordé à un rapport C/N faible, le rapport $\frac{1}{C/N}$ a été utilisé.

Ainsi, les différents indices ont été calculés à l'aide des formules suivantes :

Indice des paramètres physico-chimiques (IPC) et de l'activité biologique (IAB):

I_{PCi} ou $I_{ABi} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n I_{ij}$ où n est le nombre de paramètre utilisés et I_{ij} est la valeur indice des n paramètres considérés. Plus le score est important, plus l'activité biologique est considérée comme élevée et plus les conditions physico-chimiques sont considérées comme étant favorables en termes de réserve de disponibilité de nutriments et de conditions de vie.

Indice sur la teneur en HAP (I_{HAP}):

$$I_{HAP} = 1 - \frac{[HAP]}{[HAP]_{initiale}}$$

Pour cet indice, le score a été calculé par rapport à la concentration initiale en HAP, qui représente la valeur maximale pouvant être atteinte pour ce paramètre. Un score élevé représente ainsi une faible teneur en polluant par rapport à la teneur initiale, donc une forte dissipation.

Un indice global (I_G) a été calculé selon la méthode de Kang et al., (2007), qui permet de calculer l'aire du triangle formé par les 3 « pôles » :

$$I_G = \frac{\sqrt{3}}{4} (I_{PC} * I_{HAP} + I_{PC} * I_{AB} + I_{HAP} * I_{AB})$$

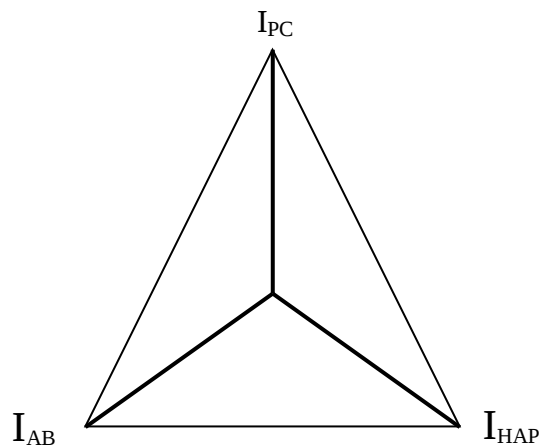


Figure 11 : Mesure de l'indice global à l'aide la surface du triangle adapté de Kang et al., (2007). Le triangle est tracé à partir d'un point d'origine O et la longueur des segments représente le score de l'indice mesuré. Les extrémités des segments sont ensuite reliées afin de représenter le triangle dont l'aire représente l'indice global (I_G)

Dans ce travail, aucun coefficient n'a été attribué aux différents indices. Cependant, il est possible d'imaginer qu'en fonction des objectifs à atteindre des coefficients puissent être appliqués à certains indices (I_{AB}, I_{PC} ou I_{HAP}).

CHAPITRE 3 – L’oxydation par la réaction de Fenton en conditions insaturées affecte les propriétés physico-chimiques et biologiques d’une terre contaminée par des HAP

1. Introduction

Comme l’a souligné la synthèse bibliographique, peu de travaux dédiés à la remédiation des sols contaminés s’intéressent à l’impact du traitement sur les propriétés des sols. Parmi les techniques de rémédiation par oxydation chimique, la réaction de Fenton est souvent utilisée pour des polluants comme les hydrocarbures pétroliers, les BTEX et HAP dans les sols et les nappes (Rivas, 2006). L’oxydation par Fenton est souvent associée à un ajout d’acide car la réaction est optimale à pH acide, mais l’oxydation par réaction de Fenton modifiée à un pH neutre avec ajout d’ions ferriques a aussi été décrite (Nam et al., 2001). Peu d’études ont ainsi étudié l’impact de l’oxydation par la réaction de Fenton sur les paramètres et fonctions du sol. Seule l’étude menée par Sirguy et al. (2008) sur des terres oxydées en conditions saturées, a montré que les traitements par oxydation chimique pouvaient induire des effets néfastes sur les fonctions de support de végétation du sol. Il a toutefois été montré que l’oxydation chimique des HAP pouvait affecter les populations microbiennes, les teneurs en carbone organique, et en phosphore dans le sol (Leifeld et Kögel-Knabner, 2001 ; Palmroth et al., 2006a ; Sirguy et al., 2008). L’essentiel des travaux réalisés sur l’oxydation chimique a été effectué en batch (Yap et al., 2011) en conditions saturées avec des ratios liquides/solides supérieurs à 1.

Ce chapitre avait pour objectif d’évaluer l’impact d’un traitement d’oxydation chimique par réaction de Fenton sur certains paramètres physico-chimiques et biologiques du sol. Comme les sols de surface sont principalement non saturés en eau, l’oxydation a été réalisée en conditions non saturées. Pour éviter un fort impact sur l’activité biologique du sol lié à un milieu très acide, la réaction de Fenton a été appliquée sans ajout d’acide. L’oxydation a été réalisée avec deux doses d’oxydants sur une terre de friche industrielle contaminée en HAP, la terre de la friche NM (Cf.2§1.1.2). Les teneurs en HAP, les paramètres physico-chimiques

(pH, C_{org} , N_{tot} , P_{Olsen}), la densité microbienne, l'activité microbienne ont été mesurés, et des tests de germination et de croissance du ray-grass ont été effectués.

Ce travail a fait l'objet d'une publication publiée dans Chemosphere (Laurent et al., 2012),.

2. Matériel et méthodes

2.1 Protocole d'oxydation chimique

Deux doses d'oxydants ont été ajoutées, correspondant à 6,5 et 65 g kg⁻¹ de peroxyde d'hydrogène à 100% par kilo de sol. La plus faible dose correspondait à la dose de référence établie par Lemaire (2011), sur la base d'une étude comparative entre différents oxydants, et calculée comme la quantité d'oxydant théorique nécessaire pour dégrader entièrement les 16 HAP. Afin d'évaluer l'impact de la réaction de Fenton à différentes doses, une dose 10 fois plus élevée a aussi été ajoutée. Un apport de Fe²⁺ a été réalisé sous forme de sulfate de fer pour activer la réaction de Fenton. Le rapport molaire entre l'oxydant (H₂O₂) et le fer (FeSO₄, 7H₂O) a été fixé à 10.

Pour réaliser l'oxydation en conditions insaturées, la capacité au champ de la terre a été mesurée afin de calculer le volume maximal de solution potentiellement injectable. La capacité au champ de la terre tamisée à 2 mm a été évaluée à 36 % (humidité pondérale).

Trois cristallisoirs (Cf.2§1.3.1.1) ont été remplis avec 1500 g de terre NM (à 5 % d'humidité) tamisée à 2 mm. Dans deux de ces cristallisoirs, la terre a été mélangée avec 7 g ou 82 g de sulfate de fer heptahydraté (FeSO₄, 7H₂O, 99.5 %) afin de catalyser la décomposition du peroxyde d'hydrogène sans augmenter le volume de solution à ajouter. Ensuite, 450 ml d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 0.54 M ou 6.3 M, correspondant respectivement aux doses 6 et 65 g.kg⁻¹, ont été ajoutés graduellement aux 1500 g de terre. Dans le troisième cristallisoir, qui a servi de témoin, 450 ml d'eau ont été ajoutés à la terre.

2.2 Echantillonnage et analyse

Après 48 h, pour chaque modalité, témoin, 6 g.kg⁻¹ et 65 g.kg⁻¹ d'oxydant, la terre a été homogénéisée et échantillonnée pour les différentes analyses. Sur ces échantillons ont été mesurés les HAP, les paramètres physico-chimiques (pH, CEC, C_{org} , N_{tot} , P_{Olsen}), la minéralisation du carbone et les communautés microbiennes (bactéries cultivables, dégradantes et totales, champignons). Une partie des analyses a été effectuée sur des échantillons prélevés directement à l'état frais et à T0 : les incubations, pour mesurer l'activité

microbienne globale (cf. 2§2.3.4), et la quantification de la microflore cultivable hétérotrophe (cf. 2§2.4.3). Pour l'extraction d'ADN, un sous-échantillon de terre a été congelé à -20°C . Les communautés bactériennes globales (ADNr16S), les communautés bactériennes dégradant les HAP (PAH-RHD α des bactéries Gram – et Gram +) et les communautés fongiques (ADNr18S), ont été quantifiées par PCR en temps réel selon les protocoles décrits dans le chapitre 2 (cf.2§2.4.4). Pour les mesures de C_{org} , N_{tot} , P_{Olsen} et CEC (cf.2§2.3.1), la terre a été séchée à l'air et tamisée à nouveau à 2 mm et une seule analyse a été effectuée, tandis que les analyses des HAP (cf. 2§2.3.1) ont été effectuées en triplicats.

Pour mesurer l'activité microbienne dans les terres, la minéralisation du carbone a été mesurée dans des incubations réalisées à partir d'échantillons frais, avec cinq répétitions, et incubées pendant 5 semaines à 24°C (cf.2§2.4.1). Le taux de CO_2 émis a été mesuré quotidiennement pendant les trois premières semaines et une fois par semaine pendant les deux dernières semaines. Comme précisé dans le chapitre 2 (cf.2§2.4.1), des témoins abiotiques obtenus en autoclavant les terres deux fois à 48h d'intervalle ont été suivis durant les 5 premiers jours. Après 5 semaines (T5), les mêmes analyses microbiologiques qu'au début de l'incubation (T0) ont été réalisées, ainsi que l'analyse des HAP, sur trois des cinq répétitions.

Les tests de germination et de croissance du ray-grass ont été réalisés comme décrit dans le chapitre 2 (Cf.2§2.4.6).

3. Résultats

3.1 Teneurs en polluants et paramètres physico-chimiques

La concentration totale en HAP a diminué significativement de 22 et 14 % après traitement par réaction de Fenton avec les doses respectives de 65 et 6 g.kg^{-1} de H_2O_2 . Les résultats de dégradation étaient similaires pour les différents HAP excepté pour trois HAP de faible poids moléculaire, le naphthalène, l'acétylnaphtylène et l'acenaphtène pour lesquels la diminution n'a pas été significative. Aucune différence nette n'a été observée entre les taux de dégradation des HAP à 3 (18 à 36 % de diminution avec la forte dose), 4 (20.3 à 24.3 %), 5 (16 à 22.1 %) ou 6 cycles (24.3 à 24.6 %) (Tableau 14). Aucune diminution significative de la concentration en HAP n'a été observée dans les terres oxydées après 5 mois d'incubation (*données non présentées*).

Concernant les paramètres physico-chimiques, bien qu'un seul réplicat analytique ait été analysé, la teneur en C_{org} de la terre oxydée à forte dose tendait à être plus faible que celle du témoin, contrairement à la teneur en azote qui a peu varié. Après traitement avec la plus forte dose, la CEC et le pH ont diminué respectivement de 2 et 2.5 unités et la teneur en P_{Olsen} a diminué de 77%.

Tableau 14 : Mesure des paramètres physico-chimiques (n=1) et des teneurs en HAP (moyenne et écart type, n= 3) des terres NM traitées par réaction de Fenton et de la terre témoin. Deux lettres différentes indiquent une différence significative entre les traitements ($p < 0.05$)

		Témoin	Fenton 6 g.kg ⁻¹	Fenton 65 g.kg ⁻¹
C_{org}	(g kg ⁻¹)	61,7	57.7	57.1
N_{tot}	(g kg ⁻¹)	2.4	2.4	2.3
P_{Olsen}	(g kg ⁻¹)	0.049	0.068	0.011
CEC	(cmol kg ⁻¹)	10.3	10.5	8.7
pH		7.3	7.4	4.9
Naphthalene		24.8 ^a	26.4 ^a	22.0 ^a
Acenaphthylene		0.7 ^a	0.6 ^a	0.8 ^a
Acenaphthene		57.9 ^a	54.8 ^a	52.7 ^a
Fluorene		25.9 ^a	22.9 ^b	20.4 ^b
Phenanthrene		89.1 ^a	80.9 ^{ab}	72.9 ^b
Anthracene		36.8 ^a	26.2 ^b	23.6 ^b
Fluoranthene		235.5 ^a	206.1 ^b	186.9 ^c
Pyrene		128.8 ^a	111.4 ^b	102.6 ^c
Benzo(a)Anthracene	($\mu g kg^{-1}$)	101.2 ^a	87.0 ^b	78.4 ^c
Chrysene		56.7 ^a	47.4 ^b	42.9 ^c
Benzo(b)Fluoranthene		96.7 ^a	83.5 ^b	77.3 ^b
Benzo(k)Fluoranthene		30.8 ^a	26.6 ^b	24.5 ^b
Benzo(a)Pyrene		108.8 ^a	91.5 ^b	84.7 ^b
Dibenzo(a,h)Anthracene		13.1 ^a	11.3 ^b	11.0 ^b
Benzo(g,h,i)Perylene		64.2 ^a	52.7 ^b	48.4 ^b
Indeno(1.2.3-cd)Pyrene		90.9 ^a	75.4 ^b	68.8 ^b
Total PAHs		1161.9 ^a	1004.9 ^b	917.9 ^c

3.2 Paramètres biologiques

3.2.1 Mesure de minéralisation

Aucune production de CO_2 n'a été observée dans les modalités abiotiques (*données non présentées*). L'oxydation par réaction de Fenton avec 65 g.kg⁻¹ de H_2O_2 a entraîné une augmentation significative et rapide de l'activité de minéralisation alors que le taux de minéralisation ne varie pas entre la modalité témoin et la modalité traitée avec 6 g.kg⁻¹ de H_2O_2 . Le taux de CO_2 dégagé par la terre traitée à forte dose pendant la première semaine est ainsi 4 fois supérieure aux taux mesurés pour la terre témoin et la terre traitée à faible dose.

L'augmentation est essentiellement observable pendant les deux premières semaines. Après trois semaines les courbes deviennent parallèles, traduisant un taux de minéralisation équivalent entre les modalités.

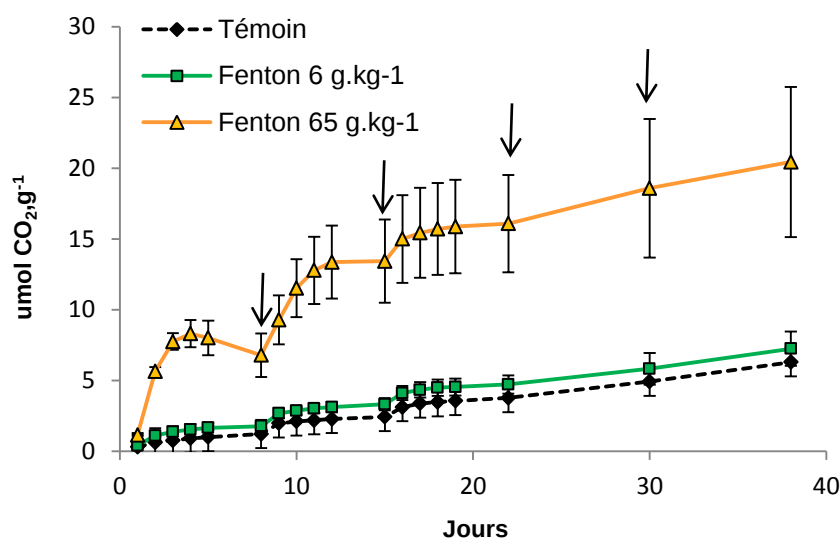


Figure 12 : Dégagement de CO₂ cumulé, mesuré dans les incubations des terres oxydées par réaction de Fenton avec les doses 6 et 65 g.kg⁻¹ et la terre témoin au cours des 5 semaines d'incubation (moyenne et écart-type, n= 5). Les flèches représentent les jours où les flacons ont été aérés.

3.2.2 Evolution des communautés microbiennes

La quantification des gènes de dégradation (PAH-RHDα) pour les bactéries Gram+ et Gram- ayant donné les mêmes résultats, il a été décidé d'additionner ces deux populations afin de représenter les bactéries dégradantes. Après oxydation (T0), le nombre de bactéries cultivables hétérotrophes ainsi que le nombre de copies de gènes d'ADNr 16S a significativement diminué et les gènes 18S et de dégradation (PAH-RHDα) n'étaient plus quantifiables dans la terre traitée par la forte dose (Figure 13). Après 5 semaines d'incubation (T5), ces densités ont augmenté significativement dans la modalité traitée à forte dose comparée à T0. A T5, les nombres de bactéries cultivables et de copies de gène d'ADNr 18S étaient même significativement supérieurs à ceux dénombrés dans la terre témoin. Cependant, dans la terre traitée à faible dose, aucune différence significative n'a été observée pour toutes les populations microbiennes comparées au témoin, que ce soit après traitement ou après 5 semaines d'incubation.

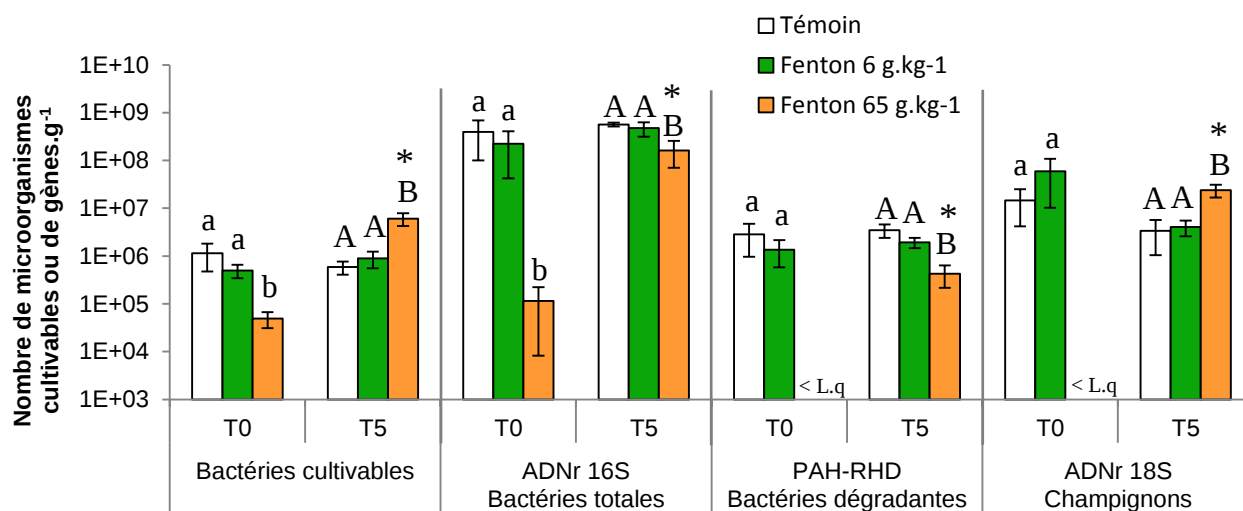


Figure 13 : Quantification des bactéries cultivables, du nombre de copies de gène d'ADNr 16S (bactéries totales), de PAH-RHD (bactéries dégradantes) et d'ADNr18S (champignons) dans les terres traitées par réaction de Fenton (6 et 65 g.kg⁻¹) au début (T0) et après 5 semaines (T5) d'incubation (moyenne et écart-type, n=3). Deux lettres différentes dans chaque catégorie indiquent des différences significatives entre les traitements (Anova, $p < 0.05$). Les * représentent les différences entre T0 et T5 (test de Mann et Whitney, $p < 0.05$).

3.2.3 Cinétique de germination et mesure de biomasse du ray-grass

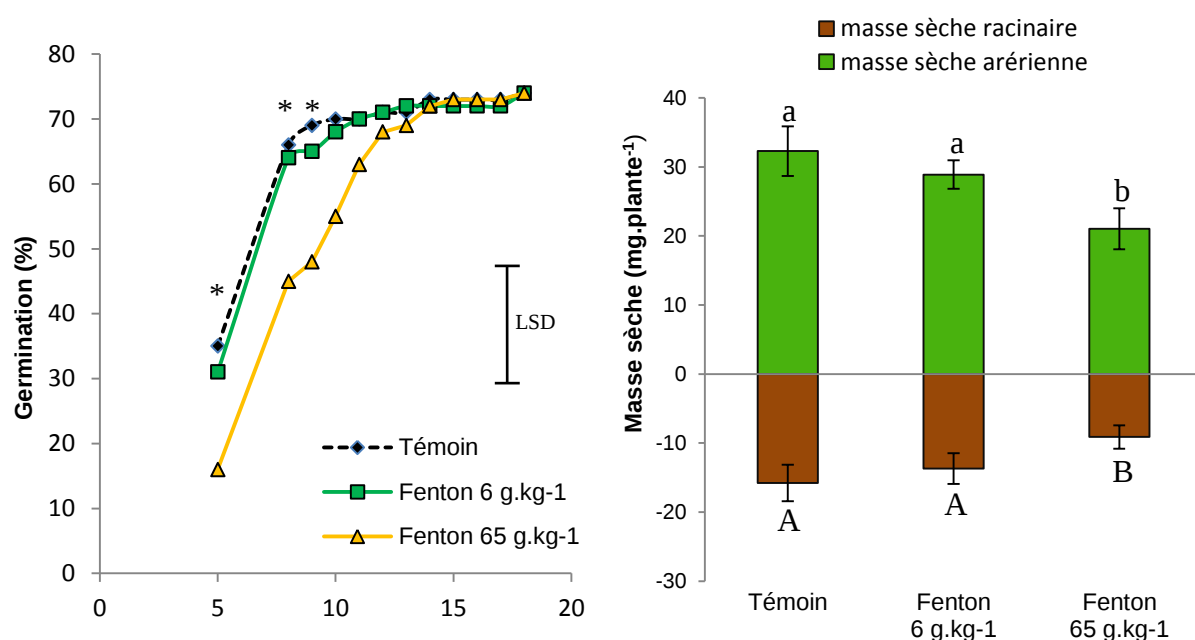


Figure 14 : Cinétique de germination et biomasse des parties foliaires et racinaires du ray-grass pour les terres traitées par réaction de Fenton et témoin. Les * indiquent des différences significatives entre les taux de germination (Plus petite différence significative (LSD) : 17 %) et les différentes lettres dans chaque catégorie indiquent des différences significatives de biomasse entre les traitements (Anova, $p < 0.05$).

Le taux de germination du ray-grass a varié entre 75 à 80 % après 14 jours, que la terre utilisée soit traitée ou non. Cependant, des différences significatives de germination à 5 et 10

jours indiquent un retard de 3 jours avec la terre traitée à la dose de 65 g.kg⁻¹ de H₂O₂ (Figure 14). Les biomasses foliaires et racinaires récoltées sur la terre traitée par la forte dose étaient significativement plus faibles que celles récoltées sur la terre témoin (35 à 43% de diminution) (Figure 14). Aucune variation n'a été observée avec la terre traitée par la faible dose d'oxydant.

4. Discussion

4.1 Evolution de la teneur en HAP dans la terre oxydée par réaction de Fenton

La réaction de Fenton appliquée en condition insaturée a significativement diminué la concentration en HAP dans la terre de friches industrielles. Cette oxydation a concerné l'ensemble des HAP exceptés les HAP les plus légers. Les taux de dégradation mesurés étaient relativement identiques pour les HAP comprenant 3, 4, 5 ou 6 cycles. Une étude de Tran et al. (2010) a montré des taux de dégradation plus faibles pour les HAP de hauts poids moléculaires, mais ces auteurs ont montré l'influence du rapport H₂O₂/Fe²⁺ sur le taux relatif de dégradation des HAP de poids moléculaires différents.

Le taux de dégradation obtenu dans la présente étude, qui équivaut à l'apport de 5 à 56 g de H₂O₂ par gramme de HAP, est relativement faible comparé à d'autres études où les oxydants ont été appliqués en conditions saturées mais où la quantité d'oxydant apportée était plus élevée (100 à 4000 g H₂O₂ par gramme de HAP) pour des sols artificiellement contaminés (Nam et al., 2001 ; Kulik et al., 2006) ou présentant une contamination ancienne (Nam et al., 2001 ; Jonsson et al., 2006, 2007). Dans le sol, les interactions non spécifiques des radicaux libres peuvent oxyder d'autres molécules et ainsi augmenter considérablement la quantité d'oxydant nécessaire pour dégrader les HAP. La teneur en C_{org} de la terre utilisée est supérieure à 50 g.kg⁻¹ et les HAP représentent 2 % du carbone organique total. Par ailleurs, les diminutions apparentes de la teneur en C_{org} dans les deux terres oxydées pourraient résulter de l'action des radicaux libres. Cependant la mesure n'ayant été réalisée que sur un seul échantillon, et la terre semblant présenter une forte hétérogénéité pour ce paramètre (Cébron et al., 2011, Ouvrard et al., 2011), des recherches complémentaires et plus précises devront être menées afin de préciser ce résultat et cette hypothèse.

La terre présente une teneur en carbonate relativement élevée ($> 2\%$) ce qui peut entraîner des interactions avec les radicaux libres et ainsi limiter l'efficacité de la réaction de Fenton. Dans le même temps, la réaction a entraîné une diminution du pH, probablement due à l'injection de la solution de H_2O_2 et sa réaction avec le Fe^{3+} (Huling et Pivetz, 2006). Les carbonates pourraient ainsi tamponner le milieu et diminuer d'autant plus l'action des radicaux libres qui présentent une meilleure efficacité en conditions acides (Huling et Pivetz., 2006). De la même façon, il est possible que, sans agent chélatant, le fer sous forme de FeSO_4 ait été oxydé trop rapidement pour jouer le rôle de catalyseur (Usman, 2011).

Une autre explication pourrait être la faible accessibilité des polluants dans les terres présentant une contamination relativement ancienne (Katayama et al., 2010 ; Ouvrard et al., 2011). Contrairement à d'autres études, le contact entre les HAP et l'oxydant n'a pas été optimisé par l'utilisation d'une quantité importante de solution. Le fait que les radicaux libres aient une durée de demi-vie très courte ($< 10^{-12}\text{s}$) (Sies, 1993) ajouté à la difficulté d'accéder aux HAP localisés dans des agrégats néo-formés, spécifiques des terres industrielles (Monsérié et al., 2009) pourraient être une autre limite pour la dégradation des HAP en conditions insaturées.

4.2 Impact de la réaction de Fenton sur les paramètres physico-chimiques et sur la croissance des plantes

La fertilité du sol a été affectée par la réaction de Fenton à la forte dose d'oxydant, avec une diminution de la biomasse produite et un impact relativement fort sur certains paramètres physico-chimiques. L'effet principal de la forte dose d'oxydant réside dans la diminution du pH du sol, ce qui entraîne un effet négatif sur la croissance des plantes, altération déjà observée par Sirguy et al. (2008) et sur la diminution de la CEC et du phosphore assimilable. La diminution de la CEC peut être expliquée par la chute du pH qui peut altérer les charges des groupements carboxyles, présents sur la matière organique, qui pourraient passer de la forme COO^- à COOH (Sirguy et al., 2008). De plus, cet effet pourrait résulter aussi de l'ionisation en conditions acides de groupements minéraux OH. Une diminution forte de la capacité d'échange cationique, reflet de la mobilité et de la disponibilité des nutriments dans les sols, peut entraîner des conséquences importantes sur la fertilité du sol. La diminution de phosphore assimilable, déjà décrite par Sirguy et al. (2008), peut résulter de la formation de phosphate de fer qui représente une forme insoluble du phosphate. La diminution du pH, la

faible quantité de phosphore assimilable ainsi que la diminution de la CEC sont des éléments en mesure d'expliquer la diminution de biomasse végétale.

4.3 Evolution de la densité et de l'activité microbienne dans la terre oxydée par la réaction de Fenton

Parallèlement, l'oxydation à forte dose a affecté fortement la densité et l'activité microbienne. La diminution des densités en bactéries totales, cultivables ou dégradantes, ainsi que des champignons peut être en partie expliquée par l'effet destructeur des radicaux libres qui réagissent fortement avec les membranes biologiques (Slater, 1984). De plus, la chaleur produite par la réaction de Fenton, exothermique, ainsi que la diminution du pH sont autant d'éléments susceptibles de contribuer à l'altération des communautés microbiennes. Cette diminution du nombre de microorganismes après réaction de Fenton, ainsi que la recolonisation après traitement ont déjà été observées (Ferguson et al., 2004 ; Palmroth et al., 2006b ; Sahl and Munakata-Marr, 2006). L'augmentation de l'activité microbienne, mesurée par dégagement de CO₂, et de la densité des différentes communautés microbiennes observée pour la terre traitée à forte dose durant les cinq semaines d'incubation montre une recolonisation microbienne rapide. Les cellules mortes (Palmroth et al., 2006) ainsi que la fraction de carbone organique atteinte par l'oxydation (Leifeld and Kögel-Knabner, 2001 ; Mikutta et al., 2005) sont des sources de carbone organique facilement assimilable. Ainsi, des communautés hétérotrophes, assimilant essentiellement le carbone organique facilement disponible, comme les bactéries cultivables, sont susceptibles de se développer préférentiellement. Contrairement à d'autres études, aucune biodégradation des HAP n'a été observée durant les incubations suivant l'oxydation. Par ailleurs, aucune variation particulière dans les communautés des bactéries dégradantes n'a été observée. Cette difficulté des HAP à être dégradés par voie biotique peut être reliée à la faible disponibilité des HAP présents dans cette terre historiquement contaminée (Ouvrard et al., 2011), ce qui entraîne des contraintes pour la biodégradation et l'atténuation naturelle.

5. Conclusion

En conclusion, cette expérimentation en batch a montré que :

- La concentration en HAP dans une terre historiquement contaminée peut être réduite par oxydation chimique utilisant la réaction de Fenton en conditions non saturée, cependant les taux de dégradation atteints n'étaient pas très élevés et variaient en fonction de la dose d'oxydant.
- L'impact de l'oxydation chimique sur la teneur en HAP comme sur les paramètres physico-chimiques et biologiques varie selon la quantité d'oxydant appliqué. Avec la plus forte dose, les paramètres du sol ont été plus altérés, particulièrement le pH et certains paramètres biologiques, comme la densité en microorganismes, la germination et la croissance des plantes.
- L'impact sur les paramètres microbiologiques n'est cependant que temporaire. La recolonisation du milieu par l'ensemble des communautés microbiennes a été rapide. L'évolution de fonctions microbiennes spécifiques devrait cependant être étudiée afin de préciser si elles sont affectées.
- La réduction du pH apparaît comme un facteur limitant pour l'installation d'une végétation après traitement avec une forte dose. De plus, à long terme, la diminution de phosphore assimilable pourrait induire une diminution de la croissance des plantes.

CHAPITRE 4 –Impact de deux oxydants sur les caractéristiques physico-chimiques et biologiques de trois terres contaminées en colonnes insaturées

1. Introduction

Dans le chapitre précédent, il a été démontré que l'oxydation par réaction de Fenton modifiée permettait de diminuer la concentration en HAP et, en fonction de la dose d'oxydant utilisée, induisait une baisse du pH et de la concentration en phosphore assimilable dans la terre industrielle NM. En ce qui concerne les effets sur le fonctionnement biologique du sol, un impact nocif temporaire de l'oxydation chimique sur la densité microbienne a été mesuré, ainsi qu'une inhibition de la germination et la croissance du ray-grass.

La terre utilisée présentait une pollution ancienne (supérieure à 50 ans). Or, l'âge de la pollution peut être déterminant pour l'accessibilité, la disponibilité et la dégradation des HAP (Allard et al., 2000 ; Hatzinger et Alexander, 1995). L'objectif principal était de déterminer les principaux paramètres de la terre pouvant être affectés par l'oxydation. Les risques de transfert par lessivage ou lixiviation d'éléments métalliques dans les eaux de percolations n'avaient donc pas été considérés. Cependant, les résultats ont montré que l'oxydation chimique pouvait fortement acidifier le sol et par voie de conséquence induire la lixiviation de certains éléments (Lopes et al., 2008). Enfin, un seul ajout d'oxydant avait été réalisé, tandis que des apports successifs pourraient permettre un meilleur rendement d'oxydation.

Plusieurs questions peuvent alors être posées :

- Les effets observés sur les propriétés chimiques et biologiques de la terre *NM* traitée par oxydation chimique sont-ils généralisables à d'autres types de terres aux caractéristiques physico-chimiques différentes ou similaires ?
- Cet impact de l'oxydation chimique est-il particulier à la réaction de Fenton ou est-il généralisable à d'autres oxydants ?

- Le rendement de dégradation des HAP par oxydation chimique en conditions insaturées est-il supérieur pour des terres présentant une contamination récente et plus disponible, et pourrait-il être amélioré avec des apports fractionnés d'oxydant ?
- Existe-t-il des risques de transfert d'éléments (ions majeurs ou métaux en traces) dans les eaux de percolation suite à la mise en œuvre du procédé d'oxydation chimique ?
- S'il existe, le transfert de ces éléments dans les eaux peut-il induire une toxicité susceptible d'affecter la survie des microorganismes ?

Pour répondre à ces questions, des expériences en colonnes de laboratoire ont été réalisées avec trois terres différentes, oxydées en colonnes non saturées avec deux réactifs différents et comparées avec un témoin percolé avec de l'eau. Les terres choisies (*Ch*, *NM* et *Ho*) possèdent des caractéristiques physico-chimiques contrastées et des teneurs en polluants différentes (cf. Chapitre 2). Les traitements par oxydation chimique sont basés d'une part sur la réaction de Fenton modifiée et d'autre part sur l'utilisation de persulfate activé par le peroxyde d'hydrogène.

Cette expérimentation a été réalisée en collaboration avec Julien Lemaire et l'équipe « Sol & Eau » du Laboratoire Réactions et Génie des procédés CNRS UPR 3349, partenaire de l'ANR Oxysol. Ainsi, la partie oxydation chimique (construction des colonnes, calcul de débit et temps de passage de l'oxydant, analyse précise du rendement de l'oxydation) est développée dans la thèse de Julien Lemaire (2011).

2. Matériels et méthodes

2.1 Choix des terres

Cette expérimentation a été réalisée avec trois terres contrastées, tant au niveau des caractéristiques physico-chimiques qu'en terme de pollution, décrites dans le chapitre 2 (Cf.2§1.1.1). Deux terres sont issues d'anciennes friches industrielles et présentent des caractéristiques physico-chimiques relativement proches ainsi qu'une contamination aux HAP ancienne (*NM* et *Ho*) et une terre est issue de terrain agricole (*Ch*) avec des caractéristiques physico-chimiques très éloignées des deux autres et a été artificiellement contaminée avec du phénanthrène et du pyrène selon le protocole décrit dans le chapitre 2 (Cf.2§2.1). L'expérience durant plus d'une semaine, un lot de terre *Ch* par traitement a été artificiellement contaminé 24 heures avant l'oxydation afin d'éviter toute biodégradation avant l'utilisation du lot.

2.2 Protocole d'oxydation chimique

2.2.1 Choix des oxydants

Deux procédés d'oxydation ont été retenus pour cette expérimentation :

- les réactifs de Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{FeSO}_4$)
- le persulfate activé par le peroxyde d'hydrogène

Le choix de la réaction de Fenton modifiée repose sur la volonté de comparer les résultats acquis avec ceux du Chapitre 3, en particulier afin d'évaluer l'effet d'apports progressifs en oxydants sur le rendement de dégradation des HAP. Le persulfate activé par le peroxyde d'hydrogène a été choisi car c'est un oxydant beaucoup plus persistant (>1 semaine) que celui utilisé pour la réaction de Fenton (<1 heure). Par ailleurs, le procédé est en plein développement (Huling et Pivetz, 2006), et d'après les rendements d'oxydation des HAP obtenus dans le projet OXY SOL en conditions saturées (Lemaire, 2011), pourrait représenter un traitement efficace.

2.2.2 Choix des doses d'oxydants

Contrairement à l'expérience du chapitre précédent, une seule dose d'oxydant a été utilisée afin de comparer l'impact de l'oxydation sur chaque terre pour une même dose d'oxydant. La dose choisie de 50 g.kg^{-1} était proche de la dose appliquée précédemment qui avait conduit à une dégradation significative des HAP (Chapitre 3), et permettait d'établir un débit de solution optimal pour la durée de l'expérimentation (Tableau 15).

2.2.3 Dispositif expérimental

Les colonnes de laboratoire utilisées pour cette expérimentation sont décrites dans le Chapitre 2 (Cf.2§1.3.1). L'humidité des terres, ainsi que la capacité au champ (NM : 26.5%, Ho : 22.5 %, Ch : 15.8 %) ont préalablement été mesurées sur les terres tamisées à 5 mm. Ces mesures ont ainsi permis de remplir les colonnes avec une quantité équivalente à 200 grammes de terre sèche, préalablement tamisé à 5 mm, et d'ajuster l'humidité de ces terres, par percolation d'eau, à la capacité au champ avant de commencer l'injection. Elles ont ensuite reçu par aspersion régulière des volumes successifs de solution d'oxydants $\text{H}_2\text{O}_2/\text{FeSO}_4$ ou $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8/\text{H}_2\text{O}_2$ (Tableau 15). Des colonnes témoins ont été réalisées par percolation, dans les mêmes conditions que pour les oxydants, d'une solution exclusivement constituée d'eau déionisée. Les traitements ont été dupliqués (deux colonnes par traitement).

2.2.4 Conditions expérimentales

Les débits de solution ont été calculés en fonction des capacités au champ (CAC) de chaque terre. L'objectif était de réguler le débit pour rester en conditions insaturées et ne pas dépasser la CAC. Les solutions d'oxydants et/ou de catalyseur ont été injectées par alternance, afin d'éviter des flux de percolation différentiels des réactifs. Les durées d'injections ont été calculées en fonction des débits pour atteindre les volumes attendus. Le temps de ressuyage des terres entre l'arrêt de l'injection et le prélèvement des échantillons a été de 12 h. Les valeurs des différents paramètres de mise en œuvre de l'expérimentation sont synthétisées dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Paramétrage des procédés d'oxydations par réaction de Fenton et persulfate activé pour l'expérimentation en colonnes de laboratoire

	Fenton		Persulfate	
	A: H_2O_2	B: $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	A: NaS_2O_8	B: H_2O_2
Concentration (mol.l^{-1})	3,5	0,35	0,75	3,8
Rapport molaire (A: B)	20,0		5,0	
nombre d'injection	5,0		5,0	
Volume par injection (ml)	16,7	8,3	12,5	12,5
Ch débit (ml.h^{-1})	12,3	36,8	31,6	10,5
NM débit (ml.h^{-1})	20,6	61,8	53,0	17,7
Ho débit (ml.h^{-1})	17,5	52,4	44,9	15,0

2.3 Echantillonnages et analyses

Après 12 heures de ressuyage, l'ensemble de la terre a été retiré de la colonne à l'aide d'un piston adapté au diamètre de la colonne. La colonne de terre a été ensuite séparée en deux parties et chaque partie a été homogénéisée avant échantillonnage. Les analyses ont été réalisées sur des échantillons de terre (tamisés à 5 mm) prélevés dans la moitié supérieure des colonnes pour refléter l'impact de l'oxydation sur l'horizon de surface d'un sol en place. Les paramètres mesurés pour les 2 colonnes (A et B) ont été les suivants : pH, activité enzymatique (Cf.2§2.4.2.1), quantification des bactéries cultivables (Cf.2§2.4.3), concentrations en HAP (Cf.2§2.3.1.3) et transfert d'élément dans les percolats (Cf.2§2.3.2). Les caractérisations agronomiques ont été réalisées uniquement sur la colonne A. Pour toutes les analyses physico-chimiques (Cf.2§2.3.1), 3 échantillons ont été prélevés, sauf pour les mesures de pH réalisées une seule fois. Pour les analyses des microorganismes cultivables sur sol frais, 4 réplicats ont été réalisés afin d'en renforcer la mesure. Pour les analyses des solutions (ETM, cations et anions majeurs, oxydants) dans les eaux de percolations, un seul

dosage a été réalisé. Les mesures pour les différents paramètres physico-chimiques et biologiques ont été acquises conformément aux méthodes décrites dans le chapitre 2. Les pertes en éléments des terres (%) ont été calculées à partir des teneurs en éléments totaux mesurés dans les terres initiales et des volumes percolés mesurés. Les valeurs des paramètres mesurés sur les 2 colonnes étant identiques (*données non présentées*), seuls les résultats sur la colonne A, pour laquelle tous les paramètres ont été mesurés, sont présentées.

3. Résultats

3.1 Teneur en HAP

Pour la terre *Ch*, une diminution significative de la concentration en HAP a été observée après oxydation chimique par la réaction de Fenton (Figure 15). Les teneurs en phénanthrène (PHE) et en pyrène (PYR) ont respectivement diminué de 35 et 78 %. Le traitement par persulfate activé n'a pas provoqué d'oxydation mesurable des HAP de la terre *Ch*. La concentration en HAP après traitement par réaction de Fenton ou par persulfate activé dans les terres de friches *NM* et *Ho* n'a pas diminué significativement (Figure 16).

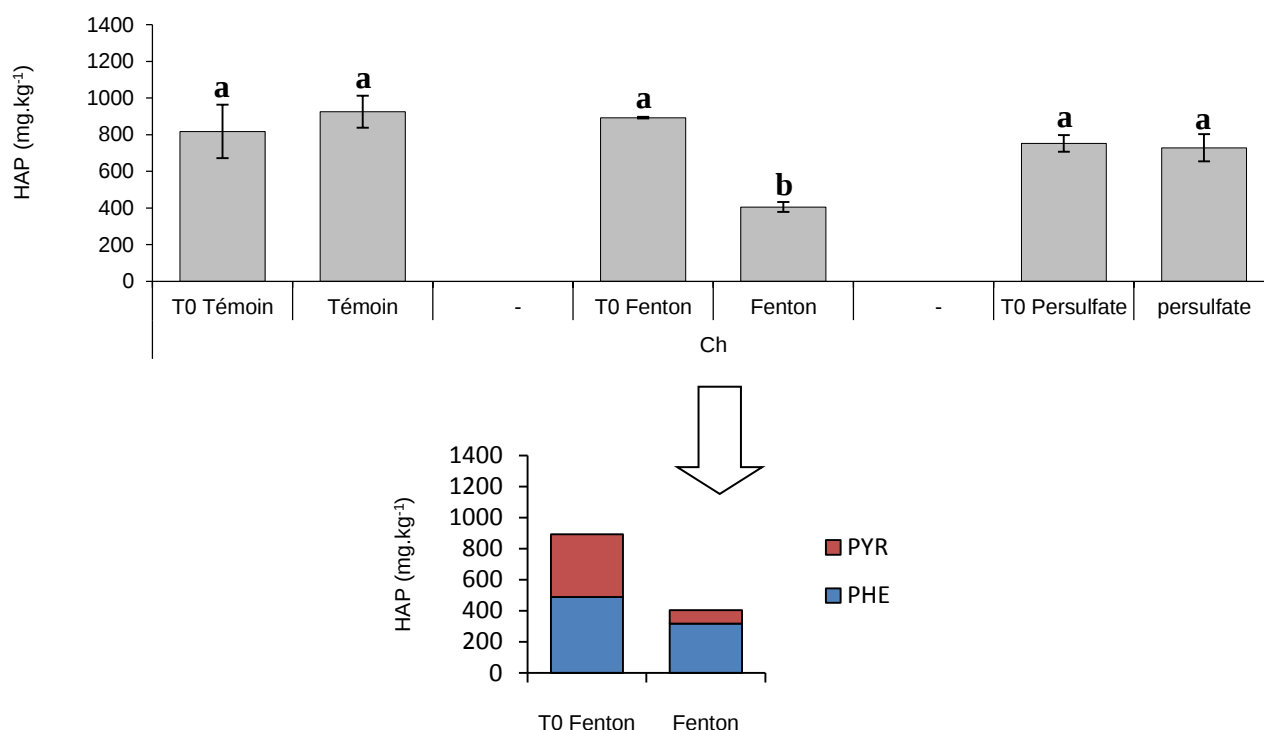


Figure 15 : Concentration en HAP (moyenne et écart-type, n=3) dans les lots de la terre *Ch* avant (T0) et après traitement par réaction de Fenton (Fenton), par le persulfate activé (persulfate) et par l'eau (Témoin). Deux lettres différentes indiquent une différence significative entre traitements (Test t Student, $p < 0,05$)

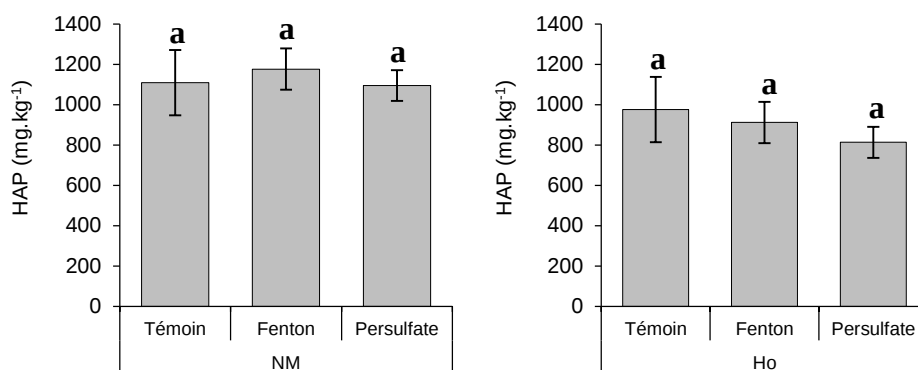


Figure 16 : Concentration en HAP (moyenne et écart-type, $n=3$) dans les terres NM et Ho après traitement par réaction de Fenton (Fenton), par le persulfate activé (persulfate) et par l'eau (Témoin). Deux lettres différentes indiquent une différence significative entre traitements (Anova, $p < 0,05$)

3.2 Caractéristiques physico-chimiques des trois terres après traitements

3.2.1 Carbone organique total

Les teneurs en carbone organique après traitement par oxydation chimique n'ont varié significativement que pour la terre *Ch*. Par rapport au témoin, une diminution de 35 % après traitement par la réaction de Fenton et de 28 % après réaction par le persulfate activé (Figure 17) a été observée.

Les teneurs en azote total ont varié d'un facteur 2 à 3 entre les terres de friches industrielles et la terre *Ch* (Figure 18). Après traitement par réaction de Fenton et comparé au témoin, les teneurs en azote total de la terre *Ch* ont diminué de 37 % contre 11 % pour la réaction par persulfate activé. Par rapport au témoin, les teneurs de la terre *NM* ont diminué significativement de 8 % après traitement par oxydation, que ce soit par persulfate activé ou réaction de Fenton (Figure 18). Les teneurs en azote total dans la terre *Ho* n'ont pas varié significativement quel que soit le traitement appliqué.

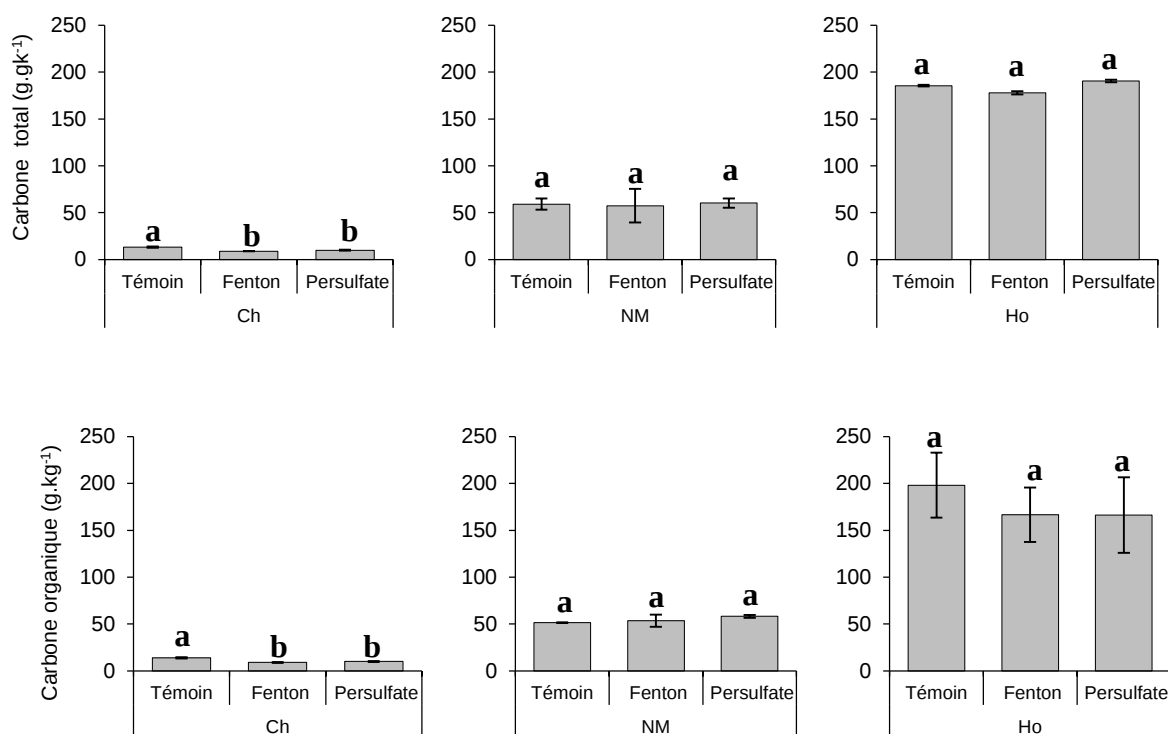


Figure 17 : Teneur en carbone total et en carbone organique (moyenne et écart-type, n=3) pour les 3 terres (Ch, NM, Ho) traitées par réaction de Fenton (Fenton), par le persulfate activé (Persulfate) et par l'eau (Témoin). Deux lettres différentes indiquent une différence significative entre traitements (Anova, $p < 0,05$)

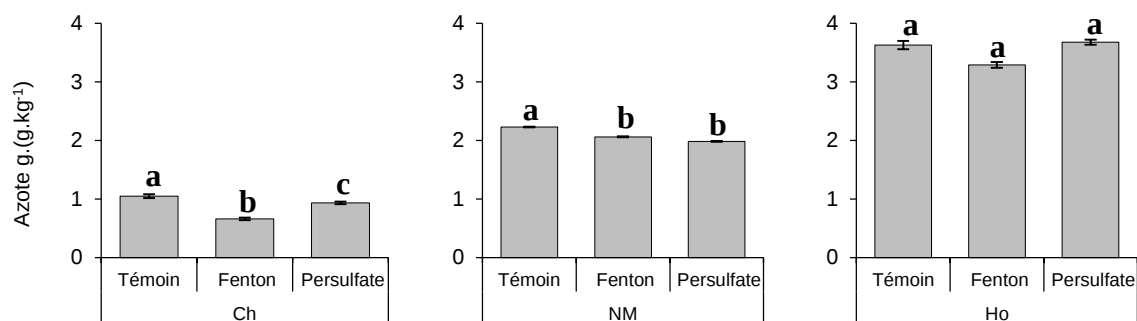


Figure 18 : Teneur en azote total (moyenne et écart-type, n=3) pour les 3 terres (Ch, NM, Ho) traitées par réaction de Fenton (Fenton), par le persulfate activé (Persulfate) et par l'eau (Témoin). Deux lettres différentes indiquent une différence significative entre traitements (Anova, $p < 0,05$)

3.2.2 Teneur en phosphore (P_{Olsen})

Le phosphore assimilable est un des paramètres de fertilité du sol qui a présenté les variations les plus fortes après traitement par oxydation par rapport au témoin. Comparé à la teneur mesurée dans le témoin, le traitement par persulfate activé a augmenté d'un facteur 6 la teneur mesurable en P_{Olsen} dans la terre Ch, contre 3 après réaction de Fenton. Les terres de friches

industrielles ont présenté des variations inverses après traitement par réaction de Fenton, avec une diminution des teneurs en P_{Olsen} , de 45 % pour *NM* et de 28 % pour *Ho*. Pour les terres de friches industrielles, l'oxydation par persulfate activé n'a eu un effet observable que sur la terre *Ho* avec une augmentation significative de 37 % (Figure 19).

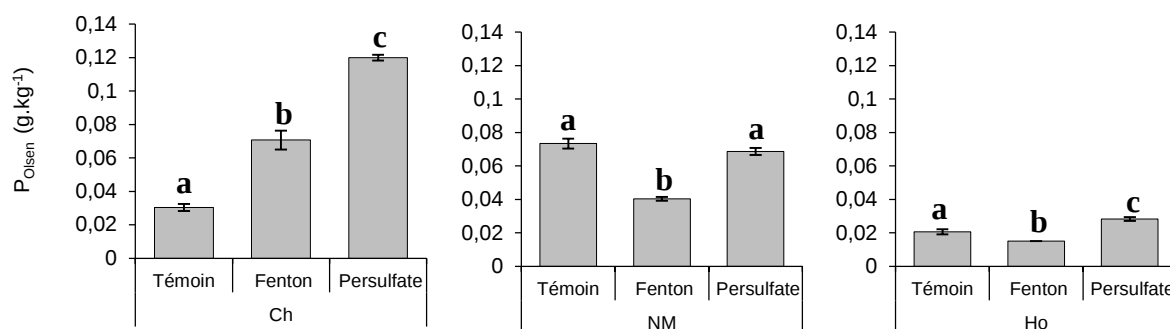


Figure 19 : Teneur en P_{Olsen} (moyenne et écart-type, $n=3$) pour les 3 terres (*Ch*, *NM*, *Ho*) traitées par réaction de Fenton (Fenton), par le persulfate activé (Persulfate) et par l'eau (Témoin). Deux lettres différentes indiquent une différence significative entre traitements (Anova, $p < 0,05$)

3.2.3 pH et CEC

La diminution du pH dans les terres *Ch* après traitement par réaction de Fenton et par le persulfate activé a été drastique. Le pH initialement proche de 5 a diminué de 3 unités. Les terres de friches industrielles ont été moins affectées, avec une perte de 1 unité pour *NM* et *Ho* quel que soit le traitement (Figure 20).

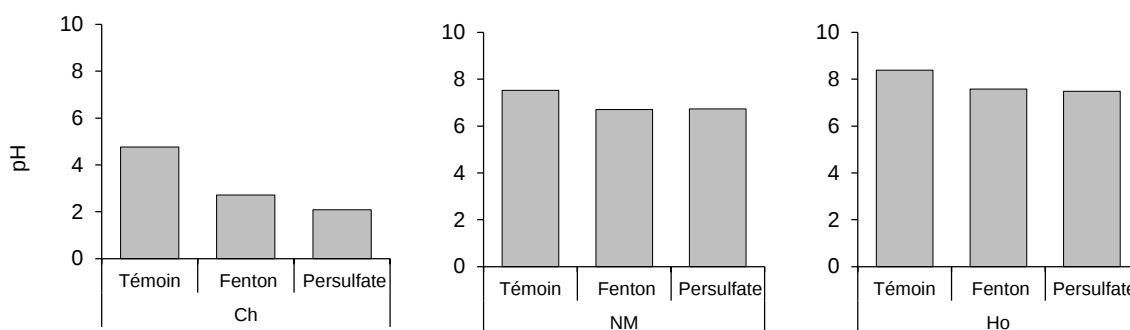


Figure 20 : pH ($n=1$) des 3 terres (*Ch*, *NM*, *Ho*) traitées par réaction de Fenton (Fenton) ou persulfate activé (Persulfate) et par l'eau (Témoin).

La CEC, a évolué très différemment entre la terre *Ch* et les terres *NM* et *Ho*. Les CEC des terres de friches étaient globalement beaucoup plus élevées. De plus, comme pour les mesures de carbone organique et d'azote total, les variations de la capacité d'échange cationique ont surtout été observées sur la terre *Ch*. Le traitement par réaction de Fenton a diminué de 96 % la CEC contre 46 % pour le traitement par le persulfate par rapport au témoin. Des effets

différents et moins marqués ont été observés pour les terres de friches. Une augmentation de 10 % de la CEC pour la terre *NM* après traitement par persulfate a été observée, ainsi qu'une diminution de 18 % pour la terre *Ho* après traitement par réaction de Fenton (Figure 21).

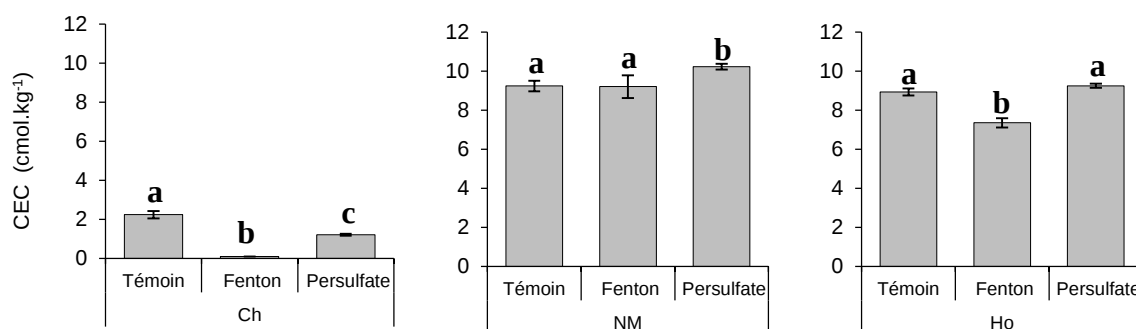


Figure 21 : Capacité d'échange cationique (moyenne et écart-type, $n=3$) pour les 3 terres (*Ch*, *NM*, *Ho*) traitées par réaction de Fenton (Fenton), par le persulfate activé (Persulfate) et par l'eau (Témoin). Deux lettres différentes indiquent une différence significative entre traitements (Anova, $p < 0,05$)

3.3 Quantification des bactéries cultivables et des activités de types hydrolases dans les trois terres après traitement

Initialement, les densités en bactéries cultivables des terres *Ch* et *Ho* étaient du même ordre de grandeur et proches de 10^6 bactéries cultivables par gramme de sol. Les valeurs pour *NM* étaient plus faibles, avec une densité d'environ 10^5 bactéries cultivables par gramme de sol. On remarque que le traitement par persulfate activé a entraîné une diminution significative de la densité dans toutes les terres traitées (Figure 22). Pour la terre *Ch*, la diminution était telle que la limite de quantification de la mesure par MPN fixée à 10^2 a été atteinte. Pour les terres de friches *NM* et *Ho*, ces diminutions étaient significatives, mais plus faibles, de l'ordre d'un facteur 2. La réaction de Fenton a aussi eu un effet négatif significatif sur la terre *Ch* (10 fois moins de bactéries cultivables après traitement) sans avoir d'impact détectable sur la densité bactérienne des terres de friches.

Initialement, les activités des hydrolases dans les terres témoins étaient environ 2 fois plus fortes pour la terre *Ch* que pour les terres *NM* et *Ho*. Elles ont été significativement plus faibles dans les terres traitées par Fenton et par persulfate activé par rapport aux valeurs des terres témoins. Avec le persulfate, la baisse des activités a atteint 70 % dans les terres de friches et a été tellement marquée dans la terre *Ch* que les valeurs mesurées étaient presque nulles. La réaction de Fenton a induit une diminution des activités des hydrolases dans les terres de friches comprise entre 40 et 60 %, avec un effet majeur sur la terre *NM*. La réaction

de Fenton a eu de la même façon un impact négatif sur la terre *Ch*, avec une diminution de 87 % de l'activité des hydrolases par rapport au témoin.

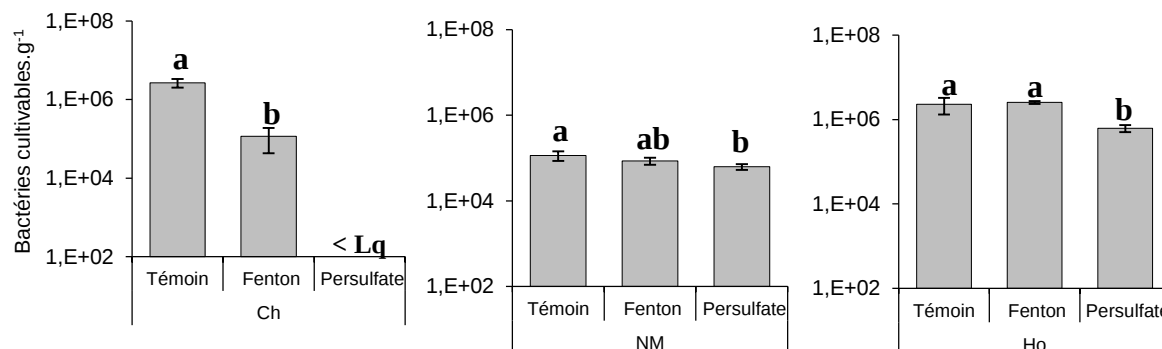


Figure 22 : Densité des microorganismes cultivables (moyenne et écart-type, $n=4$) dans les 3 terres (*Ch*, *NM*, *Ho*) traitées par réaction de Fenton (Fenton), par le persulfate activé (persulfate) et par l'eau (Témoin). (Lq : Limite de quantification). Deux lettres différentes indiquent une différence significative entre traitements (Anova, $p < 0,05$)

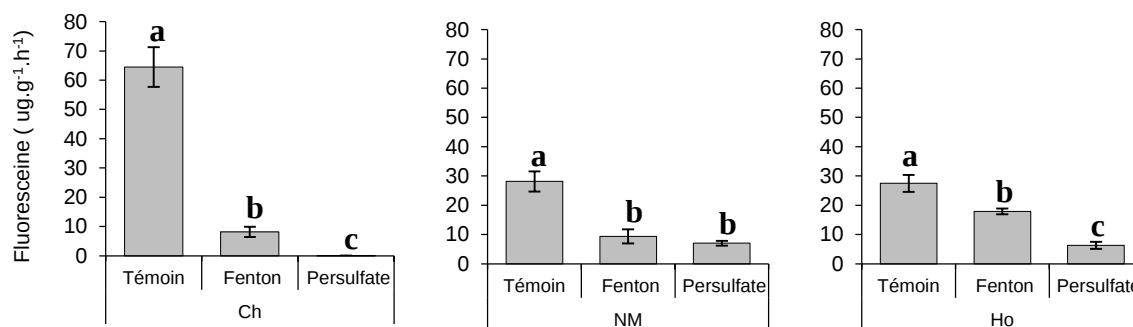


Figure 23: Activité des hydrolases (moyenne et écart-type, $n=3$) par mesure de la formation de fluorescéine à partir de la fluorescéine diacétate dans les 3 terres (*Ch*, *NM*, *Ho*) traitées par réaction de Fenton (Fenton), par le persulfate activé (persulfate) et par l'eau (Témoin). (Lq : Limite de quantification). Deux lettres différentes indiquent une différence significative entre traitements (Anova, $p < 0,05$)

3.4 Caractérisation des percolats après traitement

3.4.1 Pertes en éléments en traces métalliques et en éléments majeurs

Les 3 terres utilisées présentent des teneurs totales en éléments en traces ou majeurs très contrastées. Les terres issues de friches industrielles présentaient des teneurs en éléments traces métalliques (e.g. chrome (Cr), manganèse (Mn), plomb (Pb), zinc (Zn)) ainsi qu'en calcium (Ca), phosphore (P) et magnésium (Mg) plus élevées que la terre artificiellement contaminée (Tableau 16).

**Tableau 16 : Concentration en éléments totaux des terres *Ch*, *NM* et *Ho*
avant traitement par oxydation chimique et traitement à l'eau (< Lq : Limite de quantification)**

	<i>Ch</i>	<i>NM</i>	<i>Ho</i>
Al (<i>g.kg⁻¹</i>)	37,8	34,4	41,2
Co (<i>mg.kg⁻¹</i>)	< Lq	34,0	< Lq
Cr (<i>mg.kg⁻¹</i>)	144,3	1794,6	217,9
Cu (<i>mg.kg⁻¹</i>)	49,4	167,6	79,0
Fe (<i>g.kg⁻¹</i>)	8,2	137,0	53,9
Mn (<i>mg.kg⁻¹</i>)	321,9	8700,0	2753,9
Ni (<i>mg.kg⁻¹</i>)	< Lq	98,5	< Lq
Pb (<i>mg.kg⁻¹</i>)	< Lq	131,7	55,0
Zn (<i>mg.kg⁻¹</i>)	76,4	1981,0	220,3
Si (<i>g.kg⁻¹</i>)	342,8	99,6	114,4
P (<i>mg.kg⁻¹</i>)	432,7	2671,1	1344,6
K (<i>g.kg⁻¹</i>)	31,5	8,7	5,23
Mg (<i>g.kg⁻¹</i>)	1,6	8,7	12,21
Ca (<i>g.kg⁻¹</i>)	2,0	116,2	164,9

Les bilans entre les teneurs totales des terres initiales avant traitement et les quantités mesurées dans les percolats ont permis de mettre en évidence des transferts de certains éléments, favorisés par l'oxydation chimique. Cet effet a été presque exclusivement observé sur la terre *Ch*. Ainsi, après traitement par réaction de Fenton ou par persulfate activé, 38 à 47 % du Mn initial a été lixivié (Tableau 19). Concernant l'aluminium (Al), la quantité lixiviée a été inférieure à 0,5 %. Cependant, la teneur initiale totale dans la terre *Ch* était élevée (Tableau 16), et les concentrations en ions Al mesurées dans les percolats étaient supérieures à 400 mg.L⁻¹ (*données non présentées*). D'autres éléments comme Fe, Zn, Mg et Ca ont été entraînés dans les percolats lors de l'oxydation (5 à 10 %), sans différences nette entre le traitement par Fenton ou par le persulfate activé. Le transfert de P dans les percolats a été affecté de façon différente par les 2 traitements avec un plus fort impact du persulfate (10 % de perte) contre 0,5 % avec la réaction de Fenton.

Pour les terres de friches industrielles, le transfert des éléments dans les percolats a été relativement faible (< 2 % pour K, Mg et Ca) et systématiquement supérieur après traitement par le persulfate. Les analyses des ions sodium et sulfates dans les percolats (Tableau 20) sont difficilement interprétables, car des quantités importantes ont été apportées par l'oxydant. Les concentrations en nitrates dans les percolats ont augmenté suite aux traitements des terres de friches *NM* et *Ho*, pouvant atteindre un facteur 10 pour la terre *NM* traitée par Fenton.

3.4.2 Analyse des oxydants résiduels dans les percolats (Lemaire (2011))

Le peroxyde d'hydrogène a été presque entièrement consommé lors du passage dans les colonnes des terres et n'a pas été retrouvé pas dans les percolats. Au contraire, le persulfate présent dans les solutions de percolations représentait 26 à 47 % de l'oxydant injecté (Tableau 17).

Tableau 17 : Pourcentage d'oxydants résiduels par rapport à la quantité injectée dans les percolats après traitement. Les cellules grises représentent le traitement où le persulfate n'a pas été utilisé

Terre	Traitement	H ₂ O ₂ (%)	NaS ₂ O ₈ (%)
Ch	Fenton	0,5	
	persulfate	3,3	46,8
Ho	Fenton	0	
	persulfate	0	26,0
NM	Fenton	0	
	persulfate	0	29,4

3.4.3 Evolution de la toxicité des percolats des terres traitées par le test Microtox®

La toxicité mesurée à l'aide du Microtox® est exprimée en unités toxiques (UT) (cf.2§2.3.2.4) et augmente quand la toxicité dans la solution augmente. Les résultats des tests ont montré une forte toxicité des percolats après traitement par persulfate activé, et ce, quelle que soit la terre traitée. Le traitement de la terre *Ch* par la réaction de Fenton a induit une toxicité des percolats. Les percolats des terres *Ho* et *NM* non oxydées ont montré une faible toxicité, qui n'est pas apparue dans les percolats de la terre *Ho* traitée par la réaction de Fenton, mais qui semblait augmenter pour la terre *NM* traitée par Fenton.

Tableau 18 : Mesure de la toxicité des percolats par le test Microtox® (en UT : unité toxique, CI50 : représente la concentration d'un composé qui est requise pour une inhibition d'une réponse biologique ou biochimique à 50 % in vitro)

Terre	Traitement	UT (100/CI50)
Ch	Eau	0
	Fenton	31
	Persulfate	146
Ho	Eau	5
	Fenton	0
	Persulfate	109
NM	Eau	13
	Fenton	21
	Persulfate	208

Tableau 19 : Pourcentage d'éléments transférés dans les percolats par rapport à la teneur initiale dans les 3 terres traitées (Ch, NM et Ho) par réaction de Fenton (Fenton), persulfate activé (Persulfate) et par l'eau (témoin). Les valeurs < 0,01 % correspondent aux cellules grisées

Terres	Traitement	Al	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn	Si	P	K	Mg	Ca
Ch	Fenton	0,49		0,11	0,39	3,83	37,91			3,22		0,50	0,22	7,11	5,93
	Persulfate	0,95		0,39	0,92	3,37	47,06			2,69		9,21	0,50	9,34	7,79
	Témoin						0,16			0,10		0,02	0,02	0,12	0,10
NM	Persulfate		0,05		0,01								2,15	2,19	0,50
	Fenton		0,14				0,04	0,02		0,01			0,40	1,92	0,24
	Témoin												0,15	0,30	0,23
Ho	Persulfate				0,04		0,49					0,02	1,59	0,09	0,45
	Fenton									0,01			0,19	0,10	0,15
	Témoin				0,02								0,06		0,01

Tableau 20 : Concentration en nitrates, sulfates et sodium dans les percolats. Les valeurs en limite de quantification ou incertaines correspondent aux cellules grisées

Terres	Traitement	NO ₃ ⁻ (mg.L ⁻¹)	SO ₄ ²⁻ (g.L ⁻¹)	Na ⁺ (g.L ⁻¹)	Volume percolats (ml)
Ch	Fenton		70,0		79
	Persulfate		53,9	13,8	97
	Témoin	51,0	0,05		86
NM	Fenton	1301,7	2,5	0,20	83
	Persulfate	824,0	3,5	84,6	65
	Témoin	161,3	1,6	0,04	95
Ho	Fenton	93,9	2,6		56
	Persulfate	180,6	6,1	14,6	58
	Témoin	72,8	0,02		85

4. Discussion

Les résultats obtenus avec cette expérience en colonnes montrent que les effets de l'oxydation sur la dégradation des HAP et sur les propriétés physico-chimiques et biologiques varient avec les terres et les oxydants utilisés. La représentation des données à l'aide de graphiques radars (Figure 24) montre clairement ces différences.

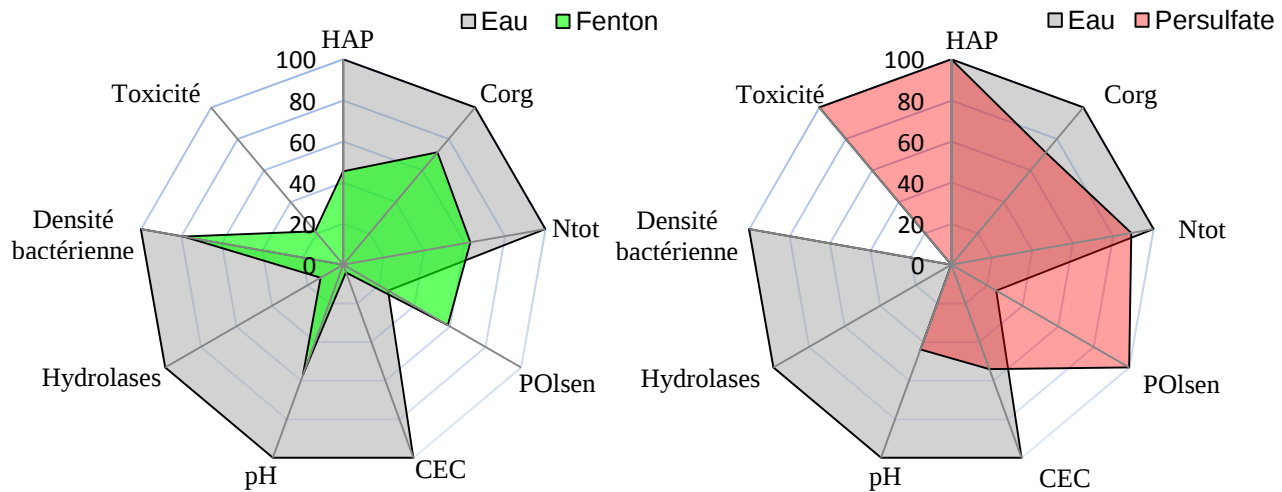
4.1 Evolution des paramètres physico-chimiques

Après percolation des oxydants, des variations fortes des caractéristiques des terres ont été observées quel que soit l'oxydant : C_{org}, N, pH, CEC, P Olsen (Figure 24). Certains paramètres physico-chimiques sont cependant plus impactés que d'autres :

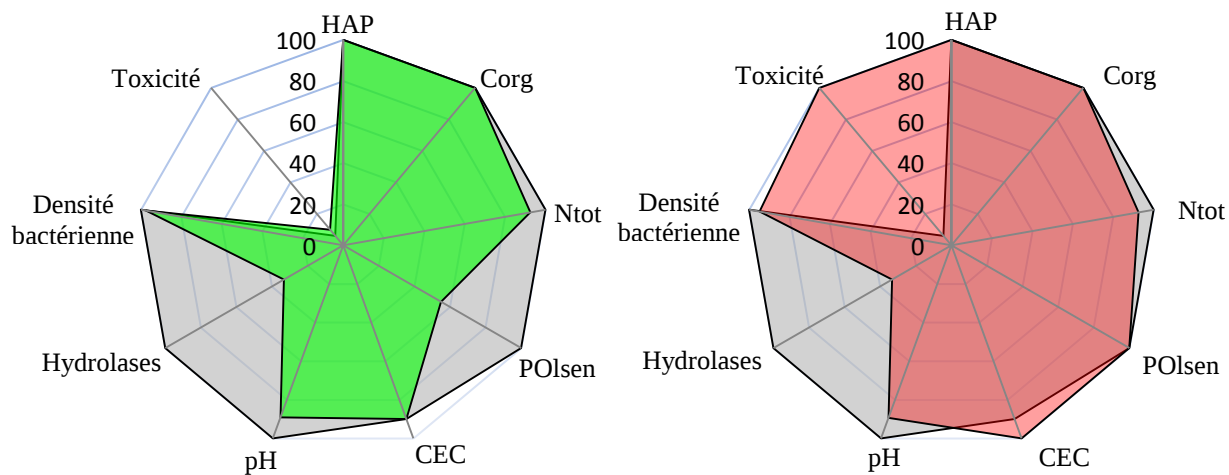
Les deux réactions d'oxydation ont conduit à une forte acidification de la terre *Ch* après traitement (Figure 24), ce qui avait également été montré dans le chapitre 3 ainsi que dans d'autres études (Ferguson et al., 2004) (Sirguy et al., 2008). Le pH des terres de friches industrielles (*NM* et *Ho*) a cependant peu diminué du fait de leurs teneurs en carbonates relativement élevées. Cependant, dans l'expérimentation du chapitre 3, une diminution du pH avait été observée pour la terre *NM*. Dans ce cas, la solution oxydante avait été ajoutée rapidement et en un seul apport, alors que dans l'expérimentation en colonne, l'apport a été fractionné et réalisé sur plusieurs heures, ce qui permet aux carbonates de tamponner le sol. Si les variations de pH pour les terres de friches industrielles étaient faibles, la forte acidification de la terre artificiellement contaminée a pu instaurer des conditions totalement défavorables à l'activité biologique.

La teneur en C_{org} a fortement diminué dans la terre polluée artificiellement mais n'a pas été affectée dans les terres de friches industrielles (Figure 24). Les oxydants sont non spécifiques des HAP et peuvent altérer des molécules carbonées autres que les polluants (Leifeld et Kögel-Knabner, 2001 ; Mikutta et al., 2005 ; Sirguy et al., 2008). Ce phénomène a été observé pour la terre *Ch* pour laquelle le C_{org} a diminué de 20 à 35 %. Ce C_{org} facilement accessible et d'origine naturelle a pu être dégradé par les molécules radicalaires générées par les processus d'oxydation. Cependant, cette diminution équivaut à une perte de 3 g kg⁻¹ de terre, qui serait non perceptible dans des terres de friches industrielles à des concentrations hétérogènes et proches de 100 g.kg⁻¹.

Terre artificiellement contaminée Ch



Terre de friches industrielles NM



Terre artificiellement contaminée Ho

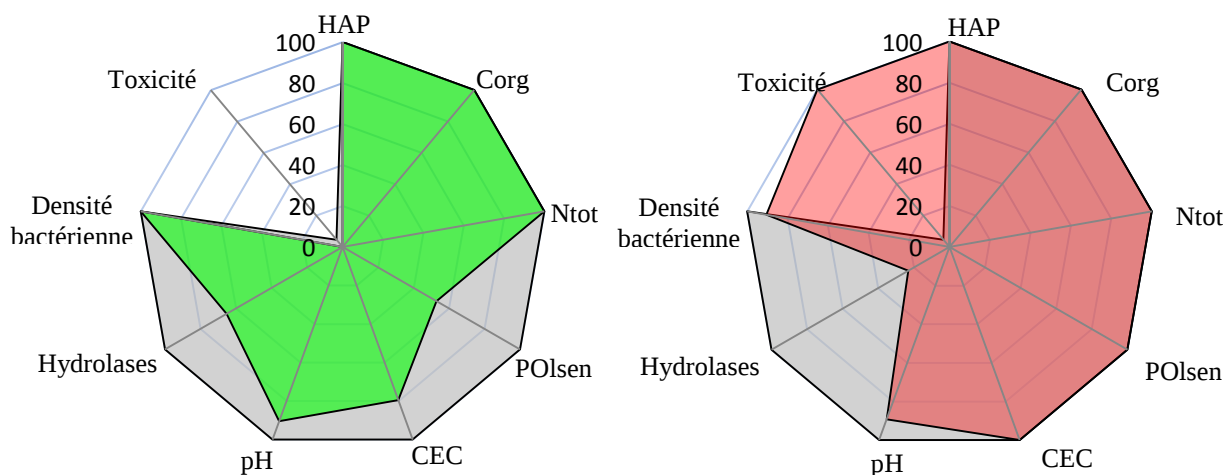


Figure 24 : Représentation en graphique radar des données de chaque paramètre mesuré pour les terres Ch, NM et Ho traité par la réaction de Fenton (vert), par persulfate activé (rouge) et par l'eau (gris). Les données sont exprimées en pourcentage par rapport aux valeurs maximales mesurées pour chaque paramètre, en tenant compte des tests statistiques. Les données pour la densité en microorganismes cultivables ont été transformées en log avant d'être retranscrites en pourcentage.

Il est alors possible qu'une certaine fraction du C_{org} « naturel » facilement disponible ait été dégradée dans les terres *NM* et *Ho* et que cette diminution ait été masquée par les fortes teneurs en C_{org} anthropique. Dans la terre *Ch*, si les 2 oxydants ont entraîné une diminution de la teneur en C_{org} , il semblerait toutefois que les radicaux oxygénés ($OH^\cdot$) aient eu un effet légèrement plus fort que les radicaux sulfates (SO_4^{2-}).

Une diminution des teneurs en N_{tot} a été observée pour les terres *Ch* et *NM* traitées par Fenton ou persulfate. Mikutta (2005) et Sirguez (2008) ont montré que le traitement des sols par du peroxyde d'hydrogène, entraînait des pertes en azote, la majeure partie de l'azote résiduel se trouvant sous forme inorganique et soluble dans l'eau. Au vu des résultats, les diminutions en azote total ne semblent pas corrélables, tout du moins d'une manière générale, au transfert en ions nitrates. On peut éventuellement supposer que pour la terre *NM*, l'augmentation de la teneur en nitrates dans les percolats après traitement par réaction de Fenton pourrait résulter de l'interaction de l'oxydant avec des molécules. Pour la terre *Ch*, une augmentation du transfert d'ions nitrates a pu être masquée par la forte teneur en sulfates présents dans les percolats qui perturbent le dosage des anions.

Sous l'effet des deux oxydants, la CEC a fortement diminué dans la terre artificiellement contaminée, mais pas dans les deux terres industrielles (Figure 24). Cette baisse de la CEC est en partie liée à la diminution du pH de la terre *Ch* traitée par oxydation (< 3). De plus, la baisse du pH et de la CEC a eu un impact direct sur les transferts dans les eaux des éléments majeurs et en traces (Tableau 19). En plus de la destruction de la matière organique qui représente un complexe d'échange majeur dans les sols, des protons se substituent aux cations sur le complexe d'échange induisant la lixiviation des cations majeurs et des éléments en traces. Le pH étant très bas, les aluminosilicates passent en solution et les ions Al^{3+} mobilisés peuvent ainsi être lixiviés (Girard et al., 2005 ; Lopes et al., 2008). La diminution de la CEC affecte la réserve en ions échangeables qui participent au potentiel de fertilité des sols. Contrairement au chapitre 3, où pour une même dose la CEC de la terre *NM* avait diminué, dans cette expérimentation aucune variation n'a été observée. Ceci est explicable par le pH, qui dans cette expérimentation n'a pas diminué contrairement à l'expérimentation du chapitre 3.

L'évolution de la teneur en P_{Olsen} après traitement par oxydation a varié en fonction des terres. Dans la terre *Ch*, elle a augmenté après oxydation par Fenton et persulfate et diminué dans les terres *NM* et *Ho* (après oxydation par Fenton). Son augmentation dans la terre *Ch* peut être expliquée par la minéralisation de certains hétéroatomes (atomes différents de C ou H comme par exemple O, N, S ou P) inclus dans la matière organique

(Sirguey et al., 2008). L'oxydation de ces composés a alors pu solubiliser du phosphore et le rendre extractible par la méthode Olsen. La mobilisation du phosphore pourrait être liée à l'acidification du milieu liée à l'oxydation, mais l'effet du pH sur la teneur en phosphore est largement controversé et semble dépendre de paramètres d'influences multiples (Dubus, 1997). Si les formes peu mobiles de P sont de type phosphates de fer ou d'alumine, la chute de pH, a pu entraîner la lixiviation de ces deux éléments métalliques et rendre une partie du P associé plus mobile (Tableau 19). Après traitement par persulfate, les teneurs en P extractible étaient plus élevées qu'après réaction de Fenton ce qui pourrait expliquer le transfert de P considérable (10% du total) mesuré dans les eaux de percolation. Les variables explicatives (*e.g.* pH, C_{org} , perte en aluminium ou fer) restant relativement comparables entre les 2 traitements, les données suggèrent que les mécanismes d'interactions du persulfate avec le P sont différents de ceux du réactif de Fenton. Concernant la diminution du P_{Olsen} dans les terres de friches industrielles traitées par réaction de Fenton la même observation avait été faite dans le chapitre 3 pour la terre *NM*. Il est connu que des terres à fortes concentrations en Fe et Ca peuvent être le siège de réactions d'adsorption ou de précipitation avec le P faisant ainsi varier sa disponibilité (Dubus, 1997). Eu égard au schéma réactif de l'oxydation, il est possible que des mécanismes de ce type provoquent une adsorption accrue de P (cas de *NM* traitée par réaction de Fenton). Par ailleurs, l'augmentation de la teneur en P extractible dans la terre *Ho* après traitement par le persulfate activé est difficilement explicable avec les seuls paramètres mesurés ici.

4.2 Impact de l'oxydation sur les fonctions biologiques

La densité bactérienne a surtout diminué dans la terre artificiellement contaminée par les deux oxydants, tandis que les deux oxydants ont eu un fort impact sur l'activité microbienne mesurée par l'activité des hydrolases dans les trois terres (Figure 24). Enfin, l'oxydation par persulfate a conduit à une forte toxicité mesurée par Microtox quelle que soit la terre, ce qui n'était pas le cas de l'oxydation par Fenton.

La diminution de la densité des bactéries cultivables après traitement par oxydation peut être imputable à plusieurs facteurs. Les radicaux libres ont pu dégrader les membranes cellulaires et causer la mort d'une partie de la microflore bactérienne (cf. Chapitre 3). Il est aussi possible que les variations de pH soient un élément explicatif dans la terre *Ch* où le pH a très fortement diminué. En effet, même si certaines bactéries adaptées à des milieux extrêmes sont acidophiles et peuvent se développer et/ou survivre à des pH proches de 1, la majorité des

microorganismes se développe à des pH compris entre 5 et 8 (Davet, 1996). Si la réaction de Fenton n'a pas toujours induit une diminution de la densité bactérienne, le traitement par persulfate a systématiquement diminué le nombre de bactéries cultivables et augmenté la toxicité mesurée par Microtox. Contrairement aux radicaux libres générés par la réaction de Fenton qui ont une durée de vie relativement courte (Sies, 1993), la persistance du persulfate confirmée par les fortes concentrations résiduelles dans les percolats peut expliquer cette forte toxicité. La toxicité mesurée dans les percolats pour les terres traitées par persulfate n'a pas pu être induite par l'acidité réelle des percolats, le test imposant de neutraliser les échantillons. Si certains éléments passés en solution peuvent participer à cette toxicité, les fortes concentrations en persulfate résiduel retrouvées dans les percolats restent l'explication la plus probable.

La mesure de l'activité des hydrolases est utilisée pour quantifier certaines activités microbiennes de dégradation extracellulaire (*e.g.* estérase, lipase, protéase). Leur diminution peut être due, soit à une destruction de cellules ou d'enzymes extracellulaires par les oxydants (les protéines pouvant être oxydées par les radicaux libres), soit à l'inhibition de ces enzymes. Parallèlement, il est possible que le persulfate ait eu un effet sur le fluorochrome utilisé pour mesurer l'activité des hydrolases. L'éventuel biais de la présence de persulfate résiduel dans le sol sur le protocole de mesure des activités hydrolases a été testé (cf. Annexe V). Nous avons montré une baisse de 30 % de l'efficacité des mesures en présence de persulfate. Malgré ce biais, les résultats indiquaient donc clairement une inhibition de l'activité des hydrolases dans les terres traitées par le persulfate activé. Dans la terre *Ch*, la diminution de la densité bactérienne par les traitements d'oxydation est en mesure d'expliquer en partie la forte diminution de l'activité des hydrolases. Cependant, pour les terres *NM* et *Ho* beaucoup moins impactées au niveau de la densité en bactéries cultivables, il semblerait que la baisse d'activité enzymatique puisse être majoritairement expliquée par l'effet des oxydants sur la concentration initiale en enzyme extracellulaire ou bien par une inhibition de l'activité des bactéries restantes après le traitement.

4.3 Evolution de la teneur en HAP dans les terres oxydées en conditions insaturées

La dégradation des HAP par oxydation chimique n'a été effective que dans la terre *Ch* traitée par réaction de Fenton (Figure 24). Le rendement de dégradation obtenu sur cette terre artificiellement contaminée (50 %) a été 2,5 fois supérieur à celui obtenu (20 %) dans le

chapitre précédent sur une terre à pollution historique aux caractéristiques très contrastées et est comparable à d'autres résultats obtenus en batch ou en colonnes (Kulik et al., 2006 ; Nam et al., 2001 ; Palmroth et al., 2006b). Dans notre cas, la dégradation efficace mesurée sur une terre contaminée artificiellement par deux HAP, à 3 et 4 cycles, 24 heures avant l'oxydation par Fenton pourrait s'expliquer par la forte disponibilité des HAP (faible association avec les complexes organo-minéraux due au temps de contact court des HAP avec la terre).

Contrairement aux résultats du chapitre précédent, aucune dégradation n'a été mesurée dans la terre industrielle contaminée *NM* après traitement par réaction de Fenton. Il est à souligner que la maîtrise des conditions d'oxydation entre les deux expériences n'a pas été identiques. Les conclusions sont donc à nuancer lorsque l'on tend à comparer les deux expérimentations. Dans cette expérimentation, l'hypothèse (émise dans le chapitre 3) d'une meilleure dégradation suite à des apports réguliers et fractionnés d'oxydant, afin de favoriser le contact oxydant/polluant, ne semble pas validée. Cependant, l'évolution du pH, seul paramètre distinctif entre les 2 expériences, pourrait expliquer ce résultat. En effet, la réaction de Fenton est favorisée en conditions acides (Huling et Pivetz, 2006), même si elle reste réalisable à pH neutre (Nam et al., 2001 ; Palmroth et al., 2006b). Contrairement à la diminution de pH obtenue dans l'expérience en batch, qui a pu optimiser les conditions réactionnelles du Fenton (Chapitre 3), aucune acidification n'a été constatée ici. Les résultats obtenus sur la terre *Ho* sont identiques à ceux obtenus pour *NM*. Les mêmes différences avec la terre polluée artificiellement pourraient être expliquées par le « vieillissement » de la pollution historique et le pouvoir tampon du sol.

Aucune dégradation des HAP sur les terres n'a été détectée avec le persulfate activé par le peroxyde d'hydrogène. Il est possible que le temps de passage du persulfate dans la colonne n'ait pas été assez long pour permettre l'activation par le peroxyde d'hydrogène. Cette hypothèse est appuyée par les fortes concentrations en persulfate retrouvées dans les eaux de percolations, qui démontrent que la moitié du persulfate n'a pas réagi avec la terre.

5. Conclusion

Cette expérimentation en colonne a permis de montrer des impacts différents de l'oxydation en fonction à la fois de l'oxydant utilisé et des caractéristiques physico-chimiques des terres traitées. De manière générale, l'impact mesuré sur les deux terres de friches industrielles carbonatées est relativement identique et faible alors que l'impact sur la terre artificiellement contaminée non carbonatée est très élevé. En résumé :

- L'impact de l'oxydation sur les caractéristiques physico-chimiques dépend des propriétés initiales de la terre. Cet impact est d'autant plus élevé que la terre ne présente qu'un faible pouvoir tampon. Les terres dont le pH diminue fortement présentent une très faible activité biologique après oxydation.
- L'impact de l'oxydation varie avec l'oxydant utilisé. Le traitement par persulfate activé a un impact plus fort sur les fonctions biologiques que la réaction de Fenton quelles que soient les propriétés physico-chimiques de la terre. Par ailleurs, il induit une toxicité résiduelle systématique dans les percolats, quelle que soit la terre traitée.
- Le taux de dégradation des HAP par la réaction de Fenton atteint 50 % pour la terre artificiellement contaminée, où les HAP sont plus disponibles, alors que dans les terres de friches industrielles aucune dégradation n'a été observée. Le traitement par persulfate activé n'a pas entraîné de dégradation des HAP dans les trois terres, que les HAP soient disponibles ou non.
- L'apport fractionné des oxydants n'a pas permis d'améliorer le rendement de dégradation. Au contraire, avec les apports fractionnés, la capacité du sol à tamponner les variations de pH est améliorée et semble être défavorable à la dégradation des HAP.
- L'oxydation a conduit à des pertes en éléments en traces métalliques et en éléments majeurs. L'effet est essentiellement observable sur la terre *Ch*, ayant subi une forte acidification, et particulièrement fort après traitement par persulfate activé.

CHAPITRE 5 – Etude en vases de végétation de la refonctionnalisation par des amendements de deux terres oxydées

1. Introduction

Dans les chapitres précédents, il a été montré que l'oxydation chimique avait un impact sur les caractéristiques et les fonctions du sol, qui pouvait être plus ou moins considérable selon le type de terre traitée, et selon l'oxydant utilisé. Si l'oxydation semblait avoir un effet relativement faible sur le fonctionnement de terres carbonatées, il en était tout autre pour la terre non carbonatée. Il a aussi été déterminé que l'évolution du pH contribuait fortement à cet impact. Dans certains cas, l'évolution des caractéristiques physico-chimiques de la terre oxydée ne permettait plus d'avoir des conditions favorables au développement d'une activité biologique. Dans ces chapitres, l'impact de l'oxydation a été évalué à court terme, et l'évolution des différents paramètres altérés suite à l'oxydation n'a pas été suivie au cours du temps.

Afin de restaurer les propriétés et le fonctionnement des terres, la construction de technosols avec ajout de matériaux technogéniques peut être utilisée (Séré et al., 2008). Ainsi des apports d'amendements ont été envisagés pour améliorer les paramètres impactés (pH, Corg, densité et activité microbienne) des terres oxydées. Dans ce chapitre, les objectifs étaient de:

- Déterminer si l'apport de matériaux technogéniques et d'une végétation permettait la restauration des caractéristiques physicochimiques et biologiques et des fonctions des terres impactées par l'oxydation
- Prendre en compte l'effet temporel de l'oxydation et des amendements sur les caractéristiques et les fonctions des terres
- Observer si des mécanismes de biodégradation des HAP pouvaient se mettre en place au cours du temps et suite à l'oxydation, comme certains auteurs l'ont montré (Kulik et al., 2006 ; Nam et al., 2001)

Pour répondre à ces questions, une expérience en vases de végétation a été réalisée avec les deux terres présentant un comportement différent vis-à-vis de l'oxydation chimique (*Ch* et *NM*). Elles ont oxydées par réaction de Fenton, puis amendées avec des matériaux (compost

mixe de déchets verts/boues de STEP et boues de papeteries) en proportions différentes et plantées. Les fonctions biologiques (activités, densités et diversités microbiennes, biomasse des plantes) et des paramètres physico-chimiques (pH, teneurs en C_{org} , N_{tot} , P_{Olsen} , CEC, structure) ont été mesurés avant et après oxydation, avant et juste après amendement, puis après 5 mois de culture.

2. Matériel et méthodes

2.1 Préparation des terres

La terre *Ch* a été contaminée comme décrit dans le chapitre 2. Pour des raisons de quantité, trois sous lots de 1 kg de terre ont été contaminés à $10\,000\text{ mg.kg}^{-1}$ (PYR et PHE en proportion 50 : 50) et mélangés à 3 sous lots de 9 kg de terre non contaminée. Les trois sous-lots de 10 kg ont ensuite été rassemblés afin d'avoir un lot commun de 30 kg présentant une concentration théorique de 1000 mg.kg^{-1} .

2.2 Protocole d'oxydation chimique

La quantité de terre nécessaire pour cette expérience étant supérieure à 20 kilos, l'oxydation a été réalisée, en collaboration avec S.Guimont (Valterra), dans un malaxeur avec un bras rotatif couplé à une couronne d'injection pour traiter 30 kilos de terres artificiellement contaminée *Ch* et 30 kilos de terre issue de friches industrielles *NM* (cf. Cf.2§1.1.2). Les lots de terres ont été préalablement tamisés à 5 mm. L'oxydation s'est déroulée en 3 phases (Tableau 21), chaque phase étant constituée d'une alternance d'injection d' H_2O_2 et de $FeSO_4$. Afin d'éviter la formation d'une boue, le volume utilisé pour l'oxydation a été limité ($\approx 6,3$ litres au total pour 30 kg). Pour la phase 1 des concentrations élevées et un faible volume ont été utilisés. Cependant, la terre se compactant sous l'effet de l'oxydation le volume injecté a été augmenté afin d'améliorer le contact entre oxydant et terre. La concentration pour la phase 2 a donc été diminuée. Pour la phase 3, les conditions de l'oxydation ont été les mêmes que pour la phase 1. La quantité finale d'oxydant réellement injectée correspondait approximativement à 45 g de peroxyde d'hydrogène par kilogramme de sol, ce qui était proche de la dose utilisée dans le chapitre précédent (50 g.kg^{-1}).

Une fois oxydées, les terres ont été séchées à 20°C sous étuve ventilée afin de présenter une teneur en eau inférieure à 10 % et ont été une nouvelle fois tamisées à 5 mm.

Tableau 21 : Paramètres d'oxydation en malaxeur pour les terres artificiellement contaminée (*Ch*) et la terre de friche industrielle (*NM*)

		FeSO ₄ , 7H ₂ O				H ₂ O ₂			
		concentration	volume	débit	dose totale	concentration	volume	débit	dose totale
		mol.L ⁻¹	L	L.h ⁻¹	g.kg ⁻¹	mol.L ⁻¹	L	L.h ⁻¹	g
<i>NM</i>	phase 1	1,08	0,52	2,6	466,23	11,63	1,13	1,8	1351,14
	phase 2	0,5	1,18	1,9		7,35	1,84	1,6	
	phase 3	1,08	0,52	0,9		11,63	1,12	1,7	
<i>Ch</i>	phase 1	1,08	0,52	1,2	466,59	11,63	1,1	2,0	1375,08
	phase 2	0,5	1,18	2,5		7,35	1,7	2,05	
	phase 3	1,08	0,53	2,3		11,63	1,3	1,8	

2.3 Protocole de refonctionnalisation

2.3.1 Choix des amendements

Le choix des matériaux pour les amendements a reposé sur les données acquises et les travaux de Séré et al. (2007). La thèse de Geoffroy Séré (2007) avait ainsi mis en évidence les potentiels fertiles, structurant, hydriques ou tampon de différents matériaux comme les sous-produits papetiers et les composts mixtes de déchets verts/boues de STEP, et des résultats prometteurs avec ces matériaux concernant la refonctionnalisation de terres traitées par désorption thermique. Les sous-produits papetiers contiennent aussi une forte teneur en carbonate (cf. Ch2§1.2.2), susceptible de faire évoluer le pH du sol. Le compost de déchets verts et les sous-produits papetiers sont aussi source de carbone et d'énergie pour l'activité microbienne. Ces deux matériaux ont ainsi été choisis pour les amendements. La proportion de matériaux à apporter a fait l'objet de tests préliminaires avec des terres oxydées selon le protocole décrit plus haut et mélangées avec différentes proportions en boues de papeteries ou de compost, préalablement tamisés à 5 mm (Figure 25). Les proportions ont été exprimées en poids sec pour chaque matériau du mélange. Le paramètre mesuré a été le pH.

En fonction de ces essais préliminaires (Figure 25), les proportions retenues pour l'expérience en pots ont ainsi été 8,5 % de boues de papeterie et 5 % de compost, permettant la remontée des valeurs de pH autour de 6,5, et un ajout de 31 % de boues de papeterie et 5 % de compost permettant d'atteindre des valeurs de pH autour de 7. Ces deux proportions en SPP ont été utilisées pour la terre *Ch* afin d'observer un éventuel effet dose d'amendement. En ce qui concerne la terre *NM* oxydée, le pH n'avait que très peu diminué après oxydation. Ainsi, seul le plus faible amendement a été utilisé.

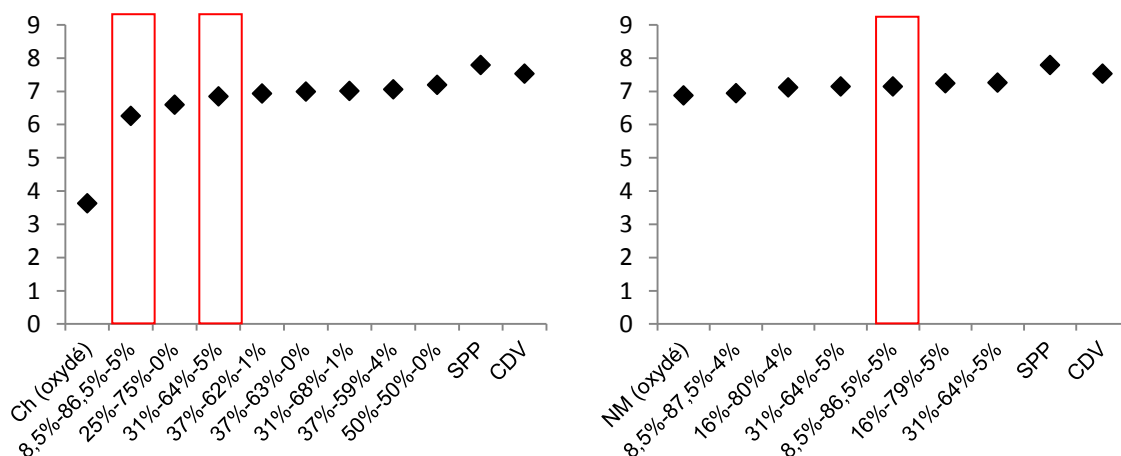


Figure 25 : Evolution du pH en fonction de la quantité d'amendement dans les terres artificiellement contaminée (Ch) et industrielle (NM) oxydées par réaction de Fenton. Les proportions en matériaux sont représentées en %SPP-%Terre oxydée (TO)-%CDV. Les proportions entourées en rouge sont les proportions utilisées dans cette expérimentation

2.4 Plan expérimental et analyses

2.4.1 Mise en place expérimentale

L'incorporation des matériaux d'amendement aux terres oxydées a été réalisée juste après le tamisage des terres, et sur la base de la matière sèche. Les mélanges ont été réalisés dans des bacs en plastiques par retournement à la main pendant 15 min. Les différents mélanges (équivalent à 750 g sec) ont ensuite été placés dans des pots de culture de 1L (Ch2§1.3.1.3) en chambre de culture, en conditions contrôlées (24°C jour/20°C nuit, cycle jour nuit 16h/8h, luminosité 250 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$). Deux mois après la mise en pots des terres, un semis de dix graines de ray-grass et cinq graines de trèfle nain blanc par pot a été effectué (Figure 26), et après quelques jours seules cinq plantules de ray-grass et deux plantules de trèfle nain blanc ont été laissées dans les pots. Les différentes modalités, terres témoin, oxydées, et amendées avec un (NM) ou deux (Ch) niveaux d'amendement, les différents temps de prélèvements, le nombre de répétitions par modalité, ainsi que les abréviations correspondantes utilisées sont présentées dans le tableau 22 et la figure 26.

Les pots ont été arrosés quotidiennement avec de l'eau déminéralisée pour les maintenir à 70 % de la capacité de rétention en eau. L'arrosage a été arrêté une semaine avant l'arrêt de l'expérience pour faciliter la récolte de la terre et des racines (Ch2§2.4.6.2).

Tableau 22 : Abréviations utilisées pour les différentes modalités

Terre de Chenevières	
Ch	Terre de Ch artificiellement contaminée avant traitement par oxydation
Ch(Ox)	Ch après traitement par oxydation
Ch(OxSPP8)	Ch après traitement par oxydation et amendement : 8,5 % de boue de papèterie et 5 % de compost
Ch(OxSPP31)	Ch après traitement par oxydation et amendement : 31 % de boue de papeterie et 5 % de compost
Terre de Neuves-Maisons	
NM	Terre de NM avant traitement par oxydation (contamination historique en HAP)
NM(Ox)	NM après traitement par oxydation
NM(OxSPP8)	NM après traitement par oxydation et amendement : 8,5 % de boue de papeterie et 5 % de compost

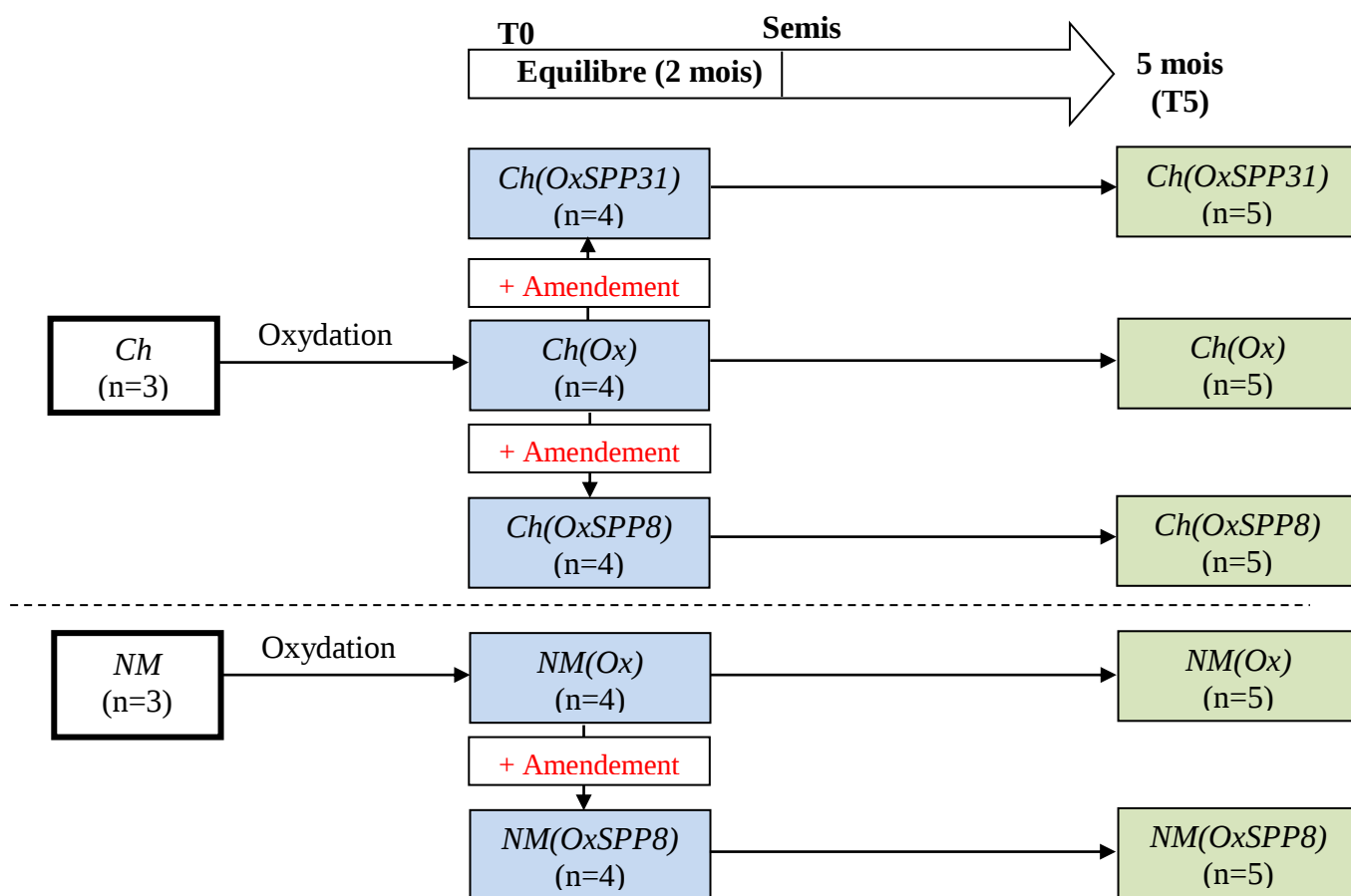


Figure 26 : Plan expérimental et modalités étudiées (n= nombre de répétitions par modalités)

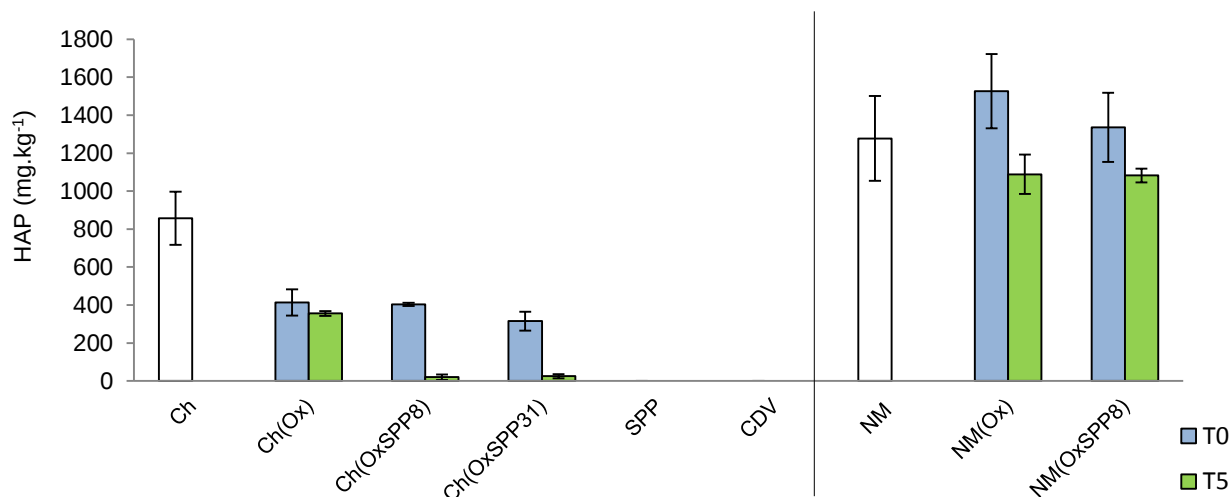
2.4.2 Analyses

Pour les prélèvements à T0, et à T5, un pot de chaque modalité a été réservé pour réaliser des lames minces et analyser la porosité. Les autres pots ont été utilisés pour les analyses biologiques et physico-chimiques. Pour les modalités plantées (T5), la biomasse des parties racinaires et aériennes a été mesurée (Ch2§2.4.6). Les analyses de densité et de diversité des communautés bactériennes et fongiques ont été réalisées par PCR en temps réel et par TTGE (Ch2§2.4.4). La minéralisation du carbone a été évaluée par des incubations pendant 24 h et mesures de dégagement de CO₂ (Ch2§2.4.1). Dans cette expérimentation, en plus de la mesure des activités des hydrolases, les activités des cellobiohydrolases et des aminopeptidases ont été mesurées (Ch2§2.4.2.2), pour cibler des activités liées aux cycles du carbone et de l'azote. En parallèle, les propriétés physico-chimiques (C_{org}, N_{tot}, P_{Olsen}, CEC, bases échangeables, pH) et les teneurs en HAP des différentes modalités ont été suivies (Ch2§2.3.1). La porosité dans les échantillons a été évaluée à partir d'une analyse des lames minces, en collaboration avec N.Salifou, qui a développé cette technique dans sa thèse et notamment le traitement numérique des lames minces (Ch2§2.3.1.2).

3. Résultats

3.1 Teneurs en HAP

Avec la terre artificiellement contaminée, une diminution de 48% de la concentration initiale en HAP a été observée après oxydation (Figure 27). Le phénanthrène et le pyrène ont été dégradés dans les mêmes proportions (*données non présentées*). Dans la terre oxydée et amendée avec 31% (*Ch(OxSPP31)*) ou 8% (*Ch(OxSPP8)*) de boues de papeteries, les concentrations en HAP ont diminué respectivement, de 92 et 95 % entre les prélèvements à T0 et à T5. Pour la terre oxydée *Ch(Ox)*, aucune évolution significative de la teneur en HAP n'a été observée entre T0 et T5 (Figure 27). Dans la terre de Neuves-Maisons (*NM*) l'oxydation n'a pas entraîné de baisse significative de la concentration en HAP (Figure 27). Cependant, après 5 mois, les concentrations ont diminué significativement dans la terre oxydée *NM(Ox)* et dans la terre amendée *NM(OxSPP8)*, avec un abattement respectif de 29 % et de 19 %.



	Ch	Ch(Ox)		Ch(OxSPP8)		Ch(OxSPP31)		NM	NM(Ox)		NM(OxSPP8)	
		T0	T5	T0	T5	T0	T5		T0	T5	T0	T5
Effet traitement	*							n.s				
Effet modalités		B		B		B			A		A	
Effet temps		n.s		*		*			*		*	

Figure 27 : Concentrations en HAP dans les terres avant traitement (Ch) et (NM), traitées par oxydation (Ch(Ox), NM(Ox)) et amendées (Ch(OxSPP8), Ch(OxSPP31), NM(OxSPP8)) au temps initial (T0) et après 5 mois (T5) et dans les matériaux amendés (SPP et CDV) (moyenne et écart-type, n=4). Le tableau présente les résultats des analyses statistiques (lettre et *) de l'effet des modalités et du temps réalisées par Anova à deux facteurs ($p < 0,05$) et de l'effet traitement réalisée par test t ($p < 0,05$) (n.s : non significatif).

3.2 Biomasse racinaire et foliaire

3.2.1 Biomasse

La germination des graines de ray-grass et de trèfle blanc a été inhibée sur la terre Ch(Ox), ainsi aucune biomasse n'a été obtenue (Figure 28), mais l'apport d'amendement dans la terre Ch(Ox) a permis la germination des graines semées. La quantité d'amendement a eu un effet significatif sur la biomasse végétale produite: ainsi la biomasse foliaire et racinaire était significativement plus faible avec la modalité Ch(OxSPP31) que pour la modalité Ch(OxSPP8) (Figure 28). La végétation s'est développée sur la terre NM(Ox), mais la biomasse racinaire et foliaire était significativement plus faible dans la terre amendée NM(OxSPP8) que dans la terre oxydée NM(Ox) (Figure 28).

Alors que les résultats exprimés en matière sèche indiquaient un développement de la végétation plus important sur Ch(OxSPP8) que sur Ch(OxSPP31), les rapports « masse fraîche /masse sèche» (Tableau 23) étaient plus importants pour la modalité la plus amendée Ch(OxSPP31). Il en est de même pour la terre de Neuves-Maisons, les parties aériennes de la modalité NM(OxSPP8) ayant présenté une teneur en eau plus élevée que celles récoltées sur la modalité NM(Ox).

Tableau 23 : Rapports « masses fraîches/masses sèches » des parties aériennes après 3 mois de culture sur les terres oxydées (*Ch(Ox)*, *NM(Ox)*) et amendées *Ch(OxSPP8)*, *Ch(OxSPP31)*, *NM(OxSPP8)*)

Rapports masses fraîches /masses sèches			
<i>Ch(OxSPP8)</i>	<i>Ch(OxSPP31)</i>	<i>NM(Ox)</i>	<i>NM(OxSPP8)</i>
2,92	3,63	2,41	3,1

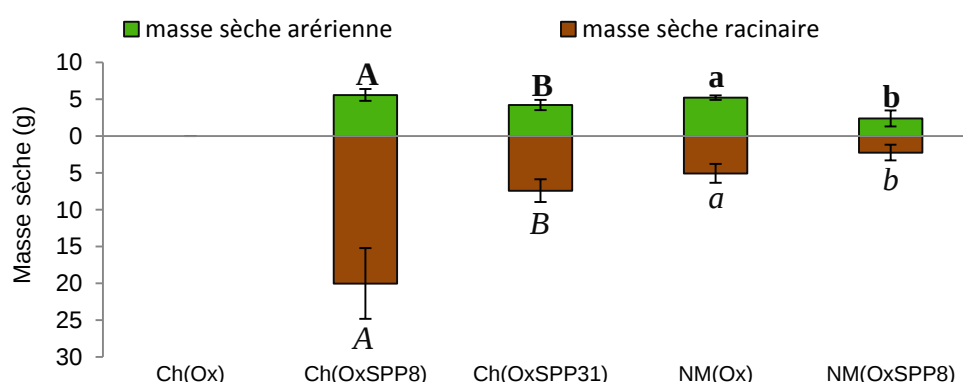


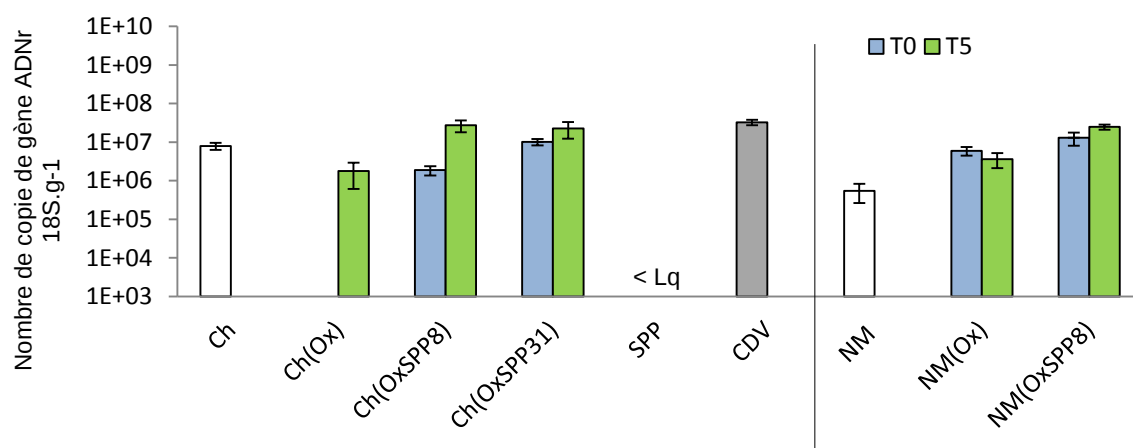
Figure 28 : Matière sèche des parties aériennes et racinaires (moyenne et écart-type, n=4) des plantes après 3 mois de culture sur les terres traitées par oxydation et amendées. Les catégories de lettres représentent les résultats des tests statistiques pour les parties aériennes et racinaires ($p < 0,05$)

3.3 Paramètres biologiques

3.3.1 Densités et diversités microbiennes

3.3.1.1 Quantification de la densité fongique

Le nombre de copies de gène d'ADNr 18S dans la terre *Ch* a fortement diminué après oxydation par réaction de Fenton et se situait en dessous de la limite de quantification (Figure 30). L'apport de matériaux d'amendement a permis d'augmenter le nombre de copies de gène 18S de manière proportionnelle à la quantité apportée. Une augmentation significative du nombre de copies de gène a été observée au cours du temps dans la modalité *Ch(Ox)*. De même, le nombre de copies de gène d'ADNr18S mesuré dans *Ch(OxSPP8)* et *Ch(OxSPP31)* a augmenté significativement et respectivement d'un facteur 14 et 2 entre T0 et T5. Pour la terre *NM*, le nombre de copies de gène d'ADNr 18S a augmenté après oxydation. L'apport de compost a aussi permis de doubler significativement le nombre de copies de ce gène dans *NM(OxSPP8)* par rapport à *NM(Ox)*. La quantité de copies de gène pour ces deux modalités n'a cependant pas varié avec le temps.



	Ch	Ch(Ox)		Ch(OxSPP8)		Ch(OxSPP31)		NM	NM(Ox)		NM(OxSPP8)	
		T0	T5	T0	T5	T0	T5		T0	T5	T0	T5
Effet traitement	*							*				
Effet modalités		A		B		B			A		B	
Effet temps		*		*		*			n.s		n.s	

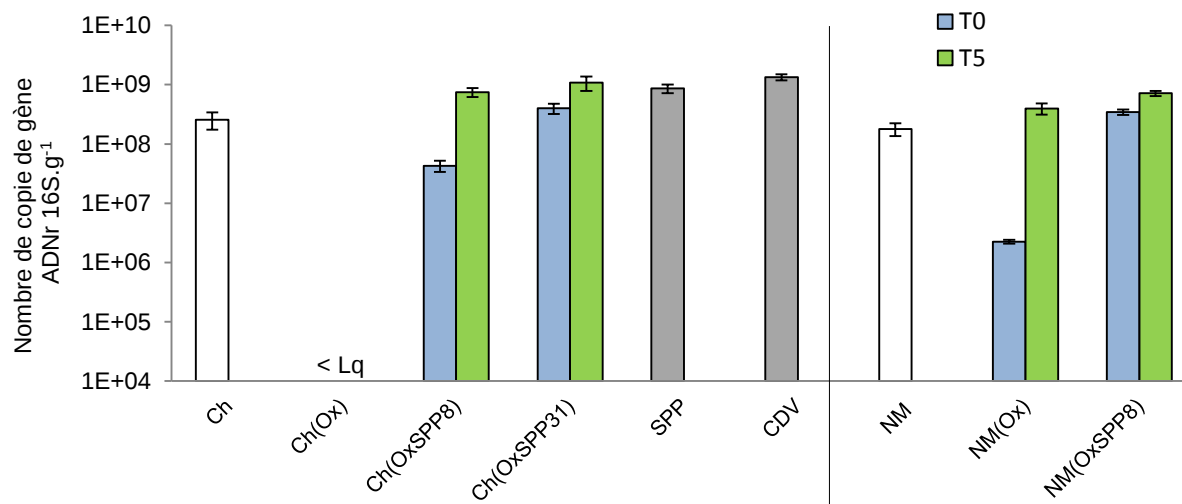
Figure 29 : Nombre de copies de gène d'ADNr18S dans les terres avant traitement (Ch) et (NM), oxydées (Ch(Ox), NM(Ox)) et amendées (Ch(OxSPP8), Ch(OxSPP31), NM(OxSPP8)) au temps initial (T0) et après 5 mois (T5) ainsi que dans les matériaux d'amendement (SPP et CDV) (moyenne et écart-type, n=3 (T0) et n=4 (T5)). La limite de quantification (Lq) est à 10³ copies de gène par gramme. Le tableau présente les résultats des analyses statistiques (lettre et *) de l'effet des modalités et du temps réalisées par Anova à deux facteurs (p<0,05) et de l'effet traitement réalisée par test t (p<0,05) (n.s : non significatif).

3.3.1.2 Quantification de la densité bactérienne

Dans la terre Ch(Ox), le nombre de copies de gène d'ADNr 16S était à la limite de quantification et n'a donc pas pu être quantifié (Figure 30), que ce soit au moment de la mise en place de l'expérimentation ou après 5 mois. Les matériaux d'amendements, SPP et CDV, contenaient un nombre élevé de copies de gènes (10⁹ copies de gène.g⁻¹). L'ajout de ces matériaux à la terre Ch(Ox) a ainsi augmenté significativement la densité du nombre de copies de gène d'ADNr 16S. Au cours des 5 mois, le nombre de copies de gène dans les modalités Ch(OxSPP8) et Ch(OxSPP31) a augmenté significativement et respectivement d'un facteur 20 et 2.

Pour la terre NM et par rapport aux valeurs mesurées avant traitement, l'oxydation par réaction de Fenton a induit une diminution significative du nombre de copies de gène d'ADNr 16S d'un facteur 100 (Figure 30). Comme pour Ch(Ox) l'ajout de matériaux d'amendement a augmenté le nombre de copies de gène, ainsi, à T0, la densité mesurée dans la modalité NM(OxSPP8) était proche de 10⁸ copies.g⁻¹. Au cours du temps, les densités bactériennes ont évolué significativement. Après 5 mois, pour la modalité sans amendement NM(Ox), le nombre de copies de gène d'ADNr 16S était supérieur d'un facteur 100 à celui mesuré à T0 et

relativement proche de celui mesuré dans la terre *NM*. Pour la modalité amendée, *NM(OxSPP8)*, cette augmentation a été plus faible, car, entre T0 et T5 le nombre de copies de gène ADNr 16S a significativement doublé.



	Ch	Ch(Ox)		Ch(OxSPP8)		Ch(OxSPP31)			NM	NM(Ox)		NM(OxSPP8)	
		T0	T5	T0	T5	T0	T5			T0	T5	T0	T5
Effet traitement	*								*				
Effet modalités				A		B				A		B	
Effet temps				*		*				*		*	

Figure 30 : Nombre de copies de gène d'ADNr16S dans les terres avant traitement (*Ch*) et (*NM*), oxydées (*Ch(Ox)*, *NM(Ox)*) et amendées (*Ch(OxSPP8)*, *Ch(OxSPP31)*, *NM(OxSPP8)*) au temps initial (T0) et après 5 mois (T5) ainsi que dans les matériaux d'amendement (SPP et CDV) (moyenne et écart-type, n=3 (T0) et n=4 (T5)). La limite de quantification (Lq) est à 10^3 copies de gène par gramme. Le tableau présente les résultats des analyses statistiques (lettre et *) de l'effet des modalités et du temps réalisées par Anova à deux facteurs ($p < 0,05$) et de l'effet traitement réalisées par test t ($p < 0,05$) (n.s : non significatif).

3.3.1.3 Diversité bactérienne

L'ADNr 16S n'a pu être amplifié par la technique de PCR pour la modalité *Ch(Ox)*, la structure des communautés bactériennes de *Ch(Ox)* n'a donc pas pu être déterminée par TTGE. Pour les autres modalités, l'analyse en composantes principales (ACP) des données de TTGE montre une différenciation entre *Ch(OxSPP8)*, *Ch(OxSPP31)* et *Ch*, mais aussi entre les matériaux d'amendement SPP et CDV (Figure 31, a). L'axe 1 qui explique 42 % des différences de structure des communautés sépare la terre contaminée des terres oxydées et amendées. L'axe 2 montre que la structure des communautés bactériennes des deux types de matériaux était très différente et que leur proportion dans les terres amendées a influencé aussi significativement la structure des communautés dans la terre amendée. En effet, la structure des communautés dans *Ch(OxSPP31)* était plus proche de celle du SPP que celle de *Ch(OxSPP8)*, elle-même plus proche de celle du CDV.

L'ACP et le test de k-means ont permis de rassembler des observations en différents groupes. Ces analyses réalisées avec les données acquises à T0 et T5 montrent une évolution de la structure des communautés bactériennes au cours du temps (entre T0 et T5) selon l'axe 1 (Figure 31, b), que ce soit pour la modalité *Ch(OxSPP8)* ou *Ch(OxSPP31)*. L'indice de diversité de Shannon-Weaver n'a augmenté que dans la modalité la plus amendée, traduisant une augmentation de la diversité dans ces échantillons.

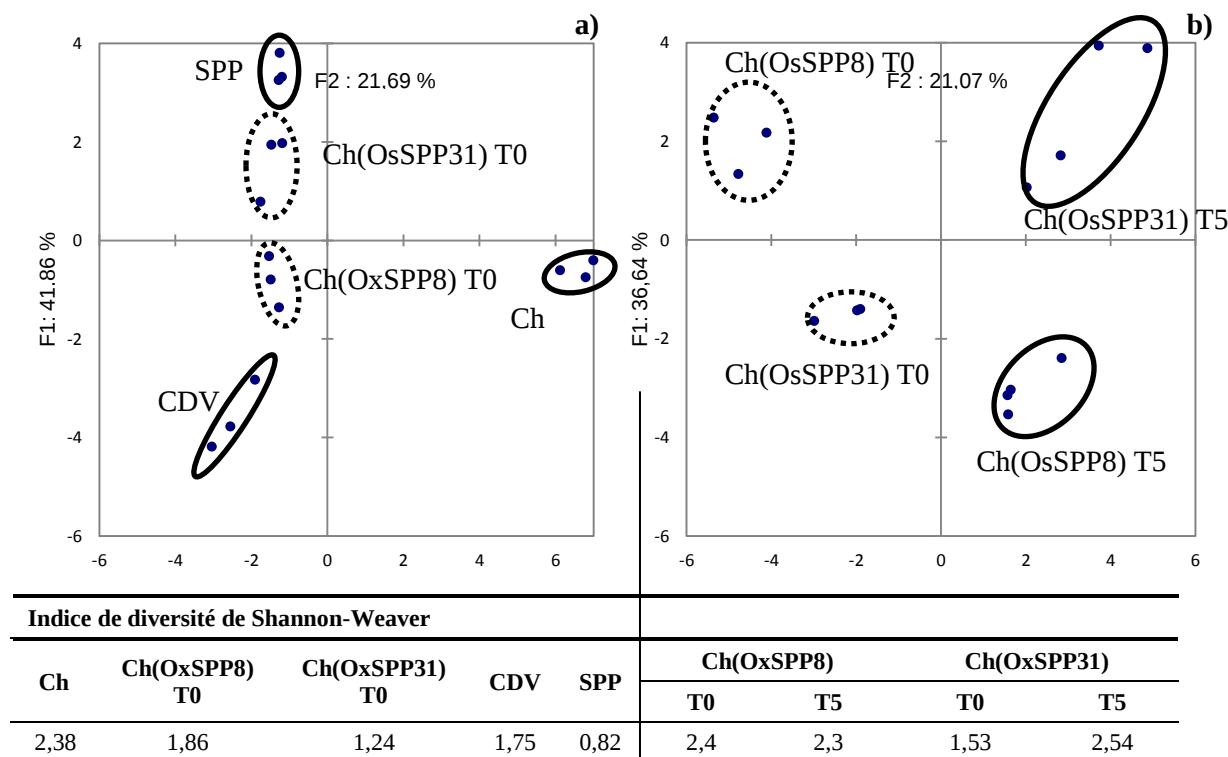


Figure 31 : Analyse en composantes principales de la structure des communautés bactériennes analysées par TTGE pour la terre de Chenevières. (a) Matériaux d'amendements et modalités à T0 (15 observations et 25 variables) , (b) Modalités à T0 et T5 (14 observations et 31 variables). Le tableau présente les indices de diversité bactérienne. Les cercles représentent les groupes déterminés par classification hiérarchique de type k-means

Pour la modalité *NM(Ox)* et pour les prélèvements à T0 seules deux répétitions ont pu être analysées en PCR-TTGE à cause de difficultés rencontrées lors de l'amplification de l'ADNr 16S. Tout comme pour les analyses concernant les modalités avec la terre *Ch*, les ACP montrent une forte discrimination de la structure des communautés bactériennes des modalités oxydées et amendées par rapport à la terre initiale (selon l'axe 1) et aux matériaux amendés (selon l'axe 2) (Figure 32, a). Le profil des communautés de *NM(OxSPP8)* était situé entre ceux de SPP et CDV. Entre T0 et T5, les profils des communautés des modalités *NM(Ox)* et *NM(OxSPP8)* ont évolué différemment (Figure 32, b) avec une augmentation systématique de l'indice de Shannon-Weaver.

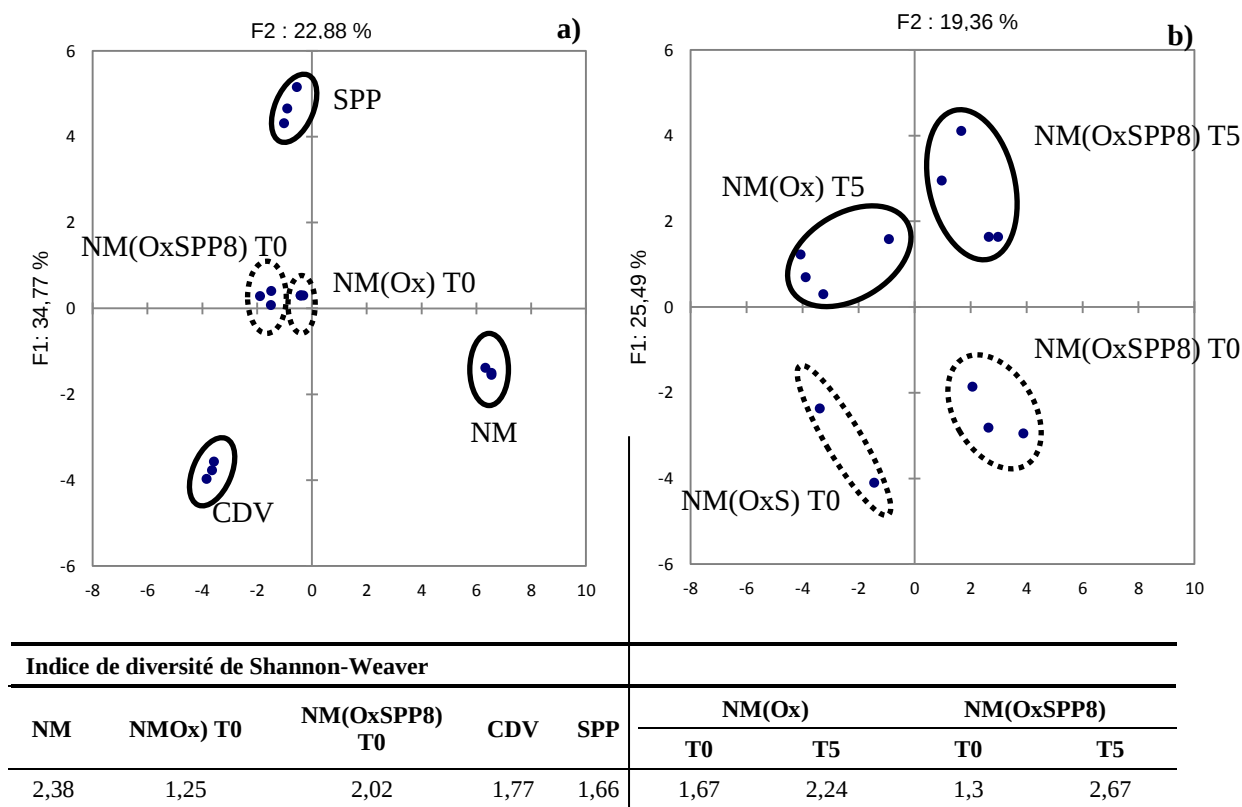


Figure 32 : Analyse en composantes principales de la structure des communautés bactériennes analysées par PCR-TTGE pour la terre de Neuves-Maisons. (a) Matériaux d'amendements et modalités à T0 (15 observations et 34 variables), (b) Modalités à T0 et T5 (13 observations et 31 variables). Le tableau représente la diversité bactérienne. Les cercles représentent les groupes déterminés par classification hiérarchique de type k-means.

3.3.2 Activité biologique

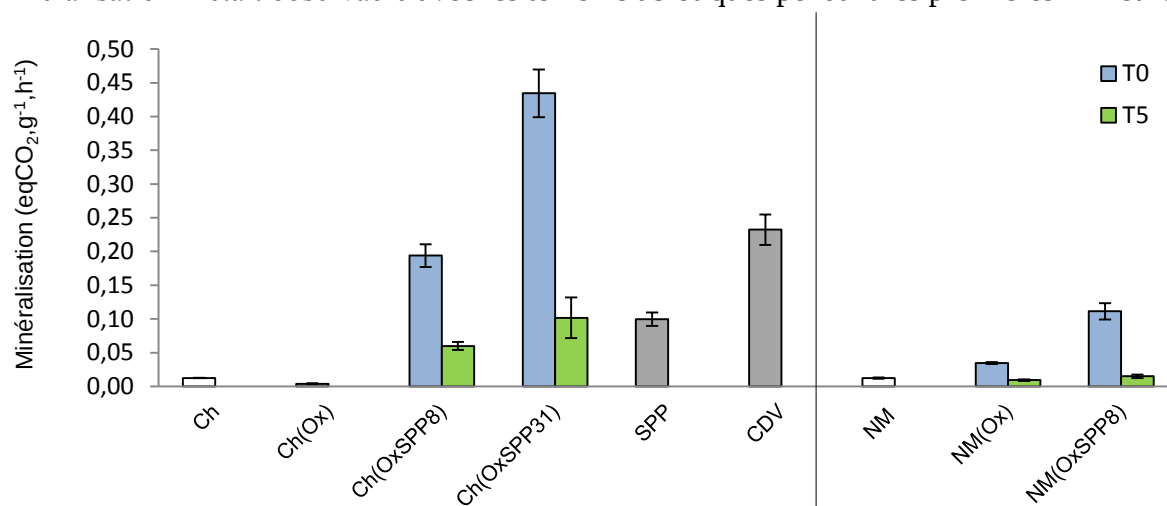
3.3.2.1 *Mesure de minéralisation*

Concernant les matériaux d'amendement, la minéralisation mesurée dans CDV était 2,3 fois supérieure à celle du SPP (Figure 33).

Après oxydation par réaction de Fenton, une baisse significative de 30 % de la minéralisation a été observée pour la terre *Ch*. Par rapport à la terre oxydée *Ch(Ox)*, l'apport d'amendements a augmenté significativement les valeurs de minéralisation, d'un facteur 48 pour *Ch(OxSPP8)* et 108 fois pour *Ch(OxSPP31)*. La minéralisation mesurée à T0 dans *Ch(OxSPP8)* était ainsi 16 % plus faible que celle mesurée dans le compost et 2 fois plus forte que celle mesurée dans le SPP. La minéralisation mesurée dans *Ch(OxSPP31)* était environ 2 fois plus forte que celle du compost et 4 fois plus forte que celle du SPP. Entre T0 et T5, la minéralisation a cependant significativement diminué dans les modalités amendées (Figure 33). Pour *Ch(OxSPP31)* une diminution de 76 % a été observée contre 70 % pour *Ch(OxSPP8)*. Après 5 mois, la

minéralisation dans les modalités amendées était cependant toujours significativement supérieure à celle de *Ch(Ox)*.

La minéralisation mesurée dans *NM(Ox)* était significativement 3 fois supérieure à celle mesurée dans *NM* (Figure 33). L'apport d'amendement a augmenté significativement les valeurs de minéralisation mesurée d'un facteur 3 pour *NM(OxSPP8)*. Pour les deux modalités *NM(Ox)* et *NM(OxSPP8)* la minéralisation a diminué significativement entre T0 et T5 avec une baisse respective de 75 % et 87 %. Pour toutes les modalités, aucune mesure de minéralisation n'était observable avec les témoins abiotiques pendant les premières 24 heures.



	Ch	Ch(Ox)		Ch(OxSPP8)		Ch(OxSPP31)		NM	NM(Ox)		NM(OxSPP8)	
		T0	T5	T0	T5	T0	T5		T0	T5	T0	T5
Effet traitement	*							*				
Effet modalités		A		B		C			A		B	
Effet temps		n.s		*		*			*		*	

Figure 33 : Minéralisation de la matière organique dans les terres avant traitement (*Ch*) et (*NM*), oxydées (*Ch(Ox)*, *NM(Ox)*) et amendées (*Ch(OxSPP8)*, *Ch(OxSPP31)*, *NM(OxSPP8)*) au temps initial (T0) et après 5 mois (T5) ainsi que dans les matériaux d'amendement (SPP et CDV) (moyenne et écart-type, n=3 (T0) et n=4 (T5)). Le tableau présente les analyses statistiques (lettre et *) des effets des modalités et du temps réalisées par Anova à deux facteurs ($p < 0,05$) et de l'effet traitement réalisée par test *t* ($p < 0,05$) (n.s: non significatif).

3.3.2.2 Activités enzymatiques

Le traitement par oxydation de la terre *Ch* a entraîné une diminution significative des activités des hydrolases, des cellobiohydrolases ou des aminopeptidases, qui étaient alors nulles ou proches des limites de quantifications (Figure 34, Annexe III). Après 5 mois, ces activités dans la modalité *Ch(Ox)* n'avaient pas évolué.

L'apport de matériaux, présentant des activités enzymatiques élevées, a entraîné une augmentation immédiate et significative des valeurs mesurées pour ces trois activités

(Figure 34, Annexe III). A T0, les activités des hydrolases, des cellobiohydrolases et des aminopeptidases étaient respectivement 50, 10 et 6 fois plus élevées pour *Ch(OxSPP8)* que pour *Ch(Ox)* et 170, 24 et 18 fois pour *Ch(OxSPP31)*. Comparées aux valeurs mesurées dans la terre *Ch*, les valeurs étaient finalement plus faibles dans *Ch(OxSPP8)* mais plus élevées dans *Ch(OxSPP31)* (Figure 34, Annexe III). Après 5 mois, les activités des hydrolases, des cellobiohydrolases et des aminopeptidases dans *Ch(OxSPP8)* étaient significativement et respectivement 5.4, 1.5 et 2.8 fois plus élevées qu'à T0. Pour *Ch(OxSPP31)*, les activités des hydrolases et des aminopeptidases étaient significativement et respectivement 2.1 et 1.3 fois plus élevées qu'à T0. Toutefois, pour cette modalité, les activités des cellobiohydrolases ont diminué de 0.7 fois par rapport à T0, et atteignaient ainsi les valeurs mesurées avec la terre initiale.

Contrairement aux observations faites pour la terre *Ch*, toutes les activités enzymatiques n'ont pas diminué après oxydation dans la terre *NM* : les activités des hydrolases étaient respectivement 75 % plus faibles alors que les activités des aminopeptidases et des cellobiohydrolases étaient respectivement 50 % et 500 % plus élevées que dans *NM*. Pour cette modalité oxydée, les activités des cellobiohydrolases et des aminopeptidases ont cependant diminué significativement de 80 % et de 59 % au cours des 5 mois. En revanche, les activités des hydrolases ont augmenté de 75 % au cours des 5 mois.

Tout comme pour les modalités amendées de la terre *Ch(Ox)*, l'ajout des matériaux a entraîné une augmentation significative des activités mesurées dans *NM(OxSPP8)* et ceci pour les trois activités (augmentation d'un facteur 7, 4 et 26 pour les hydrolases, aminopeptidases et cellobiohydrolases) (Figure 34, Annexe III). Les valeurs après amendement étaient ainsi supérieures à celles mesurées dans la terre *NM*. Après 5 mois, les activités des hydrolases dans *NM(OxSPP8)* ont significativement augmenté de 30 % par rapport à T0 (Figure 34, Annexe III) contrairement aux activités des cellobiohydrolases et des aminopeptidases qui ont significativement diminué, avec des baisses respectives d'un facteur de 2.9 et 2.4 par rapport à T0.

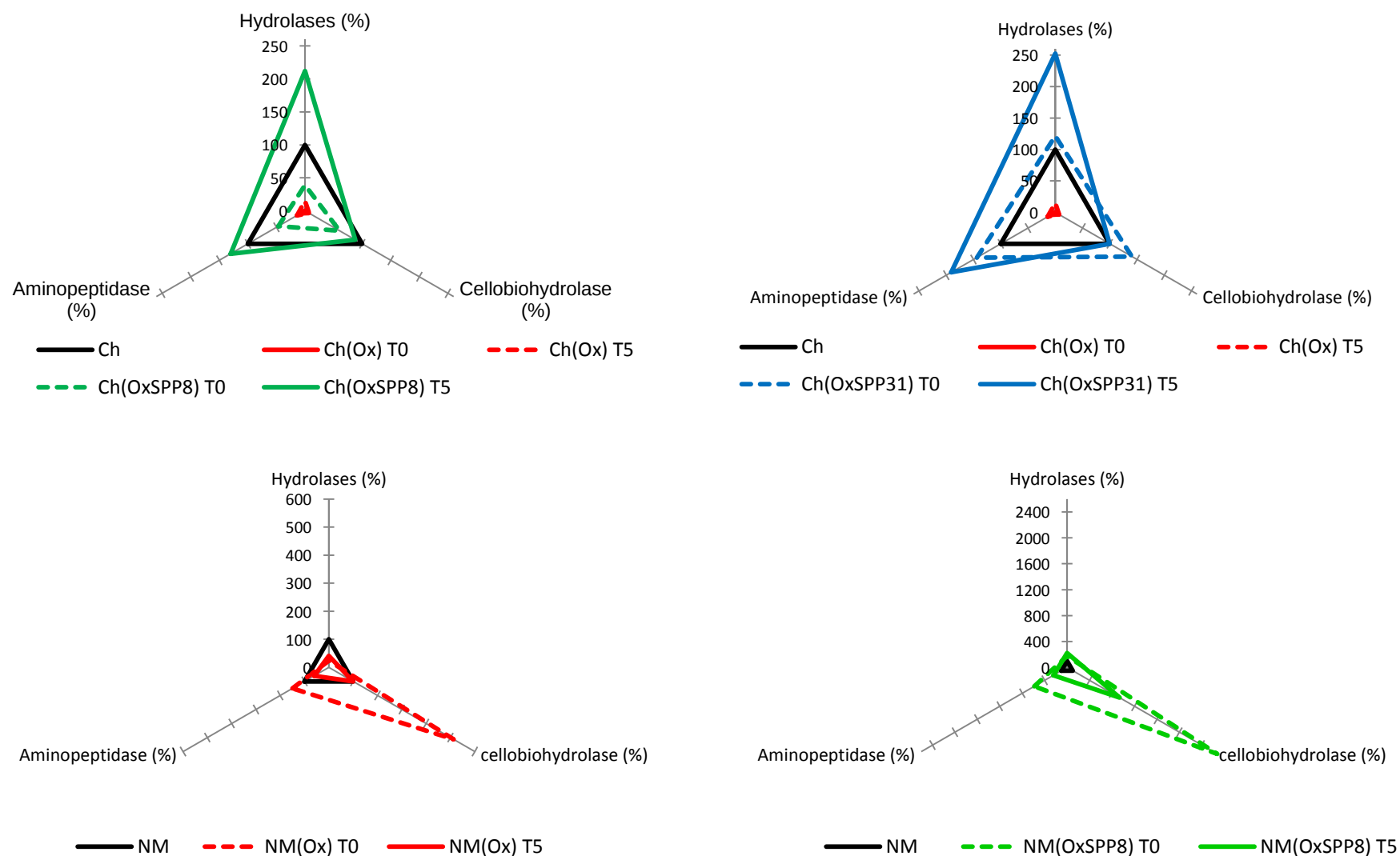


Figure 34 : Représentations graphiques des activités enzymatiques (hydrolases, cellobiohydrolase et aminopeptidase) pour les différentes modalités. Les données utilisées pour la représentation graphique ont été obtenues à partir des tableaux de l'annexe III. Ces valeurs ont été calculées en pourcentage par rapport aux valeurs des activités mesurées avant traitement pour la terre de Chenevières (Ch) et de Neuves-Maisons (NM). Les échelles sont identiques pour les différentes activités enzymatiques.

3.4 Paramètres physico-chimiques

3.4.1 Evolution du pH, de la CEC et des bases échangeables

L'oxydation a entraîné une diminution significative du pH de l'ordre de 3 unités pour la terre *Ch* et 0.1 unités pour *NM* (Figure 35). Au cours du temps, le pH de ces modalités a évolué faiblement. L'augmentation la plus importante a été observée pour la terre *Ch(Ox)* avec un gain de 0.7 unités pH. L'apport de boues de papeteries et de compost a entraîné des augmentations respectives du pH de 3 et 4 unités dans les modalités *Ch(OxSPP8)* et *Ch(OxSPP31)*. Une augmentation significative, mais beaucoup plus faible, du pH a été observée avec la terre *NM*, avec un gain de 0.1 unités pH. Après 5 mois, le pH a augmenté significativement dans toutes les modalités amendées, avec une augmentation la plus importante dans la modalité (*Ch(OxSPP8)*) (gain de 1 unité pH).

La CEC, mesurée par cobaltihexamine, de la terre *Ch* a été fortement altérée par l'oxydation et se situait en dessous de 1 cmol+.kg, tandis que celle de la terre *NM* n'a pas varié significativement (Figure 35). Au cours du temps, une augmentation de la CEC a été observée pour *Ch(Ox)*. L'apport d'amendement a entraîné une augmentation significative de la CEC dans les terres oxydées. Dans les modalités amendées, seule la CEC de *NM(OxSPP8)* a varié significativement, avec une augmentation de 2 cmol+.kg⁻¹.

Le taux de bases échangeables à l'acétate d'ammonium a peu, voire pas, évolué après oxydation (Cf. Annexe IV). L'apport de matériaux d'amendement a permis d'augmenter les teneurs en K, Mg et Ca échangeables. Au cours des 5 mois, seul le taux de K échangeable à l'acétate d'ammonium a varié, avec une diminution comprise entre 16 % et 49 % pour les terres *Ch* et *NM* amendées ou non.

3.4.2 Teneurs en C_{org}, N_{tot} et P_{Olsen}

L'oxydation par réaction de Fenton n'a pas eu d'impact significatif sur la teneur en C_{org} dans la terre *Ch* contrairement à la terre *NM* où elle a conduit à une diminution de teneur de 14 % (Figure 36, a). L'apport de matériaux riches en matière organique (100g.kg⁻¹) a entraîné une augmentation significative de la teneur en C_{org} dans la terre *Ch(Ox)* contrairement à la terre *NM(Ox)* où aucune augmentation significative n'a été observée. Au cours du temps, la teneur en C_{org} a diminué respectivement de 36 % et 29 % pour les modalités *Ch(OxSPP8)* et *Ch(OxSPP31)*. Aucune variation au cours du temps n'a été observée pour les modalités *NM(Ox)* et *NM(OxSPP8)*.

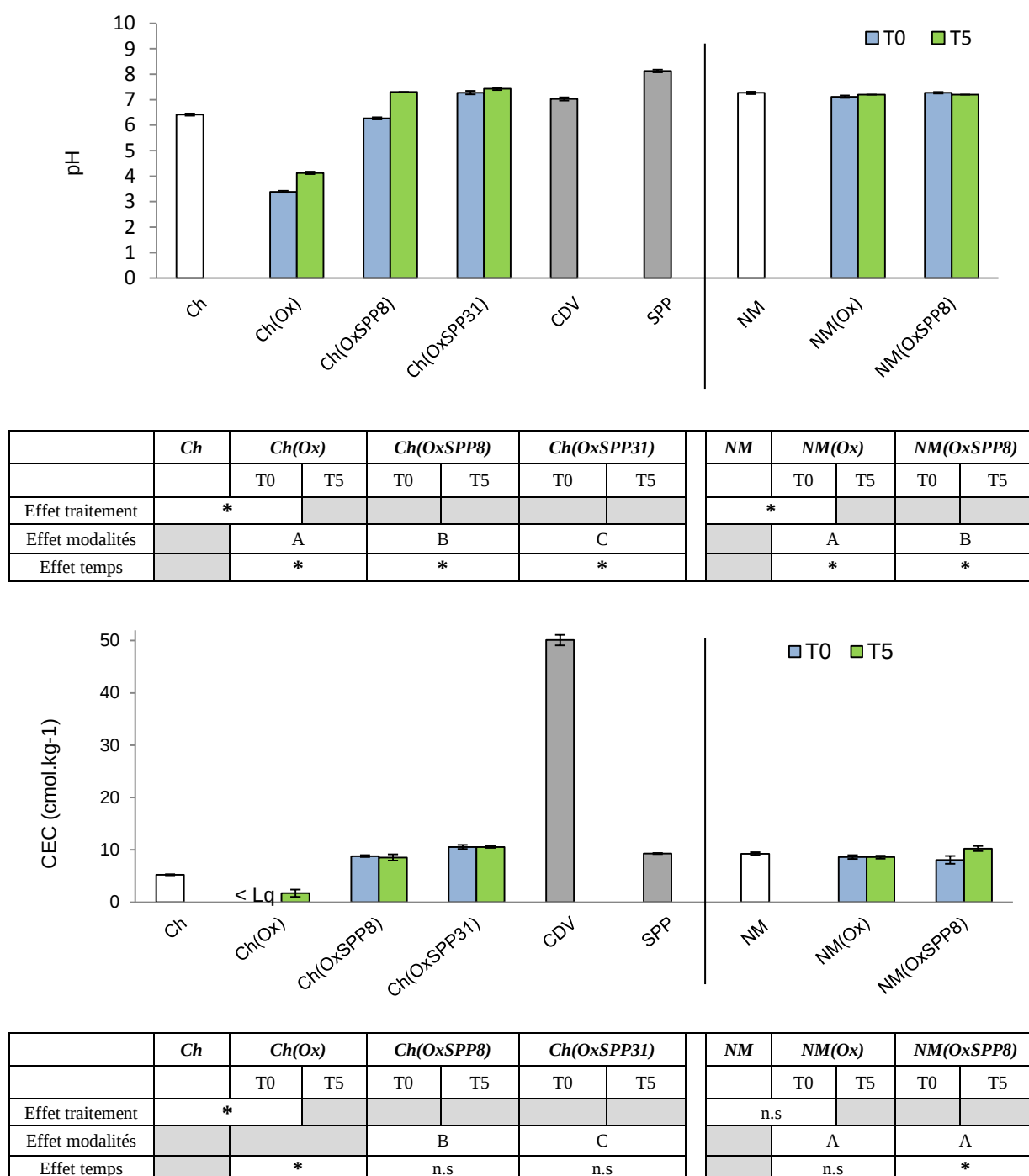


Figure 35 : Mesure du pH et de la CEC des terres avant traitement (Ch) et (NM), oxydées (Ch(Ox), NM(Ox)) et amendées (Ch(OxSPP8), Ch(OxSPP31), NM(OxSPP8)) au temps initial (T0) et après 5 mois (T5) ainsi que dans les matériaux d'amendement (SPP et CDV) (moyenne et écart-type, n=3 (T0) et n=4 (T5)). Le tableau présente les tests statistiques (lettre et *) des effets modalité et temps réalisé par Anova à deux facteurs ($p < 0,05$) et de l'effet traitement réalisé par test t ($p < 0,05$ (n.s: non significatif)).

Concernant les teneurs en N_{tot} , l'oxydation a conduit à une diminution de la teneur totale uniquement pour la terre *NM* avec une baisse de 16 % (Figure 36, b). Pour les deux terres oxydées (*Ch(Ox)* et *NM(Ox)*), l'amendement a entraîné une augmentation significative de la teneur en N_{tot} comprise entre 100 et 250 % en fonction de la proportion en amendement. Dans les modalités *NM(Ox)* et *NM(OxSPP8)*, des diminutions de 10 et 21 % de la teneur en N_{tot} ont été mesurées après 5 mois. Aucune variation significative n'a été observée au cours du temps pour les modalités *Ch(OxSPP31)* et *Ch(OxSPP8)*.

Le rapport C/N n'a pas été modifié pour les deux terres suite à l'oxydation, mais augmente suite aux amendements (Cf. Annexe V). L'apport d'amendement a fortement augmenté le C/N dans la terre *Ch(Ox)*, cependant, pour les modalités *Ch(OxSPP8)* et *Ch(OxSPP31)* le C/N a diminué pendant l'expérimentation et est passé respectivement de 17.9 et 34.8 à 14.3 et 22.6. Dans les modalités *NM(Ox)* et *NM(OxSPP8)* ce rapport a plutôt augmenté et est passé respectivement de 28.1 et 17.1 à 30.1 et 24.7

Les teneurs en P_{Olsen} (Figure 36, c) ont diminué dans les terres *Ch* et *NM* oxydées par réaction de Fenton avec des baisses respectives de 54 et 66 %. Au cours du temps, ces teneurs ont augmenté dans la terre *Ch(Ox)* mais n'ont pas varié dans la terre *NM(Ox)*. L'apport de matériaux, dont le compost de déchets verts riches en phosphore, a entraîné une augmentation significative de la teneur en P_{Olsen} d'un facteur 3 minimum pour les modalités *Ch(OxSPP8)* et *Ch(OxSPP31)* contre un facteur 5 pour la modalité *NM(OxSPP8)*. Au cours du temps, les teneurs en P_{Olsen} dans les modalités *Ch(OxSPP8)*, *Ch(OxSPP31)* et *NM(Ox)* sont restées stables mais ont diminué de 59% dans la modalité *NM(OxSPP8)*.

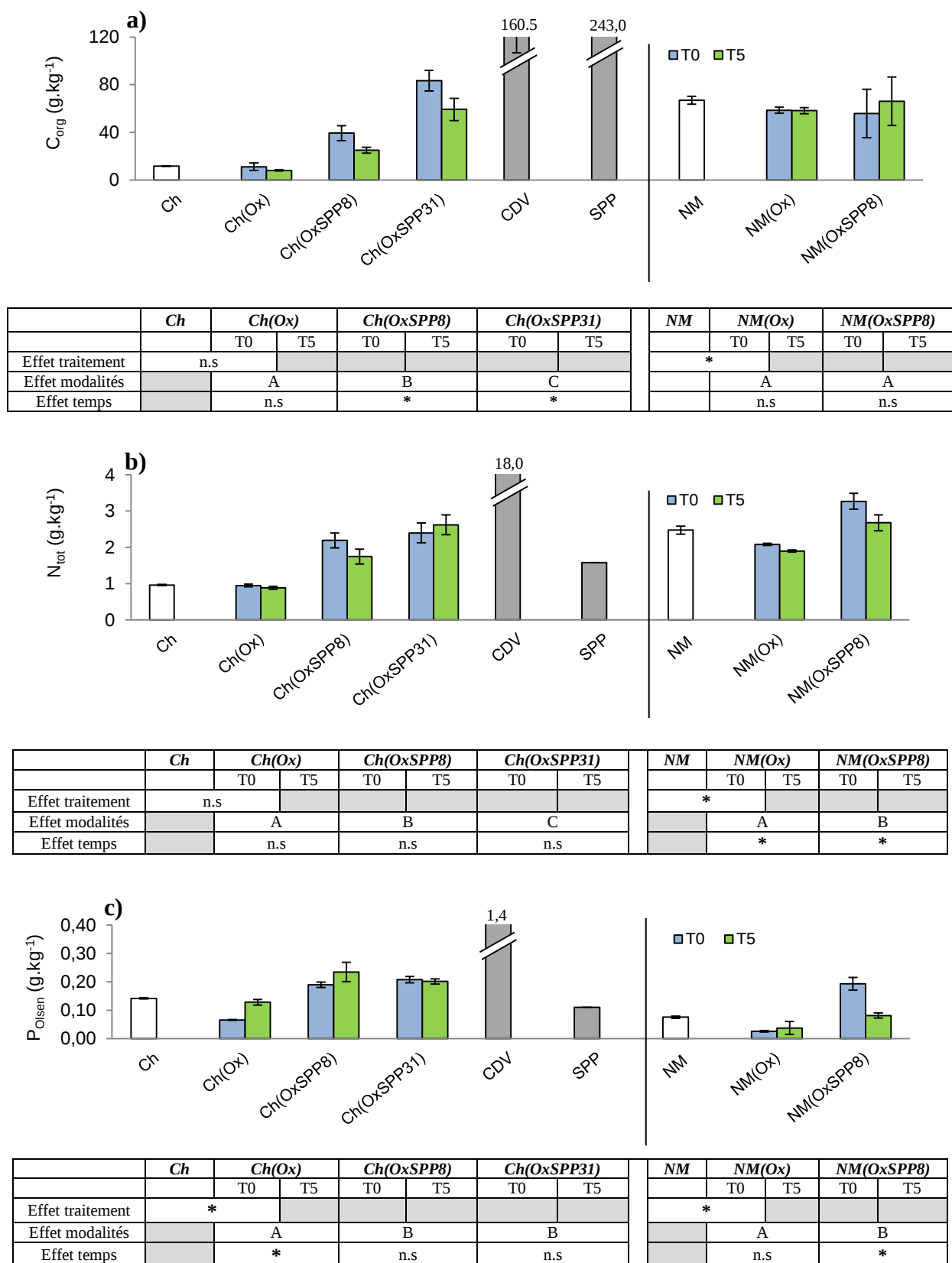


Figure 36 : C_{org} (a), N_{tot} (b) et P_{Olsen} (c) des terres avant traitement (Ch) et (NM), oxydées (Ch(Ox), NM(Ox)) et amendées (Ch(OxSPP8), Ch(OxSPP31), NM(OxSPP8)) au temps initial (T0) et après 5 mois (T5) ainsi que dans les matériaux d'amendement (SPP et CDV) (moyenne et écart-type, $n=3$ (T0) et $n=4$ (T5)). Le tableau présente les tests statistiques (lettre et *) des effets modalité et temps réalisés par Anova à deux facteurs ($p<0,05$) et de l'effet traitement réalisé par test t ($p<0,05$ (n.s: non significatif)). Pour le CDV certaines valeurs trop élevées pour une bonne représentation graphique ont été rajoutées en haut de l'histogramme.

3.4.3 Structure et porosité

L'analyse de la taille et de la surface des pores pour les terres oxydées et amendées montre que suite à l'amendement, la taille des pores a eu tendance à augmenter pour la terre *Ch*, mais ne montre pas de variation marquante pour la terre *NM*. Après 5 mois en pots, les porosités des terres *Ch(Ox)* et *NM(Ox)* n'ont pas évolué. Dans les modalités amendées *Ch(OxSPP8)* et *Ch(OxSPP31)* les mesures de porosités ont respectivement augmenté de 75 % et 36 % entre T0 et T5 contrairement à la modalité *NM(OxSPP8)* où la porosité a diminué de 30 % (Tableau 24). Ce type d'analyse fait l'objet d'un travail approfondi, en terme d'analyse et d'interprétation des résultats, dans la thèse de N.Salifou.

Tableau 24 : Mesure de la macroporosité pour une surface de 11,45 cm² identifiée sur les lames minces des différentes modalités, basée sur un traitement numérique selon Nouhou Salifou (2012).

		nombre de pores	surface minimum	surface maximum
			mm ²	
Ch(Ox)	T0	2114	0,0026	5,41
	T5	2153	0,0026	6,01
Ch(OxSPP8)	T0	1388	0,0026	7,96
	T5	2408	0,0026	15,50
Ch(OxSPP31)	T0	1147	0,0030	7,46
	T5	1553	0,0026	53,54
NM(Ox)	T0	1520	0,0026	11,42
	T5	1443	0,0026	6,54
NM(OxSPP8)	T0	1618	0,0026	10,17
	T5	1120	0,0026	10,03

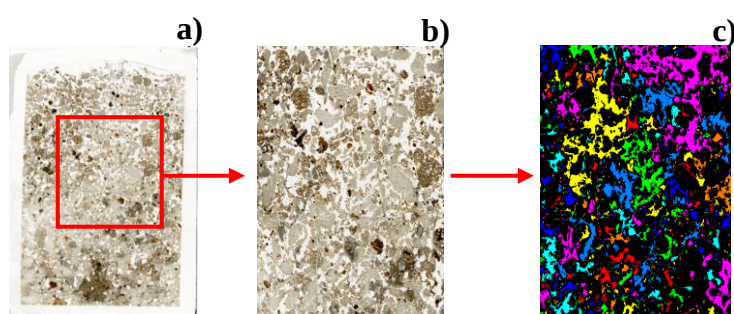


Figure 37 : a) Exemple de lame mince réalisée sur la modalité (*Ch(OxSPP31)*) après 5 mois d'expérimentation. b) Zone intégrée pour la mesure de porosité. C) Traitement numérique de la lame.

4. Discussion

4.1 Impact de l'oxydation et des amendements sur la dynamique des HAP

Comme dans le chapitre précédent, l'oxydation par réaction de Fenton a entraîné une dégradation des HAP dans la terre *Ch* (50 % de dégradation), mais aucune dégradation pour la terre *NM* (Figure 38). Comme expliqué dans le précédent chapitre, l'acidification (Huling et Pivetz., 2006), la présence de carbonates (Huling et Pivetz., 2006 ; Lemaire, 2010), la forte teneur en matière organique (Bogan et al., 2003) ainsi que l'accessibilité des polluants (Lemaire, 2010 ; Sirguez et al., 2008 ; Usman, 2010) seraient les paramètres qui pourraient expliquer cette différence entre les deux terres.

Au cours des 5 mois de l'expérience, la teneur en HAP dans la terre *Ch(Ox)* n'a pas évolué. Cette terre ayant présenté une très faible activité biologique, même après 5 mois, les processus biotiques de dégradation ont pu être très limités. Cependant, dans la terre *NM* oxydée, la teneur en HAP a diminué significativement au cours du temps. Si l'influence de la rhizosphère sur la dissipation des HAP a été démontrée (Corgié et al., 2003) la culture de plantes sur la terre *NM* n'a pas montré d'effets significatifs sur la concentration en HAP (Norini, 2007), probablement en raison d'une faible biodisponibilité de ceux-ci (Ouvrard et al., 2011). On pourrait alors supposer que l'oxydation augmente l'accessibilité des HAP. Une étude de Kawahara et al., (1995) a ainsi montré que l'extraction des HAP pouvait être améliorée suite au traitement par réaction de Fenton. Les HAP étant connus pour être adsorbés, à la fois sur des polymères organiques (Rivas, 2006) et à l'intérieur de ciments carbonatés (Barnier, 2007), la dégradation de ces composants par la réaction de Fenton serait susceptible d'augmenter l'accessibilité des HAP. Ces changements physico-chimiques pourraient ainsi être à l'origine du développement de processus de biodégradation, couramment observés dans la littérature (Nam et al., 2001 ; Palmroth et al., 2006 ; Valderrama et al., 2009). Cependant, pour la terre *NM*, la biodégradation des HAP suite à l'oxydation seule n'a pas été observée lors des expériences d'incubations du chapitre 3. Ainsi, dans cette expérimentation, ce serait l'effet synergique entre l'oxydation et la présence de la rhizosphère qui aurait permis la dégradation des HAP. Les rendements de dégradations sont cependant restés relativement faibles.

L'apport d'amendements a entraîné une diminution de la teneur en HAP par un effet de « dilution », notamment dans la modalité *Ch* contenant 31 % de boues de papeteries. Au cours

du temps, la teneur en HAP dans toutes les modalités amendées de chaque terre a diminué. Dans le cas de la terre *Ch*, l'ajout des amendements a permis de rétablir les activités microbiennes et la croissance des plantes. Dans les cas où la pollution est relativement disponible, la stimulation de la biodégradation des HAP dans la rhizosphère a souvent été démontrée (Binet et al., 2000 ; Corgié et al., 2003 ; Joner et al., 2001). Dans cette étude, la totalité des HAP restants a ainsi été dégradée par des processus biotiques au cours des 5 mois. Dans la terre *NM* oxydée, le taux de biodégradation n'a cependant pas été plus élevé lorsque la terre a été amendée. Cela pourrait s'expliquer d'une part par le fait que l'effet stimulant des matériaux d'amendements sur les activités microbiennes n'a été observé qu'à court terme. Cet effet « temporaire » sera détaillé plus précisément par la suite. De plus, il est probable que dans un système enrichi en composés organiques facilement assimilables, les polluants fortement adsorbés ne représentent pas la source majeure de carbone pour la microflore. Enfin, ces résultats suggèrent que le facteur limitant la biodégradation dans cette terre serait davantage l'accessibilité des HAP que l'activité microbienne.

4.2 Impact de l'oxydation et des amendements sur les paramètres physico-chimiques

L'oxydation par réaction de Fenton a entraîné de fortes baisses du pH pour la terre *Ch* contrairement à la terre *NM* (Figure 38). L'impact du traitement sur la teneur en C_{org} de la terre *Ch* a été beaucoup plus faible que celui observé en colonnes, alors qu'il a semblé être plus fort sur la terre de *NM*. Ces résultats qui diffèrent de ceux observés en colonnes, pourraient en particulier être expliqués par le mode d'injection des oxydants et le dispositif expérimental (percolation ou pas). L'apport des matériaux d'amendement avait pour objectif d'augmenter le pH, notamment dans la terre *Ch(Ox)* fortement altérée par le traitement. Dans les modalités *Ch(OxSPP8)* et *Ch(OxSPP31)*, les valeurs de pH ont ainsi augmenté de 3 unités. Cet effet des boues de papeteries sur l'augmentation du pH de sols miniers acides a déjà été démontré (Pichtel et al., 1994 ; Shipitalo et al., 2008). Par ailleurs, on a pu s'apercevoir en fin d'expérimentation, que pour ce paramètre l'ajout d'une importante quantité de boues de papeteries n'a pas été nécessaire pour retrouver un pH neutre. En effet, au cours du temps, l'effet tampon des boues de papeteries a perduré et progressé.

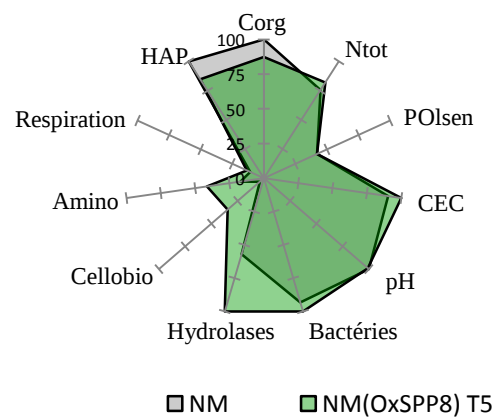
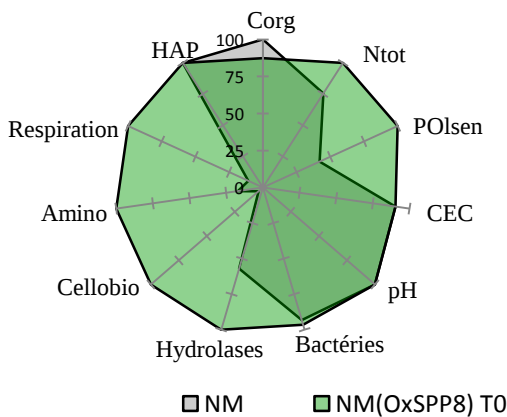
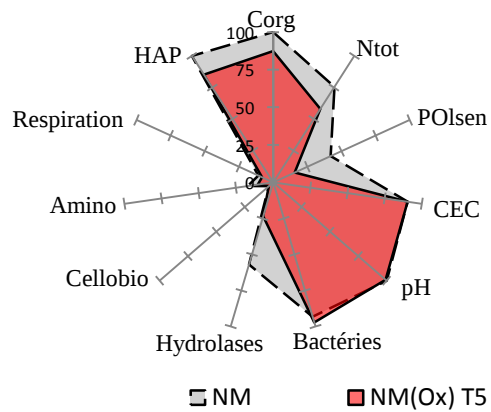
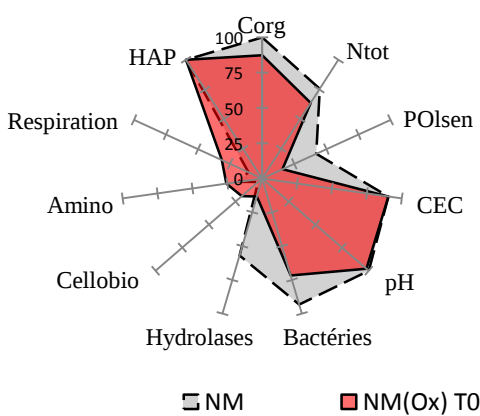
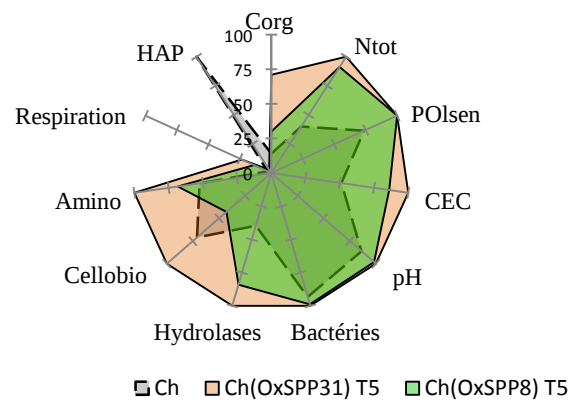
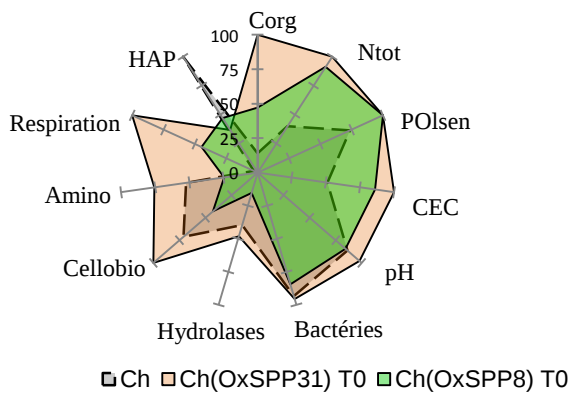
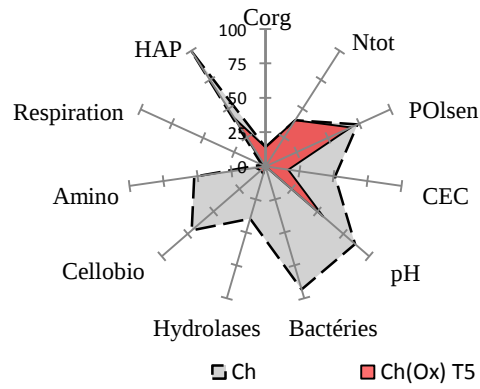
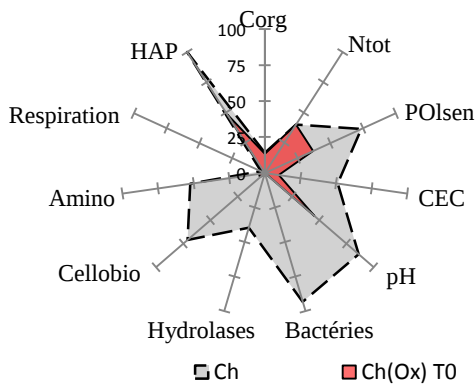


Figure 38 : Représentation en graphique radar des différents paramètres mesurés. Les données de chaque paramètre sont exprimées en pourcentage, par rapport aux valeurs maximales mesurées pour l'ensemble des modalités de la terre Ch ou NM. Ces pourcentages tiennent compte des tests statistiques. Les données pour la densité en microorganismes cultivables ont été transformées en log avant d'être retranscrites en pourcentage.

Pour le phosphore il semblerait y avoir un effet non négligeable du mode d'injection sur la dynamique de cet élément. En effet, il a été observé que la teneur en P_{Olsen} dans la terre *Ch(Ox)* a diminué par rapport à la teneur initiale de *Ch*, contrairement au chapitre 4, où l'oxydation augmentait la teneur en P_{Olsen} de cette terre. Dans le cas d'une expérimentation avec percolation des solutions, comme dans le chapitre 4, le fer a été en partie lixivié contrairement à cette expérimentation où la totalité du fer injecté a été immobilisé dans la terre. L'association éventuelle de P et de Fe en condition acide, par précipité de phosphore ferrique, a pu être favorisée par l'oxydation en malaxeur. Pour la terre *NM*, comme dans le chapitre 4, les teneurs en P_{Olsen} ont diminué après oxydation. L'hypothèse d'une association couplée au fer et aux carbonates, émise précédemment, semblerait être appuyée. Les résultats montrent que les amendements ont permis d'augmenter la teneur en P_{Olsen} des deux terres oxydées, améliorant ainsi la fertilité des terres oxydées. En effet, l'ajout d'amendements riches en P peut améliorer la croissance des plantes sur sol acide (Fierro et al., 1999 ; Madox et al., 1991) ainsi que l'activité biologique d'une manière générale (Karaca et al., 2002). Par ailleurs, on observe toutefois une diminution de cette teneur au cours du temps pour la terre *NM* amendée ce qui suggère une immobilisation rapide du P dans cette terre.

Comme dans le chapitre 4, les teneurs en azote ont diminué dans la terre *NM* après oxydation, mais pas dans la terre *Ch*. Les apports d'amendements ont augmenté les teneurs en azote total. Comme l'apport de P, l'apport d'amendements riches en composés azotés peut ainsi stimuler l'activité biologique (Gildon et al., 1993) et la croissance des plantes (Fierro et al., 1999). Par ailleurs, l'apport d'amendements a fortement stimulé les activités des aminopeptidases, liées aux cycles de l'azote. L'évolution des teneurs en N_{tot} peuvent aussi être interprétées par rapport aux teneurs en C_{org} , les deux cycles de ces éléments dans le sol étant très étroitement liés (Amlinger et al., 2003). Comme pour l'azote, les amendements ont apporté une forte quantité de matière organique (Figure 38). La minéralisation de cette matière organique a seulement été observée dans les modalités *Ch(OxSPP8)* et *Ch(OxSPP31)*. La matière organique la plus dégradable des matériaux d'amendement serait ainsi assimilée assez rapidement et dans de fortes proportions, comme cela peut être le cas pour certains composts (Garcia-gomez et al., 2003). Pour les boues de papeteries, la dégradation se décompose en deux phases (Fierro et al., 2000), une première phase relativement rapide (< 3 mois), qui pourrait correspondre à notre expérience et une phase de décomposition plus lente, essentiellement attribuée à la lignine présentes dans ces boues. Concernant la CEC, comme

pour le chapitre 4, elle a diminué considérablement dans la terre *Ch(Ox)* contrairement à la terre *NM(Ox)* où la valeur n'a que peu varié par rapport à la valeur initiale. Cette diminution pour la terre de *Ch(Ox)* a été induite majoritairement par l'acidification de la terre. L'expérimentation ayant été réalisée sans percolation des solutions, les bases échangeables pourraient être encore présentes dans le milieu sous forme dissoute et donc non adsorbée au complexe d'échange. L'apport d'amendement a permis, outre une remontée du pH, d'apporter une réserve beaucoup plus élevée en K et Mg (Fierro et al., 1999), nutriments indispensables au bon développement des plantes.

4.3 Dynamique des paramètres biologiques dans les sols après oxydation et amendements

4.3.1 Germination et croissance des plantes

La germination des graines et la croissance du ray-grass et de trèfle blanc, qui peuvent représenter la fonction support de végétation des terres, a été inhibée avec la terre *Ch(Ox)*. Les faibles valeurs de pH mesurées sur ces terres oxydées, aux alentours de 3, pourraient expliquer cette inhibition. Si des plantes acidophiles peuvent se développer à des pH proches de 4,5, le ray-grass et le trèfle n'en font pas partie. De plus, la majorité des plantes ont une croissance optimale lorsque le pH du sol est compris entre 6 et 7, car la plupart des éléments nutritifs sont assimilables dans cette zone de pH. Cette acidification liée à la réaction de Fenton sur une terre peu carbonatée, déjà décrit dans le chapitre 4, était encore observable après 5 mois. Pour la terre de friches *NM*, l'oxydation par réaction de Fenton n'a pas affecté la fonction de support de végétation, le pouvoir tampon lié à la présence de carbonate a ainsi permis de conserver les conditions chimiques nécessaires à la germination et à la croissance des plantes.

Dans le cas où la fonction de support de végétation a été altérée par l'oxydation, l'apport d'amendements a permis la restauration de cette fonction. L'ajout de boues de papeterie a ainsi induit une hausse du pH suffisante pour permettre la germination et la croissance des plantes. Par ailleurs, l'apport d'amendements, riches en nutriments, a des conséquences bénéfiques sur la fertilité et donc indirectement sur la croissance des plantes (Cherif et al., 2009 ; Diacono et al., 2010 ; Fierro et al., 1999). Si la quantité d'amendements apportée n'a pas eu d'impact sur la germination, en revanche la biomasse racinaire et foliaire était plus faible avec 31 % comparé à 8 % d'amendements pour *Ch* et plus faible pour la terre *NM*

amendée comparé à la terre oxydée. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce résultat :

- Les microorganismes et les plantes ont pu être en compétition pour l'azote, notamment lors de l'apport de matières organiques (Amlinger et al., 2003 ; Bernal et al., 1998). En effet, au moment de l'apport, le rapport C/N, était plus élevé dans la modalité la plus amendée, suggérant une plus faible disponibilité de l'azote pour les plantes (Amlinger et al., 2009).
- L'ajout de matériaux d'amendement possédant une forte capacité de rétention en eau a pu entraîner un comportement hydromorphe. En effet, l'arrosage a été effectué sur la base de la capacité au champ des mélanges de matériaux initiaux et par pesées des pots. Or, suite au tassement et à l'évolution des matériaux, cette capacité de rétention en eau a évolué ce qui a peut être conduit à des différences de taux d'humidité entre *NM(OxSPP8)* et *NM(Ox)*, et entre *Ch(OxSPP31)* et *Ch(OxSPP8)*.
- La structure physique du sol a une forte influence sur la croissance des plantes (Passioura et al., 2003). La forte densité en SPP, la compaction des boues de papeteries observée par Séré (2007), ont conduit à une diminution de la porosité qui a pu limiter le développement racinaire dans la modalité *Ch(OxSPP31)* par rapport à *Ch(OxSPP8)*. Dans toutes les modalités, les teneurs en eau dans les parties aériennes suggèrent cependant que l'apport de matériaux possédant une forte capacité de rétention en eau a permis d'éviter les stress hydriques, ce qui avait déjà été démontré auparavant (Foley et al., 2002).

4.3.2 Dynamique des communautés microbiennes

En comparaison avec le chapitre 4 où la densité microbienne avait été estimée par un dénombrement des cultivables et non par des techniques de biologie moléculaire, l'effet de l'oxydation par réaction de Fenton sur la densité bactérienne a été relativement identique. Pour la terre non carbonatée *Ch(Ox)*, la communauté bactérienne a été fortement affectée et ne s'est pas développée au cours du temps (Figure 38), ce qui appuierait l'hypothèse de l'effet majeur du pH. Pour la terre *NM*, l'impact mesuré a été beaucoup plus faible, en partie en raison du pouvoir tampon de la terre. Au cours du temps, la densité bactérienne de la terre *NM(Ox)* est ainsi revenue au même niveau que celle de la terre non oxydée. Comme dans le chapitre 3 (Laurent et al., 2012), ce résultat suggère que l'impact de l'oxydation par réaction de Fenton sur la densité bactérienne peut être transitoire. Une modification de la structure des communautés a été observée suite à l'oxydation des terres. On pourrait supposer que des

espèces résistantes aux stress oxydatifs (Fiorenza et al., 1997) ont pu être favorisées, ce qui pourrait être vérifié par un séquençage des ribotypes présents sur les gels de TTGE. Concernant les communautés fongiques, l'oxydation a entraîné une diminution de la densité de champignons dans la terre *Ch*, mais une augmentation dans la terre *NM*. Au cours du temps, la densité fongique a fortement augmenté dans la modalité *Ch(Ox)* ce qui pourrait être expliqué par une meilleure adaptation des champignons aux pH acides (Davet, 1996).

L'apport de matériaux contenant une forte quantité et diversité en microorganismes a permis d'apporter un inoculum bactérien et fongique. Les sous-produits papetiers comme le compost ont participé à cet inoculum, la diversité bactérienne étant relativement identique dans les deux matériaux (*données non présentées*), et les boues de papeterie contenant peu de champignons. Dans les modalités *Ch(OxSPP8)* et *Ch(OxSPP31)*, l'augmentation du nombre de copies de gènes 16S est à mettre en relation avec la quantité d'amendements apportée (Figure 38), puisque sans apport, la communauté bactérienne n'était pas quantifiable, même après 5 mois. L'effet de l'inoculum a été moins marqué dans la terre *NM* mais a tout de même permis d'augmenter la densité d'un facteur 100. Au niveau de la densité, l'apport d'amendements n'a cependant pas semblé être une nécessité dans la terre *NM*, car au bout de 5 mois, les densités dans la terre oxydée amendée et non amendée étaient identiques. Au niveau de la structure des communautés bactériennes, les profils obtenus par TTGE montrent dans les deux terres amendées des structures intermédiaires entre celles des terres non amendées et celles des matériaux. La structure des communautés bactériennes de *Ch(OxSPP8)* se rapprochait de celle du compost et celle de *Ch(OxSPP31)* se rapprochait de celle des boues de papeteries. Ce résultat peut aussi s'expliquer par le principe de la technique de TTGE, qui met en évidence les séquences majoritaires. Dans le cas de la terre amendée avec une plus forte proportion en boues de papeterie, l'ADNr 16S de ces boues est extrait en plus grande quantité et se retrouve en majorité sur le gel.

Cette diversité bactérienne a évolué au cours du temps et s'est particulièrement développée dans la modalité la plus amendée, qui présentait initialement la plus faible diversité. Les structures des communautés retrouvées dans les modalités amendées, pour *NM* ou *Ch*, ont toutes évolué au cours du temps et ont été finalement différentes de celles observées au début de l'expérience. Ce résultat suggère la création d'« écosystèmes » particuliers dans les terres oxydées et amendées, où les communautés microbiennes évoluent à partir de celles des terres d'origines, par des phénomènes de résiliences (Saison et al., 2006) et de celles des amendements, mais aussi sous l'influence de l'aspect nutritionnel des amendements et de la

rhizosphère (Joner et al. , 2001 ; Marschner et al., 2004). Par ailleurs, Cébron et al. (2011) ont montré que si les communautés microbiennes pouvaient recoloniser des sols traités par désorption thermiques, les activités enzymatiques traduisant l'assimilation de certains nutriments restaient relativement faibles.

4.3.3 Activité biologique

4.3.3.1 *Minéralisation*

L'activité de minéralisation du carbone mesurée dans la terre *Ch* a fortement diminué après oxydation, probablement en relation avec la forte diminution du nombre de microorganismes (Figure 38). Dans la terre *NM* une augmentation de l'activité de minéralisation a été observée après oxydation, ce qui avait déjà été observé dans le chapitre 3. La minéralisation mesurée après 5 mois étant revenue aux valeurs mesurées dans la terre avant oxydation, cette augmentation serait temporaire, comme montré dans le chapitre 3, et liée à des composés organiques ainsi que de l'oxygène potentiellement libérés par l'ajout de peroxyde d'hydrogène et permettant le développement rapide des bactéries.

Les matériaux d'amendements présentaient un fort taux de minéralisation, reflétant la quantité élevée de microorganismes et de matière organique biodégradables. L'incorporation de ces matériaux dans les terres oxydées a donc induit une stimulation de l'activité microbienne (Ros et al., 2003 ; Sánchez-Monedero et al., 2008). Cet effet a été particulièrement net dans la modalité *Ch(OxSPP31)*, où les valeurs de minéralisation étaient supérieures à celle du compost. Ils suggèrent un effet synergique lors du mélange des matériaux. Au cours des 5 mois, l'activité de minéralisation a diminué dans les deux terres amendées. Pour les terres *Ch* oxydées et amendées, ces baisses de la minéralisation ont été corrélées à la diminution de la teneur en matière organique observée au cours des 5 mois et donc à la dégradation de la matière organique ajoutée.

4.3.3.2 *Activité enzymatique*

Tout comme dans le chapitre 4, les activités des hydrolases ont diminué après oxydation par réaction de Fenton quelle que soit la terre observée, tout comme les activités des aminopeptidases et des cellobiohydrolases pour la terre *Ch* (Figure 38). Cette diminution est corrélée à la fois à la diminution du nombre de microorganismes suite à l'oxydation mais pourrait aussi être corrélée à l'action des réactions oxydantes sur les enzymes extracellulaires, qui sont des molécules organiques. Dans le cas de la terre *Ch*, ces activités n'ont pas été restaurées au cours du temps, probablement en liaison avec la valeur de pH restée basse.

L'augmentation temporaire des activités aminopeptidases dans la terre *NM(Ox)* pourrait être liée à la libération de polymères azotés suite à la lyse des cellules lors de l'oxydation (Palmroth et al., 2006) ; tandis que celle des cellobiohydrolases dans cette terre reste à expliquer. Ces observations couplées aux mesures de minéralisation montrent que dans certains cas, des activités spécifiques sont fortement stimulées, et ne dépendent pas forcément de la densité bactérienne. De telles observations mettent en avant la nécessité d'utiliser comme bioindicateurs d'activité, des mesures globales mais aussi spécifiques. Pour exemple, il ne semblerait pas exister dans ce cas-ci de corrélation positive entre une mesure d'activité globale comme la minéralisation et une mesure d'activité enzymatique globale comme celle des hydrolases. La stimulation de l'activité des aminopeptidases dans la terre *NM(Ox)* n'a été cependant que temporaire, tout comme l'augmentation de la minéralisation. Après 5 mois, cette activité a diminué tout comme celle des cellobiohydrolases.

Dans la terre de friche oxydée, l'effet de la végétation installée entre T0 et T5 sur les activités biologiques a été relativement faible, alors que les systèmes racinaires permettent la stimulation d'activités spécifiques (Tabatabai et al., 2003) . Bien qu'une légère augmentation des valeurs mesurées pour les activités des hydrolases ait été mesurée, les valeurs observées dans la terre avant traitement n'ont jamais été atteintes, même après 5 mois.

Dans les terres amendées, au début de l'expérimentation, les activités enzymatiques étaient plus élevées que dans les terres oxydées, au moins en partie en relation avec l'apport d'une activité biologique qui se traduit rapidement lors du mélange de matériaux (Sánchez-Monedero et al., 2008) (Figure 38). Dans la terre *Ch*, où aucune activité n'était mesurable après oxydation, toutes les activités ont été augmentées, avec des valeurs plus fortes dans la modalité la plus amendée en boues de papeteries. Concernant les activités des cellobiohydrolases et des aminopeptidases dans la modalité *NM(OxSPP8)*, la présence de composés cellulotiques et azotés apportés par les matériaux a pu se traduire par une augmentation rapide de ces activités (Crecchio et al., 2004 ; Sinsabaugh et al., 2005). Toutefois, ces activités ont diminué au cours des 5 mois, démontrant l'effet temporaire des activités spécifiques sur cette terre oxydée. Seule l'activité des hydrolases, qui représente une mesure d'activité plus globale, a augmenté significativement, mais légèrement au cours du temps, ce qui pourrait être lié à l'augmentation de la densité bactérienne avec laquelle cette activité serait corrélée (Adam et al., 2001). En revanche pour la terre *Ch* les activités enzymatiques activées par les amendements ont augmenté au cours des 5 mois. La présence de racines, un développement microbien important, et une assimilation forte des composés

carbonés et azotés ont permis le développement des activités biologiques, quelles qu'elle soient, au cours du temps. Concernant les deux modalités *Ch(OxSPP8)* et *Ch(OxSPP31)*, si cette dernière présentait au début de l'expérimentation les valeurs les plus élevées au niveau biologique, à la fin de l'expérimentation les valeurs des différentes activités mesurées dans les deux modalités étaient relativement proches.

5. Conclusion

Les différents résultats peuvent se décomposer en plusieurs points :

- L'impact de l'oxydation sur les paramètres physico-chimiques (pH, CEC) et biologiques (densité microbienne, minéralisation, activités enzymatiques) du sol des deux terres est proche de celui observé dans le chapitre 4. Pour le P_{Olsen} , les résultats diffèrent, et montrent bien que la difficulté de maîtriser les conditions d'oxydation peut avoir une influence sur les résultats obtenus. Un impact très marqué de la réaction de Fenton est cependant observé sur la terre *Ch* (Figure 38), qui conduit à une inhibition de la germination et de croissance des plantes;
- L'apport d'un mélange de boues de papeterie et de compost de déchets verts, et d'une végétation a permis d'augmenter les valeurs de pH, P_{Olsen} , CEC, Corg, N, ainsi que la densité et l'activité microbiennes, mais cet effet varie en intensité en fonction de la terre. Cet effet se maintient après 5 mois pour la terre *Ch* mais tend à diminuer pour la terre *NM*.
- Si la dégradation des HAP a été induite par l'oxydation dans la terre *Ch* uniquement, en revanche une dégradation des HAP a été observée au cours du temps dans les deux terres oxydées, amendées et végétalisées ou végétalisées. (Figure 38)

CHAPITRE 6 – Etude en lysimètres de l'impact de l'oxydation chimique et de la refonctionnalisation sur une terre de friches industrielles

1. Introduction

Les données acquises lors des expérimentations menées en laboratoire ont permis de mettre en avant, i) l'impact des procédés d'oxydation chimique par réaction de Fenton et persulfate sur certains paramètres de fonctionnement du sol (*e.g.* pH, CEC, POlsen, densité et activité microbienne) (chapitres 3 et 4), ii) l'effet des procédés de refonctionnalisation (chapitre 5) utilisant un apport de boues de papeterie et du compost sur la capacité du sol à être le support d'une activité biologique. Il était alors nécessaire d'extrapoler les résultats acquis en conditions contrôlées de laboratoire à l'échelle du terrain, en conditions climatiques réelles. Les colonnes lysimétriques ainsi mises en place ont permis, outre la réalisation des essais *in situ*, d'approfondir les résultats acquis au laboratoire. Les notions de transferts des éléments vers les nappes phréatiques ont notamment été abordées d'une manière plus réaliste qu'avec les essais en colonnes de laboratoire. Les lysimètres sont soumis aux perturbations climatiques et subissent ainsi des événements pluviométriques, neigeux, de gel ou de sécheresse, modifiant les conditions de fonctionnement des sols et pouvant ainsi participer au transfert préférentiel de certains éléments dans les eaux de percolation.

La première partie de ce chapitre a pour objectif d'approfondir et de valider les connaissances sur l'impact que peut avoir, à une plus grande échelle, un procédé d'oxydation chimique sur la dynamique des polluants et sur les paramètres physico-chimiques et biologiques du sol. Il s'agit notamment de tenir compte de la profondeur du profil de sol, échelle spatiale non étudiée en laboratoire et d'apporter un niveau de complexité.

La deuxième partie a pour objectif de présenter l'évolution au cours du temps des paramètres de fonctionnement biologique des sols traités par oxydation chimiques, qu'ils aient subi une étape de refonctionnalisation ou non.

Enfin, la dernière partie est consacrée au transfert des éléments dans les eaux de percolations au cours des différents événements ayant eu lieu sur les lysimètres.

2. Matériel et méthodes

2.1 Site et dispositif

Les colonnes lysimétriques (Cf.2§1.3.2) sont installées sur la station expérimentale du GISFI (Homécourt, Meurthe et Moselle, 49°21367N, 5°99608^E, www.gisfi.fr). Le climat est continental à tendance océanique, avec une pluviométrie moyenne de 760 mm.an⁻¹ et une température moyenne de 10°C (valeurs extrêmes : -21,6°C à 37,6°C). Pour le programme de recherche Oxysol, 4 colonnes lysimétriques, qui seront nommées lysimètres, ont été mises en place. Les lysimètres ont été remplis avec la terre de Neuves-Maisons (NM) (Cf.2§1.1.2) préalablement criblée à 80 mm. Afin d'avoir une répartition la plus homogène possible des matériaux, les lysimètres ont été remplis manuellement par strates successives de 30 cm d'épaisseur, un léger tassement ayant été réalisé après chaque apport. Par la suite, différentes interventions ont été réalisées, allant de l'oxydation des terres *in situ* à la refonctionnalisation post-traitement (Figure 39).

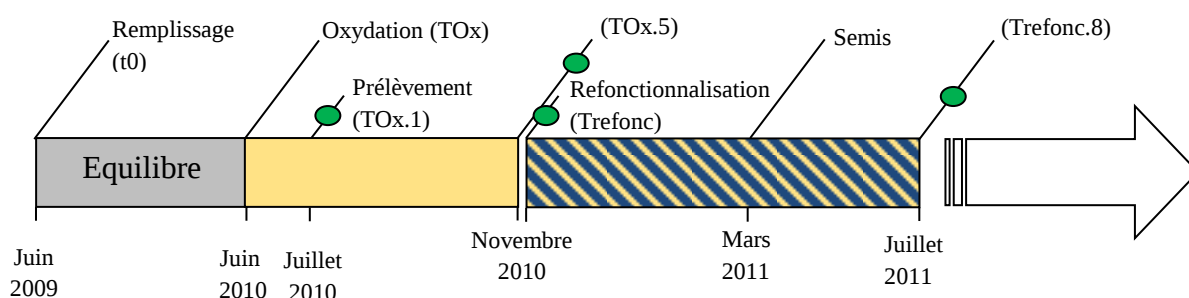


Figure 39 : Chronogramme des interventions sur les lysimètres (Ox : oxydation, refonc : refonctionnalisation, les chiffres accolés aux abréviations représentent le nombre de mois écoulés depuis l'oxydation ou la refonctionnalisation) (● : prélèvement d'échantillons de terre pour les mesures des paramètres physico-chimiques et biologiques)

2.2 Protocole d'oxydation chimique

2.2.1 Dispositif

Le traitement des terres polluées a été effectué par l'entreprise Valterra Dépollution/Réhabilitation en association avec les partenaires scientifiques du GISFI. Le traitement a été réalisé par percolation des solutions de réactifs d'oxydation à l'aide d'une couronne d'injection (Figure 40, b). Avant d'effectuer l'oxydation, des tests de percolation ont été réalisés à l'aide d'injection d'eau afin de connaître *a priori* les cinétiques d'infiltration dans le sol. Pour le traitement proprement dit, les solutions d'oxydants ont été apportées en alternance à l'aide de pompes péristaltiques reliées aux tuyaux d'injection. Les tuyaux ont

ensuite délivré les solutions à l'intérieur des couronnes d'injection, assurant un dépôt homogène des solutions à la surface des lysimètres (Figure 40).

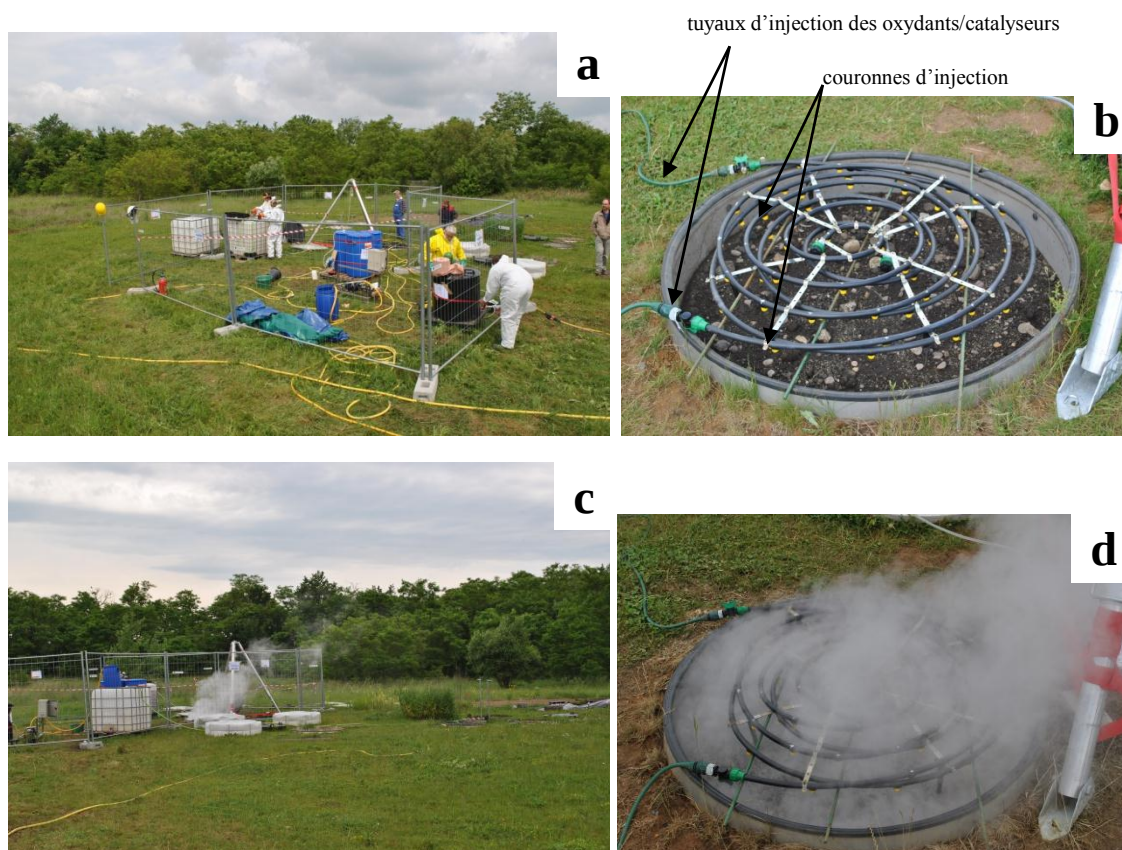


Figure 40 : Photographies de la zone contrôlée (a) et (b) du dispositif d'injection utilisé pour l'oxydation *in situ* des terres polluées par des HAP. Dégagement de fumée pendant la phase d'oxydation (c), (d)

2.2.2 Choix des oxydants

Les oxydants choisis pour cette expérimentation *in situ* étaient identiques à ceux utilisés au laboratoire (chapitre 4). La réaction de Fenton par association du peroxyde d'hydrogène avec du sulfate de fer et la réaction du persulfate activé par du peroxyde d'hydrogène ont ainsi été mises en œuvre. Deux lysimètres ont été traités avec la réaction de Fenton (qui seront nommés « Fenton A » et « Fenton B ») et un lysimètre avec du persulfate activé (nommé « Persulfate »). De l'eau a été injectée dans un lysimètre (« Témoin ») afin de servir de témoin de comparaison avec les lysimètres traités par oxydation.

2.2.3 Protocole d'oxydation

La quantité d'oxydant théoriquement nécessaire pour traiter le premier mètre des lysimètres, correspondant à une masse de terre de 940 kg, a été calculée en fonction des équations stœchiométriques (Lemaire, 2011). La quantité ainsi déterminée représentait 10 fois la valeur nécessaire pour dégrader les polluants (HAP) présents en considérant que les HAP étaient la seule cible et que seuls des mécanismes d'oxydoréduction intervenaient. La dose s'élevait dans cette expérience à 76 g d'oxydants par kg de sol (Lemaire, 2011). Les conditions d'alternance, de débit et de concentration utilisées sont présentées dans le tableau 25. Le traitement à l'eau a été effectué avec des débits proches de ceux utilisés pour les oxydants ($\approx 20 \text{ L.h}^{-1}$) (Tableau 25).

Tableau 25 : Paramètres de l'oxydation par réaction de Fenton et persulfate activé utilisés pour le traitement des terres des lysimètres

	Fenton		Persulfate activé	
	$X : \text{FeSO}_4$	$Y : \text{H}_2\text{O}_2$	$X : \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$	$Y : \text{H}_2\text{O}_2$
quantité de terre traitée (kg)	940,00		940,00	
concentration (mol.l^{-1})	0,64	4,41 - 5,88	1,68	4,41 - 5,88
rapport molaire X : Y	46,96 - 62,64		5,00 - 6,76	
volume total de solution injectée (L)	55,00	375,00	194,00	317,00
débit moyen (L.h^{-1})	32,00	25,00	18,00	16,00
nombre d'injection	10,00	18,00	14,00	14,00
quantité d'oxydant injectée (g.kg^{-1})	10,53	59,84 - 79,78	82,5	50,5 - 67,4

2.3 Protocole de refonctionnalisation des terres traitées

2.3.1 Choix des proportions en amendements

Les choix de la qualité et de la quantité des amendements ont été faits sur la base des données acquises dans les expérimentations de laboratoire. Il a ainsi été décidé de se baser sur la quantité de matériaux nécessaire pour permettre un retour du pH proche de la neutralité (Figure 41), tout en tenant compte des paramètres biologiques observés. Les mesures de pH effectuées sur les différents mélanges de matériaux et les terres traitées de surface ont permis l'acquisition des résultats suivants (Figure 41).

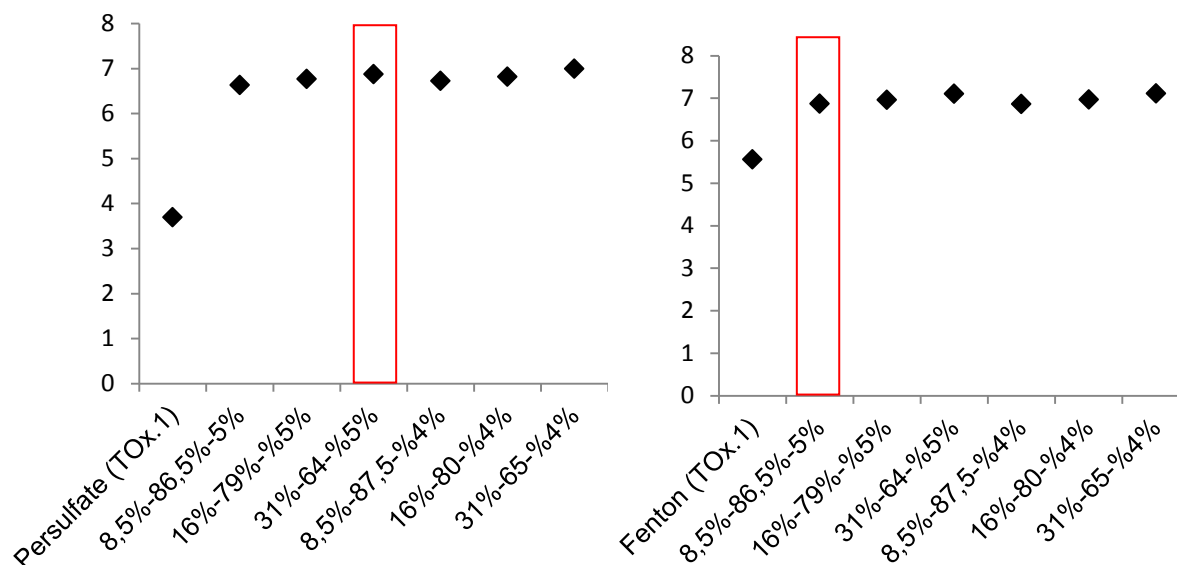


Figure 41 : Evolution du pH en fonction de la teneur en amendement dans les terres oxydées traitées par réaction de Fenton et persulfate activé. Les proportions en matériaux sont représentées en %Sous-produits papetiers (SPP)-%Terre oxydée (TO)-% Compost de déchets verts (CDV). Les proportions entourées en rouge sont les proportions utilisées dans cette expérimentation

Pour la terre oxydée par réaction de Fenton, les proportions en matériaux d'amendement ont été les mêmes que celles choisies pour le chapitre 5 pour la terre NM, afin de pouvoir comparer avec les résultats obtenus en laboratoire. Pour le lysimètre oxydé par persulfate, la proportion choisie en SPP était de 31 % et celle du CDV 5 %. Afin de pouvoir comparer à des témoins non traités et traités, aucune opération n'a été effectuée sur le lysimètre témoin et sur un lysimètre oxydé par la réaction de Fenton.

Pour résumer, les proportions suivantes ont été définies :

Lysimètre témoin : aucun amendement

Lysimètre Fenton A : aucun amendement

Lysimètre Fenton B : 8 % SPP/87 % TO/5 % CDV

Lysimètre Persulfate : 31 % SPP/64 % TO/5 % CDV

2.3.2 Réalisation des amendements

Le protocole de refunctionalisation des lysimètres a été appliqué 5 mois après l'oxydation (Figure 39). Pour les lysimètres amendés, la terre a été excavée sur 15 cm (un apport *in situ* étant rendu très difficile par la présence des parois en acier des lysimètres) et mélangée, dans un malaxeur (Figure 42, c, Cf.2§1.3.1) aux SPP et CDV en proportions définies, avant d'être remplacée dans le lysimètre.

Les proportions des mélanges étant calculées sur la base des matières sèches des différents matériaux (SPP, CDV, TO), des mesures d'humidité ont été réalisées au préalable afin de calculer la masse humide de chaque matériau. Un léger tassement a été appliqué lors de la mise en place afin de compacter le mélange (Figure 42, d). Une couche de 2 à 3 cm de compost a ensuite été déposée sur les lysimètres amendés. Un semis de ray-grass (8 g) et de trèfle blanc (1 g) a été effectué 4 mois après la mise en place des amendements.

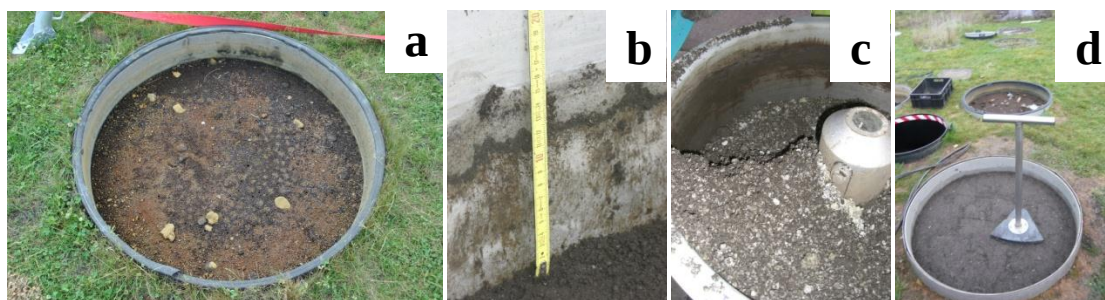
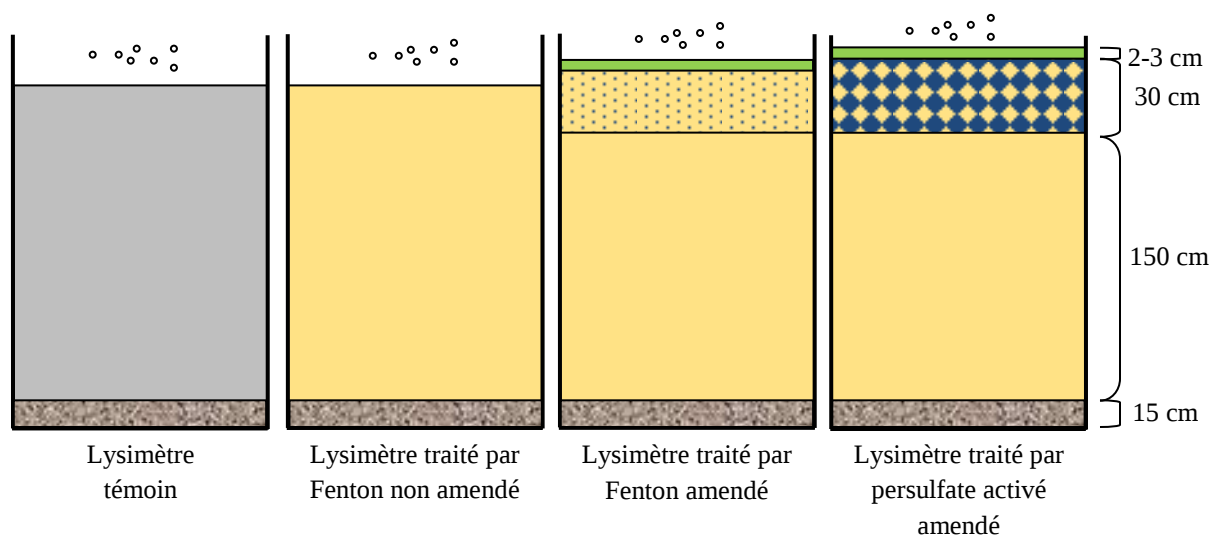


Figure 42 : Photographies des différentes étapes de la refonctionnalisation : a) terre oxydée en place, b) décaissement de 15 cm de terre traitée, c) mélange de la terre avec les matériaux d'amendements en proportions définies, d) disposition du mélange dans le lysimètre



- | | |
|--|--|
|  Terre de Neuves-Maisons |  Mélange SPP/NM/CDV (%) : 8/87/5 |
|  Terre de Neuves-Maisons traitée par oxydation chimique |  Mélange SPP/NM/CDV (%) : 31/64/5 |
|  Compost de déchets |  Sable |
| ◦ ◦ ◦ ◦ ◦ Semis : 8 g de ray gras et 1 g de trèfle blanc | |

Figure 43 : Représentation schématique des lysimètres témoin, traité par réaction de Fenton et par persulfate activé

2.4 Prélèvements, échantillonnages et analyses

Afin de permettre des prélèvements à plusieurs temps, l'échantillonnage a été réalisé par carottage vertical de sol à la tarière sur la hauteur complète du lysimètre (Figure 44 a et b). Plusieurs couches de sol ont ainsi été prélevées afin d'établir un profil vertical de l'évolution des paramètres (Figure 45). Chaque prélèvement, destiné à être analysé, a été disposé dans une gouttière en plastique pour observations et comparaisons visuelles (Figure 44, c). Les trous formés par les prélèvements (une carotte de sol par temps de prélèvement) ont été comblés à l'aide d'une gaine en plastique introduite sur toute la hauteur et remplie de bentonite. La bentonite a ensuite été humidifiée afin de gonfler et de coller la gaine en plastique aux parois du sol.

Les différentes analyses ont porté sur toutes ou une partie des couches prélevées, comme indiqué dans la figure 7. Les analyses physico-chimiques suivantes ont été réalisées : pH, Corg, Ntot, POlsen, CEC, bases échangeables, texture, teneurs en polluants (HAP, ETM). Pour toutes les analyses physico-chimiques sur la terre (Ch2§2.3.1) une seule mesure a été réalisée par couche de sol, sauf pour les dosages de HAP avec 3 réplicats par couche de prélèvement. Pour les analyses de densité (dénombrement par PCR quantitative) et de diversité bactérienne (analyse par TTGE, Ch2§2.4.4), trois réplicats ont été réalisés, de même que pour les mesures d'activité (activité des hydrolases, Ch2§2.4.2.1) (Figure 45). Les mesures en temps réel (*e.g.* température) ont été enregistrées à l'aide de sondes reliées à des stations informatiques. Pour les mesures de biomasse, les plants de ray-grass et de trèfle ont été récoltés après 4 et 5 mois de croissance sur les différents lysimètres. La coupe a été effectuée à 5 cm de la surface du sol. Les prélèvements des solutions de percolations ont été répartis dans le temps.



Figure 44 : Photographies du prélèvement dans les lysimètres, a) tarière, b) prélèvement d'un échantillon d'une hauteur de 15cm, c) disposition des échantillons destinés à être analysés dans une gouttière en plastique

Prélèvement	TOx.1		Profondeur (cm)	Analyses physico- chimiques	Activité biologique	Densité microorganismes	Diversité microorganismes	HAP
		H1	0 – 7					
		H2	7 - 12					
		H3	12 – 20					
		H4	20 – 30					
		H5	30 – 40					
		H6	40 – 70					
		H7	70 – 90					
		H8	90 – 130					
		H9	130 – 160					
Prélèvement	TOx.6	H1	0 – 7					
Prélèvement	Trefonc	H1	0 – 7					
Prélèvement	Trefonc.8	H1	0 – 7					
		H2	7 - 12					
		H3	12 – 20					
		H4	20 – 30					
		H5	30 – 40					
		H6	40 – 70					
		H7	70 – 90					

Figure 45 : Profondeur des prélèvements analysés sur les terres à chaque étape. Les cases en gris correspondent aux couches de prélèvements qui ont été analysées pour les paramètres correspondants

3. Résultats

3.1 Impact de l'oxydation in situ sur les paramètres de la terre

3.1.1 Evolution de la teneur en polluant à TOx.1 en fonction de la profondeur

3.1.1.1 Teneur en HAP

Les teneurs en HAP mesurées dans le lysimètre témoin variaient entre 1550 et 2200 mg.kg⁻¹. Cette forte variabilité a également été observée pour les mesures effectuées dans les terres des autres lysimètres. Par ailleurs, les concentrations des HAP dans les différentes couches du lysimètre témoin ont toutes été supérieures à celles mesurées dans les autres lysimètres, et même quand il s'agissait des couches les plus profondes moins impactées par l'oxydation. De

ce fait, il était très difficile de comparer les valeurs obtenues dans les lysimètres traités par rapport à celles obtenues dans le témoin, malgré des différences qui peuvent paraître significatives. Les concentrations en HAP ne variaient pas significativement en fonction de la profondeur pour les terres du lysimètre témoin et du lysimètre traité par Fenton « B ». En revanche, une baisse significative de la teneur en HAP a été mesurée entre la couche de surface (0-7 cm) et celles plus en profondeur pour les terres traitées par Fenton « A » ($\approx 30\%$) et persulfate activé ($\approx 30\%$) (Figure 46).

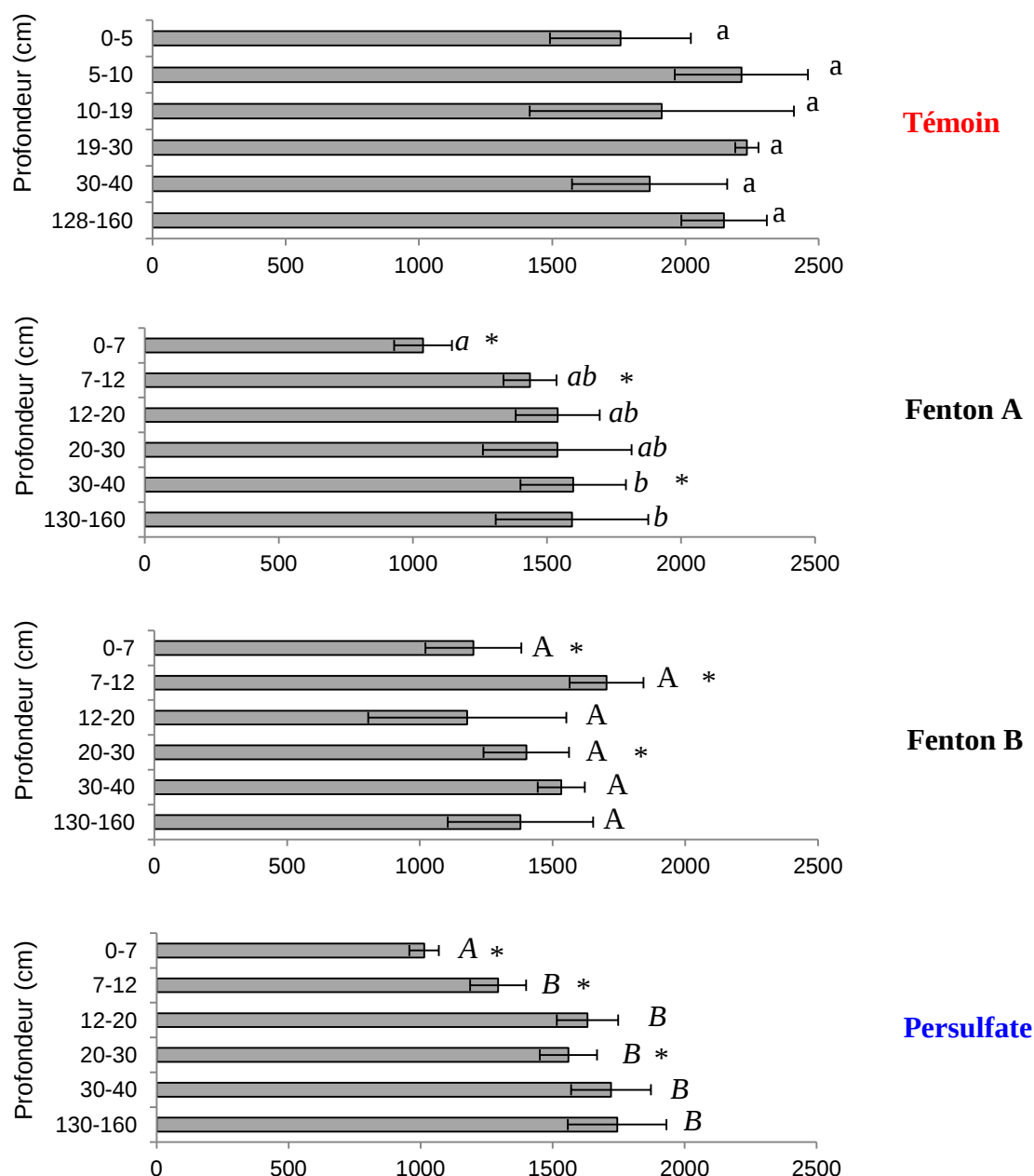


Figure 46 : Concentrations en HAP (16 US-EPA) en fonction de la profondeur, dans la terre NM témoin et les terres traitées par réaction de Fenton ou persulfate (données issues de la thèse de Julien Lemaire, 2011). Les catégories de lettres représentent les résultats des tests statistiques pour chaque lysimètre (Anova, $p < 0,05$). Les * représentent les différences significatives par rapport aux valeurs du lysimètre témoin (Anova, $p < 0,05$).

3.1.1.2 Teneur en métaux

Comme décrit dans le chapitre 2, certains métaux comme le Cr, Pb ou Zn étaient fortement présents dans la terre NM ($> 400 \text{ mg.kg}^{-1}$) et ont donc été analysés (Tableau 26). Compte tenu du fait que pour ces analyses une seule répétition a été effectuée et que les teneurs en certains éléments étaient très variables, ce sont les évolutions en fonction de la profondeur qui ont surtout été regardées. Ainsi, pour certains métaux comme Pb (figure 47), Cr, Co, As, on ne note pas un effet net de l'oxydation chimique sur la concentration donc la mobilité de ces éléments. En revanche pour d'autres éléments métalliques comme Zn, Cd, et plus légèrement pour Ni, les analyses suggèrent une baisse de concentrations dans la ou les couches de surface. Des effets de l'oxydation sur les fractions extractibles à l'EDTA de certains métaux ont aussi été observés.

Zn: Les différences de teneur en Zn étaient, pour le prélèvement à 7 cm et par rapport à la terre témoin, de 700 mg.kg^{-1} pour la terre traitée par réaction de Fenton et de 900 mg.kg^{-1} pour les terres traitées par persulfate (Tableau 26). Cette réduction de 50 % de la teneur en Zn dans les couches de surface disparaît avec la profondeur. En effet, à 20 cm, les valeurs mesurées étaient proches de celles retrouvées dans les terres témoins ($> 2000 \text{ mg.kg}^{-1}$).

Cd, Ni: Pour le Cd, une forte diminution (67 à 40 %) de la teneur a été observée dans la couche 0-7 cm des terres traitées par réaction de Fenton ou par persulfate par rapport aux couches plus profondes et aux valeurs du témoin (Figure 47). A 12 cm, les teneurs en Cd des terres oxydées étaient proches de celles du témoin et des couches plus profondes. Pour Ni, une baisse d'environ 10% de la teneur dans les terres traitées par Fenton ou persulfate a été observée jusqu'à 12 cm par rapport aux couches plus profondes et au témoin (Figure 47).

Molybdène (Mo): les teneurs en Mo dans les terres traitées par persulfate étaient plus faibles, quelle que soit la profondeur, que celles des terres traitées par réaction de Fenton ou les terres témoins (Tableau 26). Aucun effet de la réaction de Fenton n'a été observé sur cet élément.

Cu: Dans les terres traitées par persulfate, la teneur en Cu était 4 fois plus élevée à 7 cm et 1,5 fois à 12 cm par rapport à celles mesurées à 40 cm (Tableau 26). Par ailleurs, les teneurs mesurées en surface étaient plus élevées (1,6 fois au minimum) que toutes les autres valeurs obtenues dans les prélèvements des autres lysimètres.

Fe: l'apport de fer pour la réaction de Fenton ne s'est pas traduit par une augmentation accrue des teneurs en Fe dans les terres de surface traitées, du fait des concentrations initiales en Fe élevées.

Fer extractible : Les teneurs en Fe extractible à l'EDTA étaient 2 fois plus élevées dans la terre de surface traitée par réaction de Fenton que dans celles du témoin (Tableau 26). Toujours par rapport aux valeurs mesurées dans les terres témoins, les teneurs en Fe extractibles à l'EDTA étaient 17 fois plus élevées dans les terres de surfaces (0-7cm) traitées par persulfate. Cependant, cet effet diminuait avec la profondeur (facteur 4 à 40 centimètres).

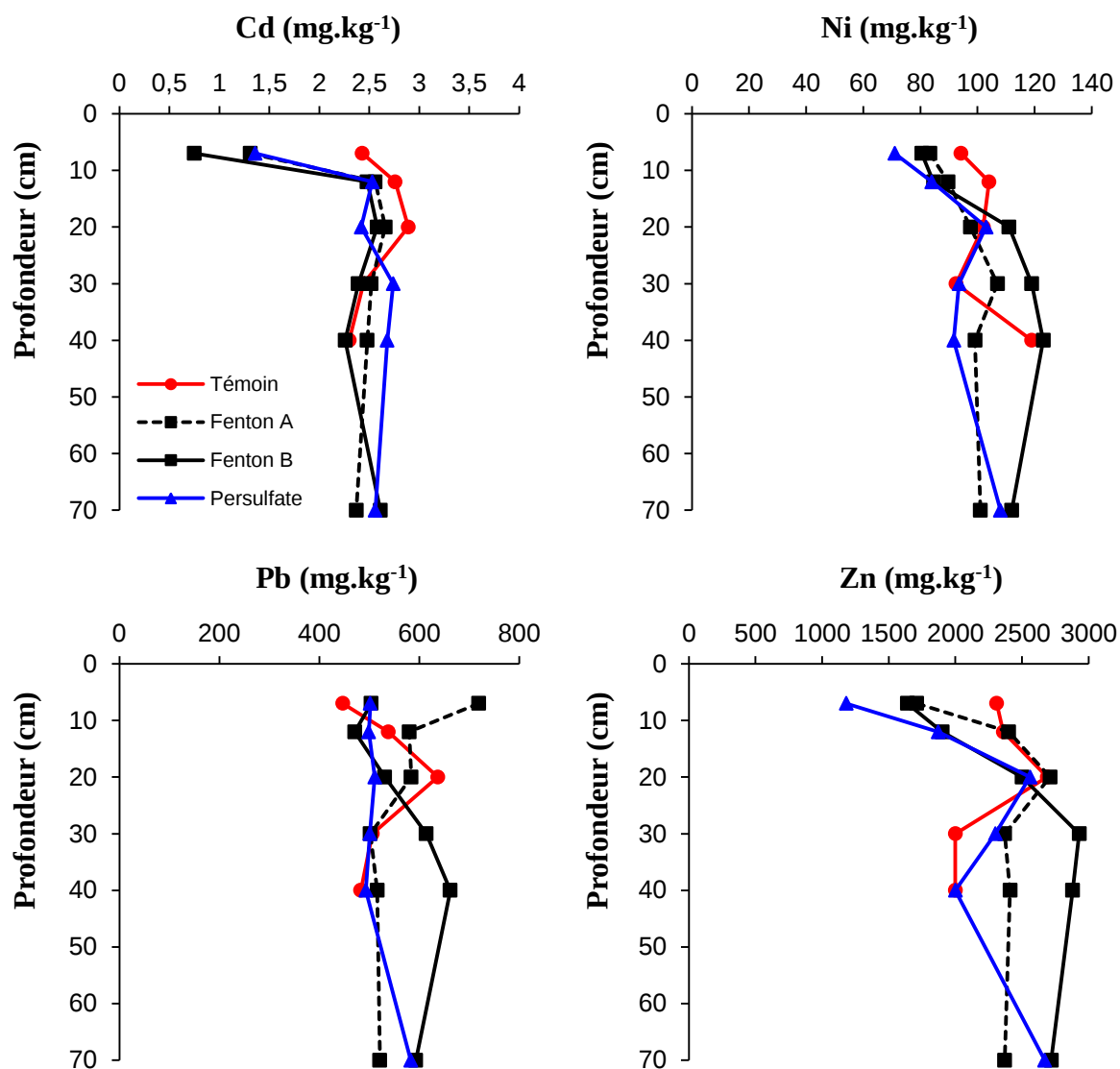


Figure 47 : Teneurs en cadmium, nickel, plomb et zinc total, en fonction de la profondeur, dans la terre témoin et les terres traitées par réaction de Fenton ou persulfate (après oxydation TOx.1)

Cu et Zn extractibles à l'EDTA: Aucun effet du traitement par réaction de Fenton n'a été observé pour le Cu, le Zn. Par rapport aux teneurs mesurées dans les terres témoins, le traitement par persulfate induisait cependant une augmentation des teneurs en Cu et Zn extractibles à l'EDTA d'un facteur 1,6 et 2,8 dans les terres de surfaces (0-7cm) mais cet effet diminue avec la profondeur comme pour le Fe (1,3 et 2,3 à 40 cm) (Tableau 26).

Mn extractible à l'EDTA : Les teneurs en Mn extractible dans les terres traitées par réaction de Fenton augmentaient en fonction de la profondeur. A 20 centimètres les valeurs mesurées dans Fenton « A » étaient 3,3 fois supérieures à celles mesurées à 7 cm et 7.4 fois à 40 cm (Tableau 26). Les mêmes variations ont été observées dans la terre traitée par Fenton « B ». Aucun impact notable du persulfate n'a été observé sur cet élément, même si les teneurs semblaient augmenter à partir de 70 cm (Tableau 26).

Tableau 26 : Analyse des métaux totaux et extractibles à l’EDTA dans les terres traitées par réaction de Fenton ou persulfate et la terre témoin en fonction de la profondeur

			0 – 7 cm				7 – 12 cm				12 – 20 cm				20 – 30 cm				30 – 40 cm				40 – 70 cm		
			unités	Témoïn	Fenton A	Fenton B	Persulfate	Témoïn	Fenton A	Fenton B	Persulfate	Témoïn	Fenton A	Fenton B	Persulfate	Témoïn	Fenton A	Fenton B	Persulfate	Témoïn	Fenton A	Fenton B	Persulfate		
Métaux totaux	B	mg.kg ⁻¹	4,3	2,0	2,4	5,3	4,3	2,5	2,6	4,7	4,2	2,9	3,6	5,2	4,8	3,8	4,2	6,2	5,3	4,7	4,9	7,0	5,3	7,2	5,4
	Cr	mg.kg ⁻¹	866,0	784,0	676,0	583,0	862,0	597,0	874,0	805,0	716,0	685,0	712,0	709,0	916,0	823,0	616,0	643,0	930,0	849,0	548,0	761,0	720,0	635,0	648,0
	Co	mg.kg ⁻¹	25,0	23,3	23,8	22,1	25,9	25,2	22,2	24,0	27,9	25,7	26,7	25,6	24,8	25,9	30,0	24,7	25,7	26,0	31,7	24,6	26,6	27,9	29,3
	Cu	mg.kg ⁻¹	123,0	133,0	123,0	200,0	129,0	122,0	116,0	153,0	131,0	126,0	131,0	128,0	118,0	125,0	128,0	118,0	126,0	139,0	130,0	123,0	126,0	136,0	136,0
	Ni	mg.kg ⁻¹	94,2	83,3	80,5	71,0	104,0	89,7	84,6	84,0	102,0	97,5	111,0	103,0	92,5	107,0	119,0	93,5	119,0	99,1	123,0	91,7	101,0	108,0	112,0
	Zn	g.kg ⁻¹	2,3	1,7	1,6	1,2	2,4	2,4	1,9	1,9	2,7	2,7	2,5	2,5	2,0	2,4	2,9	2,3	2,0	2,4	2,9	2,0	2,40	2,7	2720,0
	Cd	mg.kg ⁻¹	2,4	1,3	1,4	0,8	2,8	2,6	2,5	2,5	2,9	2,7	2,4	2,6	2,4	2,5	2,7	2,4	2,3	2,5	2,7	2,3	2,4	2,6	2,6
	Mo	mg.kg ⁻¹	10,5	11,6	11,4	8,0	12,1	9,9	10,7	8,2	10,1	10,2	13,4	9,6	10,8	12,0	10,7	8,5	16,0	9,4	10,9	9,5	9,8	9,0	10,4
	Pb	mg.kg ⁻¹	447,0	719,0	504,0	502,0	538,0	580,0	471,0	499,0	637,0	584,0	531,0	511,0	506,0	502,0	614,0	501,0	483,0	516,0	662,0	493,0	521,0	583,0	593,0
	As	mg.kg ⁻¹	49,2	66,0	60,2	56,6	59,7	62,7	48,5	48,1	66,9	62,4	62,3	51,8	55,1	57,4	66,0	46,9	57,0	56,5	76,1	52,5	61,6	65,6	70,6
	Fe	g.kg ⁻¹	199,3	234,9	226,0	206,0	240,8	248,2	227,6	227,4	240,1	249,3	263,3	209,9	241,1	229,0	242,1	205,3	-	-	-	-	-	-	-
Métaux extractible EDTA	Cu	mg.kg ⁻¹	15	9,2	10,5	86,9	16,7	10,3	9,97	33,1	15,4	10,7	10,6	22,6	14	10,9	11,2	22,2	14,9	13,6	13,2	22,2	13,3	22,1	14,9
	Fe	mg.kg ⁻¹	103	196	188	1680	86,4	144	118	695	97,5	111	106	450	101	105	97,6	431	94,4	109	111	392	104	230	106
	Mn	mg.kg ⁻¹	88,6	63,7	83,7	58,6	72,3	102	140	72,7	87	210	239	76,8	103	520	508	84	88,9	471	697	84,7	250	88,7	188
	Zn	mg.kg ⁻¹	195	100	102	313	202	147	147	455	210	204	197	699	187	193	198	512	202	214	233	461	220	400	210

Cr : chrome, Co : cobalt, Cu : cuivre, Ni : nickel, Zn : zinc, Cd : cadmium, Mo : molybdène, Pb : plomb, As : arsenic, Fe : fer, Mn : manganèse

3.1.2 Impact de l'oxydation in situ sur les paramètres physico-chimiques à

TOx.1

3.1.2.1 *pH, C_{org}, N_{tot}, carbonates, P_{Olsen}, CEC et bases échangeables (TOx.1)*

pH: Les pH des terres ont fortement été diminués par les traitements d'oxydation chimique alors que les valeurs pour les terres témoins étaient relativement stables, autour de 7,6 quelle que soit la hauteur de prélèvement. Pour les terres traitées par persulfate, les valeurs de pH ont diminué de 3,6 unités pour le prélèvement de surface à 5,9 pour le prélèvement à 70 cm (Figure 49). L'acidification par la réaction de Fenton a été principalement observée en surface. Les terres ont ainsi perdu 2 unités pH sur les 7 premiers cm, alors qu'à 70 cm, le pH était identique à celui mesuré dans le lysimètre témoin (7,6). L'évolution du pH a été sensiblement identique pour les deux lysimètres traités par réaction de Fenton.

C_{org} et N_{tot}: Dans les terres traitées par persulfate, les teneurs en C_{org} et en N_{tot} mesurées à 7 cm étaient 25 % plus faibles que celles mesurées dans les prélèvements plus profonds (Figure 48). Une forte hétérogénéité a été observée pour les valeurs obtenues dans les deux lysimètres traités par réaction de Fenton ainsi que pour le témoin. Ainsi, il a été difficile de déterminer un effet de la réaction d'oxydation sur les teneurs en C_{org} et en N_{tot} des terres traitées par réaction de Fenton.

Carbonates: Par rapport aux teneurs retrouvées dans le témoin, une diminution de 60 % de la teneur en carbonates a été constatée dans les 70 premiers cm des terres traitées par persulfate activé. Pour les terres traitées par réaction de Fenton, les teneurs en carbonates étaient 40 à 60 % plus faibles dans les vingt premiers centimètres que celles mesurées dans le témoin. L'impact sur les carbonates était cependant, dans ce cas, moins fort avec la profondeur (Figure 48).

P_{Olsen}: L'impact de l'oxydation sur les teneurs en P_{Olsen} était aussi plus important en surface qu'en profondeur. Dans les terres traitées par persulfate, les teneurs en P mesurées à 7 et 40 cm étaient respectivement 52 à 36 % plus faibles que celles mesurées dans les terres témoins. Les variations étaient identiques, voire plus marquées, dans les terres traitées par réaction de Fenton. Dans les terres traitées par réaction de Fenton, les teneurs en P_{Olsen} mesurées à 7 et 40 cm étaient respectivement 80 % et 43 % plus faibles que celle mesurée dans le témoin. Les valeurs obtenues pour les deux lysimètres traités par réaction de Fenton étaient relativement identiques pour ce paramètre (Figure 48).

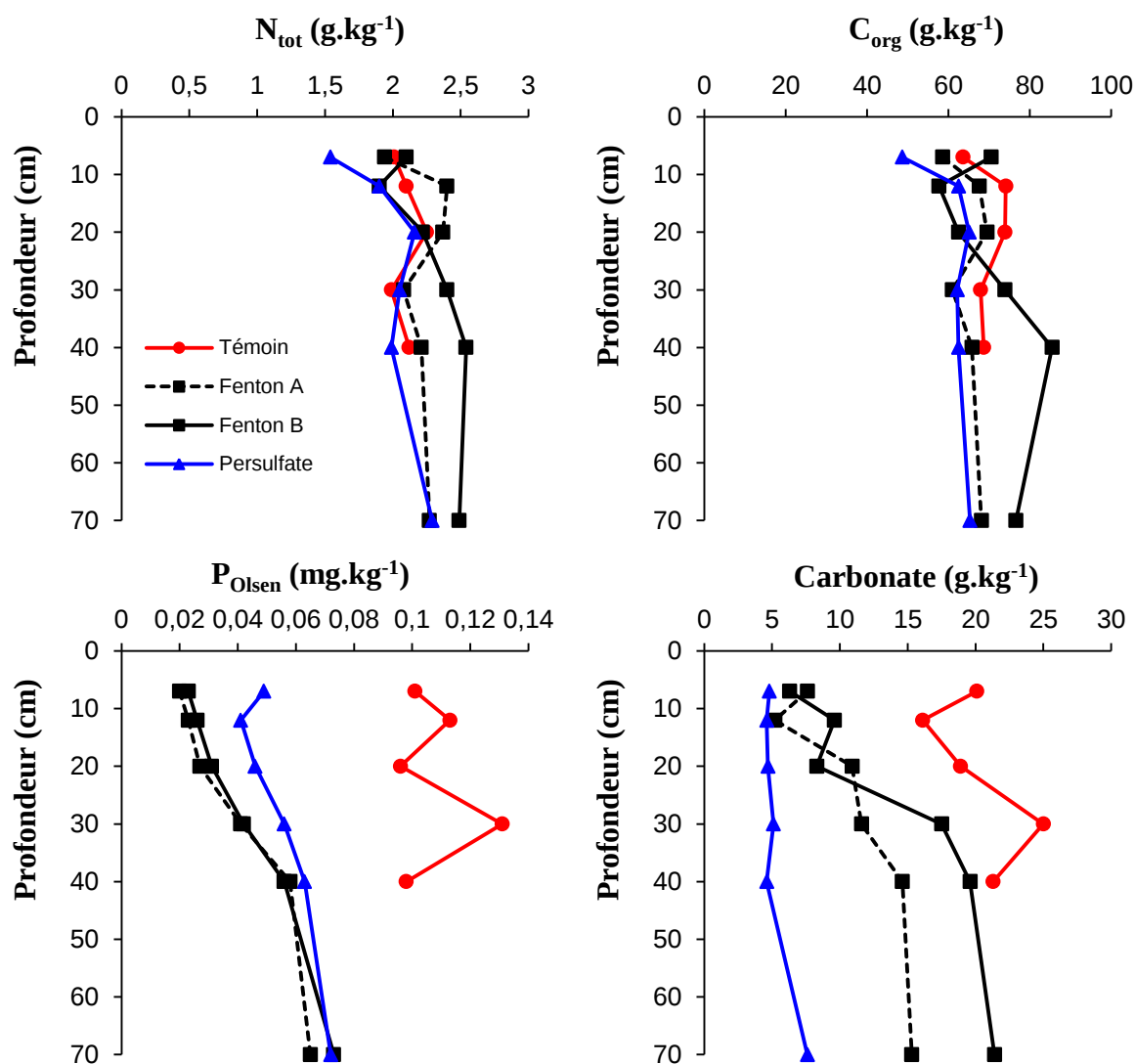


Figure 48 : Teneurs en C_{org}, N_{tot}, en P_{Olsen} et en carbonates en fonction de la profondeur, dans la terre témoin et les terres traitées par réaction de Fenton

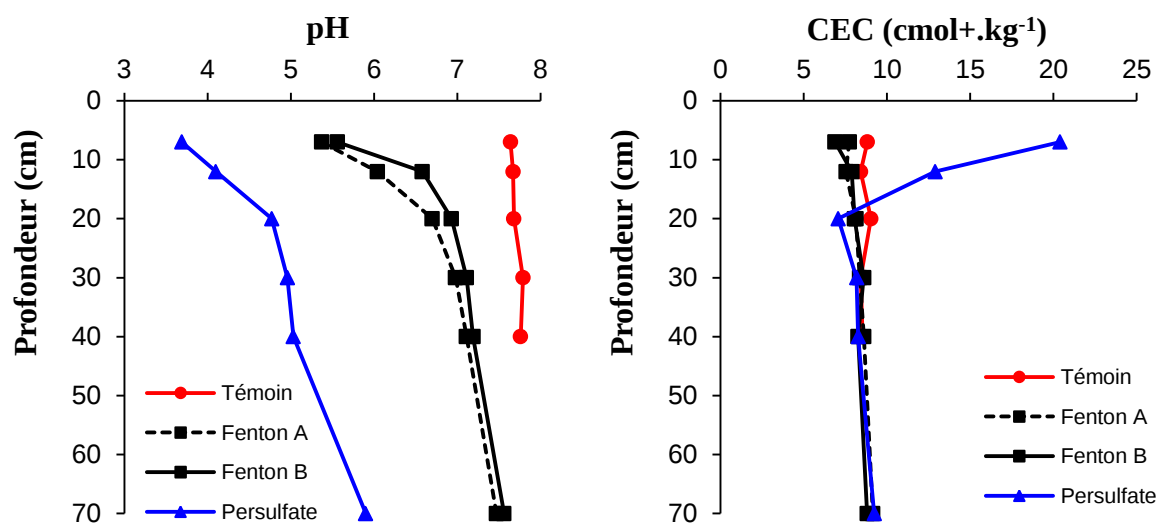


Figure 49: pH et CEC en fonction de la profondeur, dans la terre témoin et les terres traitées par réaction de Fenton ou persulfate

Tableau 27 : Paramètres physico-chimiques des terres traitées par réaction de Fenton ou persulfate en fonction de la profondeur après traitement

			0 – 7 cm				7 – 12 cm				12 – 20 cm				20 – 30 cm				30 – 40 cm				40 – 70 cm		
			unités	Témoin	Fenton A	Fenton B	Persulfate	Témoin	Fenton A	Fenton B	Persulfate	Témoin	Fenton A	Fenton B	Persulfate	Témoin	Fenton A	Fenton B	Persulfate	Témoin	Fenton A	Fenton B	Persulfate		
Granulométrie	Argile	%	15,9	14,2	13,7	42,9	16,7	15,0	14,5	11,1	16,1	15,8	15,0	19,6	15,8	16,5	16,6	21,6	15,8	15,5	17,5	20,9	17,1	20,5	17,0
	Limons fins	%	18,0	18,4	17,2	22,3	16,3	21,1	20,2	15,7	16,9	18,3	17,6	16,3	17,0	19,3	18,5	15,9	16,7	19,1	18,5	16,7	18,0	15,2	18,4
	Limons grossiers	%	9,8	9,6	8,5	9,3	9,1	7,8	8,0	17,4	9,3	8,4	8,2	6,5	9,0	8,0	9,9	7,2	8,4	8,2	9,4	7,0	8,2	6,5	9,4
	Sables fins	% ¹	15,3	13,3	11,5	6,0	13,3	12,3	12,1	12,9	13,2	11,9	11,4	11,1	12,3	13,0	13,4	11,2	12,0	12,0	11,7	12,5	11,6	11,2	10,5
	Sables grossiers	%	41,0	44,5	49,1	19,5	44,6	43,8	45,2	42,9	44,5	45,6	47,8	46,5	45,9	43,2	41,6	44,1	47,1	45,2	42,9	42,9	45,1	46,6	44,7
Paramètres Agronomiques	N	<i>g.kg⁻¹</i>	2,0	1,9	2,1	1,5	2,1	2,4	1,9	1,9	2,2	2,4	2,2	2,2	2,0	2,1	2,4	2,0	2,1	2,2	2,5	2,0	2,3	2,3	2,5
	C/N	-	31,6	30,2	33,5	31,6	34,4	28,4	30,2	32,4	32,8	29,4	28,2	30,2	34,1	29,3	30,7	30,3	32,5	29,7	33,7	31,4	30	28,5	30,8
	Corg	<i>g.kg⁻¹</i>	63,6	58,6	70,5	48,7	74,1	67,6	57,7	62,5	73,9	69,5	62,5	65,1	67,9	61	73,9	62,2	68,7	65,8	85,5	62,5	68,1	65,3	76,6
	pH	-	7,6	5,4	5,6	3,7	7,7	6,0	6,6	4,1	7,7	6,7	6,9	4,8	7,8	7,0	7,1	5,0	7,8	7,1	7,2	5,0	7,5	5,9	7,6
	CaCO ₃	<i>g.kg⁻¹</i>	20,1	7,6	6,3	4,8	16,1	5,2	9,6	4,6	18,9	10,9	8,3	4,7	25	11,6	17,5	5,1	21,3	14,6	19,6	4,6	15,3	7,6	21,4
	P ₂ O ₅	<i>mg.kg⁻¹</i>	101,0	20,0	23,0	49,0	113,0	23,0	26,0	41,0	96,0	27,0	31,0	46,0	131,0	41,0	42,0	56,0	98,0	58,0	56,0	63,0	65,0	72,0	73,0
	Ca	<i>g.kg⁻¹</i>	36,7	40	41,4	43,5	38,8	47,4	45,4	46,3	39	47,2	44,8	46,1	42,3	45,4	46,9	46,6	43,2	47,5	43,6	46,7	46,7	47,5	44,0
	Mg	<i>mg.kg⁻¹</i>	396	149	174	714	423,0	153,0	165,0	314	407,0	181,0	179,0	301,0	485,0	202,0	183,0	365,0	876,0	368,0	360,0	408,0	560,0	457,0	614,0
	K	<i>mg.kg⁻¹</i>	424	76,9	94,5	159,0	420,0	206,0	316,0	89,8	441,0	433,0	547,0	94,8	453,0	442,0	476,0	148,0	46,0	446,0	494,0	194,0	456,0	388,0	475,0
	CEC	<i>cmol+.kg⁻¹</i>	8,8	7,7	6,9	20,4	8,4	7,5	7,9	12,9	9	8,1	8,1	7,1	8,4	8,4	8,6	8,2	8,5	8,6	8,3	8,3	9,1	9,2	8,8

- N : azote, Corg : carbone organique, CaCO₃ : carbonate de calcium, P₂O₅ : phosphore assimilable, Ca : calcium échangeables, Mg : magnésium échangeable, K : potassium échangeable, CEC : capacité d'échange

CEC et bases échangeables : La CEC a été peu affectée dans les terres traitées par réaction de Fenton (Figure 49). Les teneurs en K et Mg échangeables ont cependant été fortement altérées, avec des baisses maximales respectives, par rapport aux valeurs du témoin, de 82 % et 63 %. Au contraire, la CEC de la terre traitée par persulfate présentait une augmentation de $12 \text{ cmol}^+.\text{kg}^{-1}$ dans les 7 premiers cm par rapport à la CEC mesurée en profondeur. Les teneurs en Mg dans les terres à 7 cm, traitées par persulfate, étaient 1,8 fois plus élevées que celles retrouvées dans le témoin à la même profondeur et identiques à celles du témoin à 40 cm (Tableau 27). Cependant, la grande variabilité observée pour cet élément n'a pas permis de définir un effet réel du persulfate. Néanmoins, comme pour les terres traitées par réaction de Fenton, la teneur en K échangeable a diminué, avec une baisse maximale de 63 % des valeurs retrouvées dans le témoin (Tableau 27). L'effet de l'oxydation sur la teneur en K échangeable a été mesuré jusqu'à 40 cm de profondeur. Concernant le Ca, les teneurs ne variaient pas, que ce soit entre les terres témoin et traitées par oxydation ou en fonction de la profondeur.

3.1.2.2 *Impact du traitement sur la granulométrie (TOx.1)*

La texture des terres, prélevées en surface, traitées par réaction de Fenton et la terre témoin est identique (Tableau 27) avec une prédominance des sables grossiers (> 40 %) et des faibles proportions d'argile (<15 %). Aucun effet en fonction de la profondeur n'est observé. La granulométrie évolue fortement dans la terre de surface (0-7cm) traitée par persulfate. On observe une diminution des sables fins (-60 %) et grossiers (-50 %) avec en parallèle une augmentation importante de la classe des argiles (facteur 3) et des limons fins (facteur 1,2).

3.1.2.3 *Evolution de la température*

Pendant l'injection *in situ* des oxydants, un dégagement de vapeur d'eau a été observé (Figure 51). Des mesures de gaz ont été réalisées en surface et ont permis de mettre en avant une augmentation des teneurs en dioxygène et en dioxyde de carbone (BRGM, *communication personnelle*). Les profils de température ont été similaires entre les lysimètres, quelle que soit la profondeur observée, sauf au moment de l'injection (Figure 50). Pendant cette période, une augmentation maximale de 15°C maximum a été mesurée. Cette augmentation était essentiellement observable à 50 cm de profondeur pour les lysimètres traités par réaction de Fenton, alors que pour le lysimètre traité par persulfate activé cette augmentation était mesurable à 1 m. La température de surface a sûrement été plus élevée que celle mesurée en profondeur, comme le montre la colonne de vapeur d'eau s'échappant du lysimètre pendant le traitement (Figure 51).

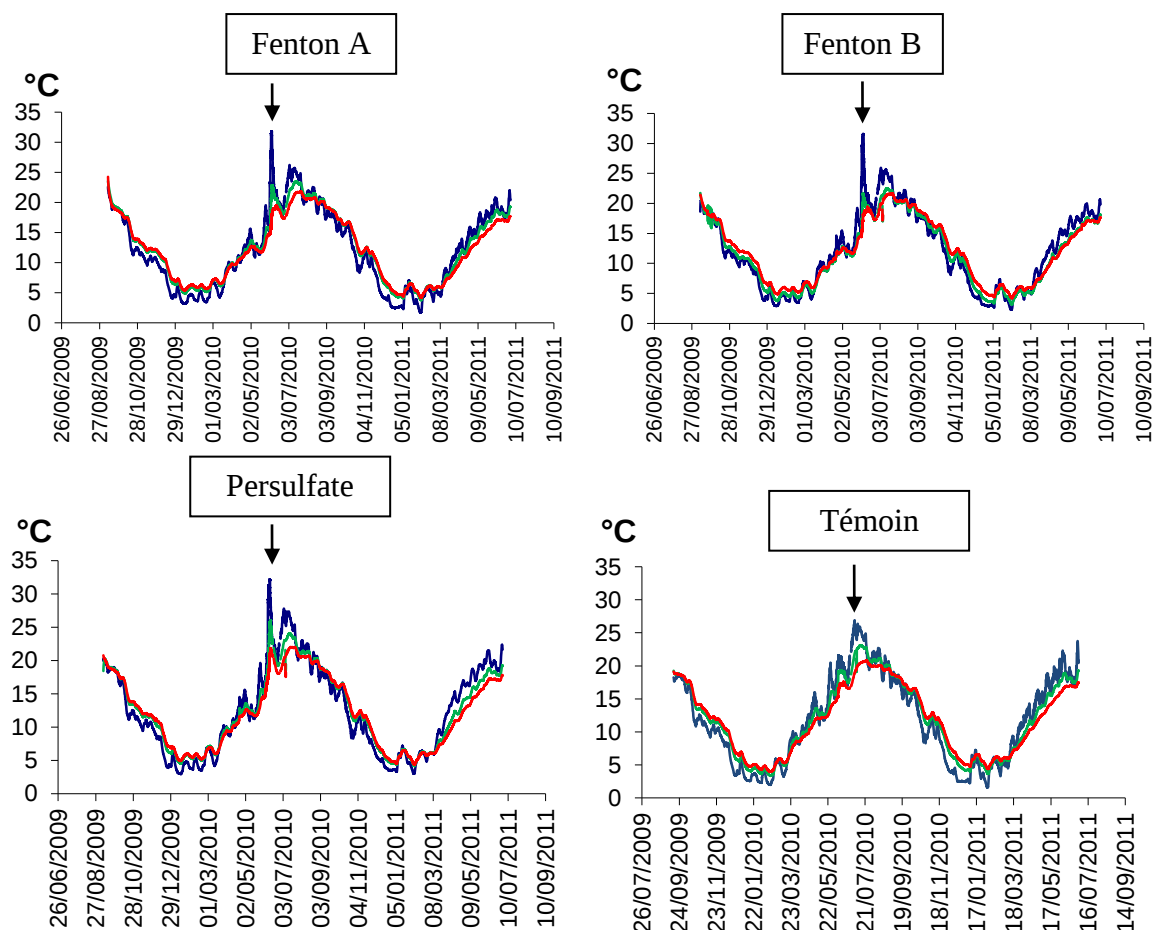


Figure 50 : Evolution de la température dans les lysimètres traités par oxydation chimique et témoin traité à l'eau à différentes profondeurs (— : 50 cm, — : 100 cm, — : 150 cm). Les flèches représentent le moment de la période d'injection

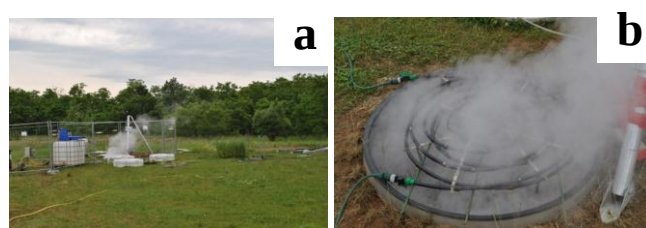


Figure 51 : Photographie de la zone contrôlée (a) et de la surface du lysimètre pendant l'oxydation *in situ*

3.1.3 Impact de l'oxydation *in situ* sur les paramètres biologiques à TOx.1

3.1.3.1 Mesure de la densité et de la diversité bactérienne à TOx.1

Un mois après le traitement, le nombre de copies de gène d'ADNr 16S dans les différentes couches des terres traitées par persulfate était beaucoup plus faible que ceux dénombrés dans les terres témoin et traitées par réaction de Fenton, (Figure 52). Cette diminution liée à l'oxydation par le persulfate a été observée jusqu'à 70 cm de profondeur. Pour les terres traitées par réaction de Fenton, ce nombre de copies de gène semblait plus faible à 7 cm que dans les couches inférieures, cependant cette différence n'était pas significative. La densité bactérienne ne variait pas en fonction de la profondeur pour la modalité témoin.

On remarque par ailleurs que pour ces mesures, les valeurs obtenues étaient relativement proches et montraient peu de variabilité.

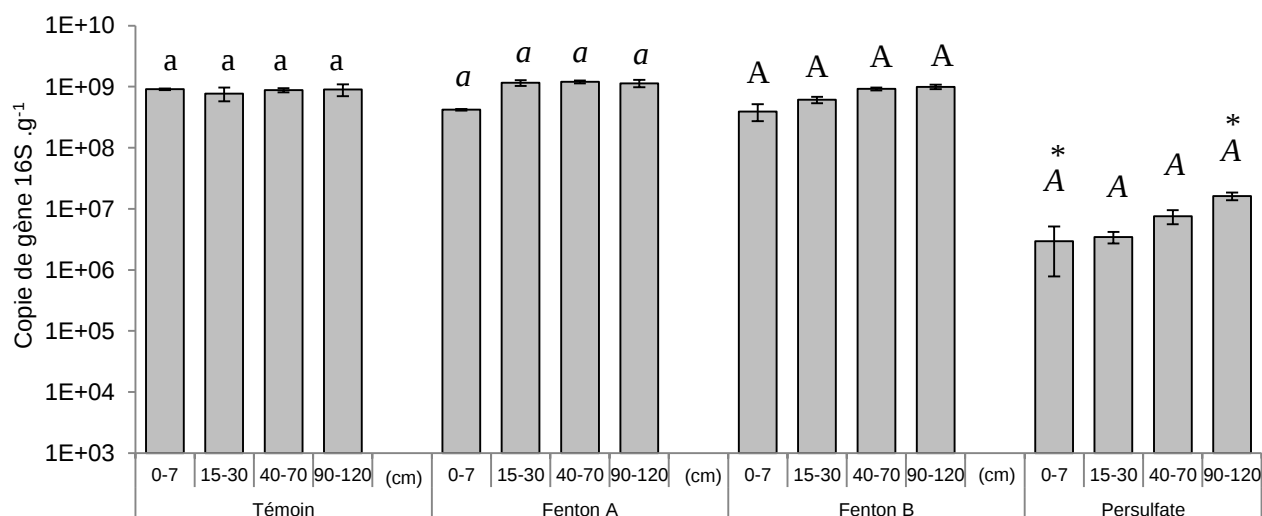


Figure 52 : Nombre de copie de gène d'ADNr 16 s (moyenne et erreur standard, n=3) pour les terres traitées par réaction de Fenton ou persulfate activé et pour la terre témoin en fonction de la profondeur. Chaque catégorie de lettres représente les résultats des tests statistiques effectués sur les différentes couches d'un même lysimètre (Kruskall-wallis <0,05). Les * représentent les différences significatives par rapport aux valeurs du lysimètre témoin (Kruskall-wallis, p <0,05).

Les analyses de diversité effectuées uniquement sur les prélèvements de surface à 7 cm n'ont pas pu être réalisées pour les terres traitées par persulfate, car l'amplification par PCR de l'ADN extrait (cf.2§2.4.4) n'a pas fonctionné. Les profils de TTGE obtenus avec les échantillons des terres traitées par réaction de Fenton et témoin, montrent autant de variabilité entre les répétitions d'un même lysimètre qu'entre les lysimètres (Figure 53). Cette variabilité a été confirmée par des analyses complémentaires (*données non présentées*). L'ACP effectuée sur les données issues des gels TTGE a permis de distinguer d'une manière générale et malgré l'hétérogénéité, que les populations s'étant développées un mois après oxydation sur les terres étaient différentes de celles retrouvées dans la terre initiale (Figure 53).

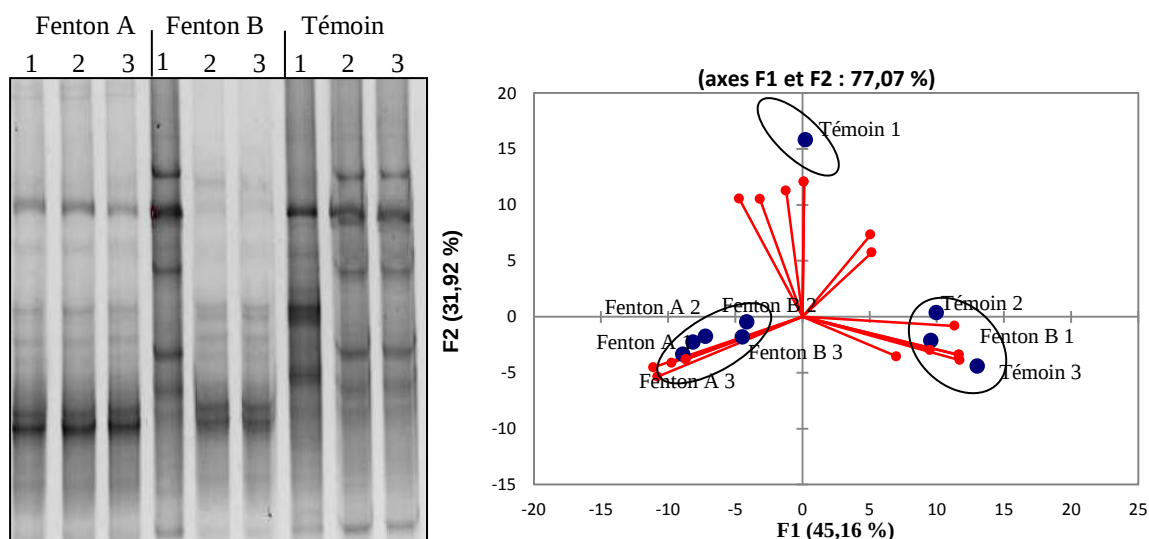


Figure 53 : a) Gel TTGE montrant les différents profils obtenus par les techniques de PCR-TTGE sur l'ADN 16S dans les prélèvements à 7 cm des terres des lysimètres témoin et traités par réaction de Fenton. b) Analyse en composante principale des profils de communautés bactériennes obtenus par TTGE. Les ellipses représentent les groupes déterminés par une classification *k-means*.

3.1.3.2 Mesure de l'activité bactérienne après traitement à TOx.1

Les activités des hydrolases, mesurées un mois après traitement, étaient variables dans les terres témoins et se situaient entre 15 et 25 $\mu\text{g h}^{-1}$ de fluorescéine hydrolysée. Ces variations étaient significatives entre les prélèvements de surface (7 cm) et les prélèvements plus profonds (70 cm). Dans les terres de surface traitées par réaction de Fenton, les activités mesurées étaient presque nulles. Une différence significative entre l'activité mesurée pour les prélèvements à 7 cm et celles à 12, 30 ou 70 cm a été observée (Figure 54).

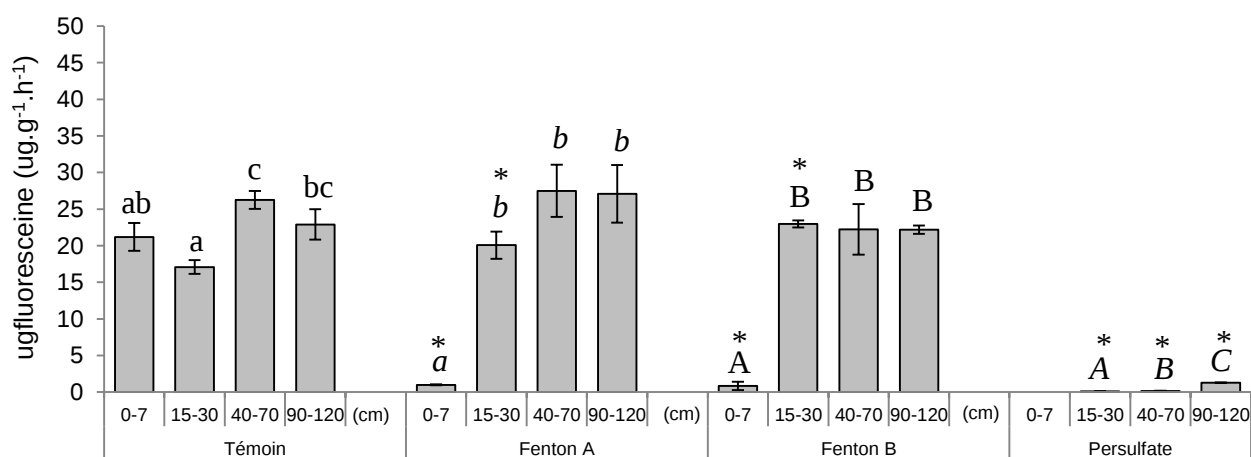


Figure 54 : Activité des hydrolases (moyenne et écart-type, n=3) par mesure de la formation de fluorescéine à partir de la fluorescéine diacétate dans les traitées par réaction de Fenton ou persulfate activé et la terre témoin, en fonction de la profondeur. Les catégories de lettres représentent les résultats des tests statistiques pour chaque lysimètre (Anova, $p < 0,05$). Les * représentent les différences significatives par rapport aux valeurs du lysimètre témoin (Anova, $p < 0,05$).

Dans les terres traitées par persulfate, les activités des hydrolases étaient difficilement quantifiables et presque nulles jusqu'à 120 cm de profondeur. Il semblerait toutefois que l'impact ait été réduit avec la profondeur : les valeurs étaient significativement plus élevées à 120 cm qu'à 70 et qu'à 30 cm de profondeur, bien que toujours très faibles par rapport aux autres lysimètres,

3.1.3.3 Test de germination et croissance sur les terres prélevées à TOx.1

Les tests de germination effectués sur la terre des prélèvement à 7 cm (Figure 55) montrent un retard de germination du raygrass sur les terres traitées par réaction de Fenton par rapport à la terre témoin, et aucune germination sur la terre traitée par persulfate (prélèvements à 7 ou à 12 cm). Pour la terre traitée par Fenton, le retard n'était significatif que pour les cinq premiers jours (Figure 56). Les tests ont été effectués sur les terres issues du prélèvement à 12 cm et n'ont montré aucune différence entre la terre témoin et les terres traitées par réaction de Fenton (*données non présentées*).

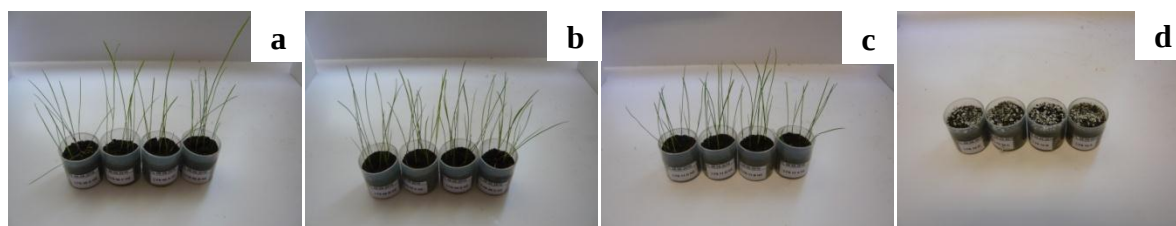


Figure 55 : Croissance du ray-grass (*Lolium perenne*) après 15 jours de culture sur les différentes terres des prélèvements de surface H1 (a : terre témoin, b et c : terre traitée par réaction de Fenton, d : terre traitée par persulfate activé).

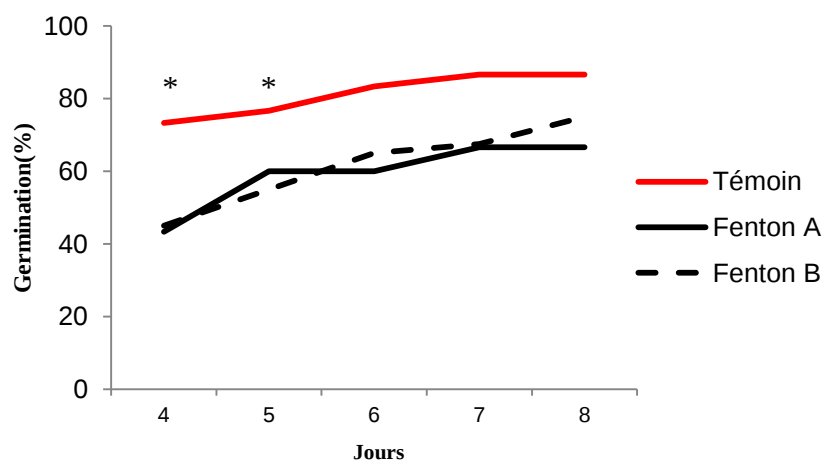


Figure 56 : Taux de germination du ray-grass après 4 j de culture sur les terres de la couche 0-7 cm des lysimètres traités par réaction de Fenton et témoin. Les étoiles représentent les différences significatives par test de Fisher ($<0,05$) entre les terres traitées par réaction de Fenton et la terre témoin pour le 4^{ème} jour (LSD : 16,7%) et le 5^{ème} jour (LSD : 16,4%)

Pour les terres traitées par persulfate, des « cristaux » blancs ont été observés en surface (Figure 57a) pendant l'expérimentation suite aux périodes d'humidification et de dessiccation, et les graines de ray-grass n'ayant pas germé présentaient un aspect brun et « brûlé » (Figure 57b).

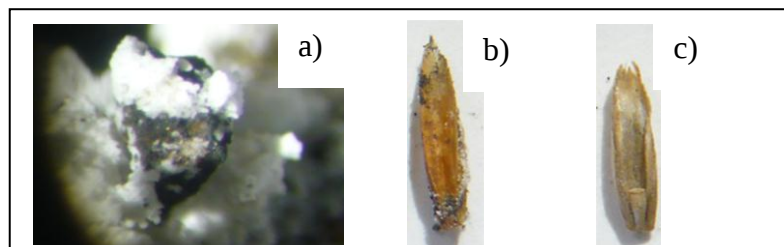


Figure 57 : a : Cristaux de surface de la terre traitée par persulfate (grossissement x 20), b : graine de ray-grass non germée retrouvée dans la terre traitée par persulfate après 15 jours, c : graine de ray-grass originelle

Les tests de croissance sur les terres traitées par réaction de Fenton ont montré des résultats différents.

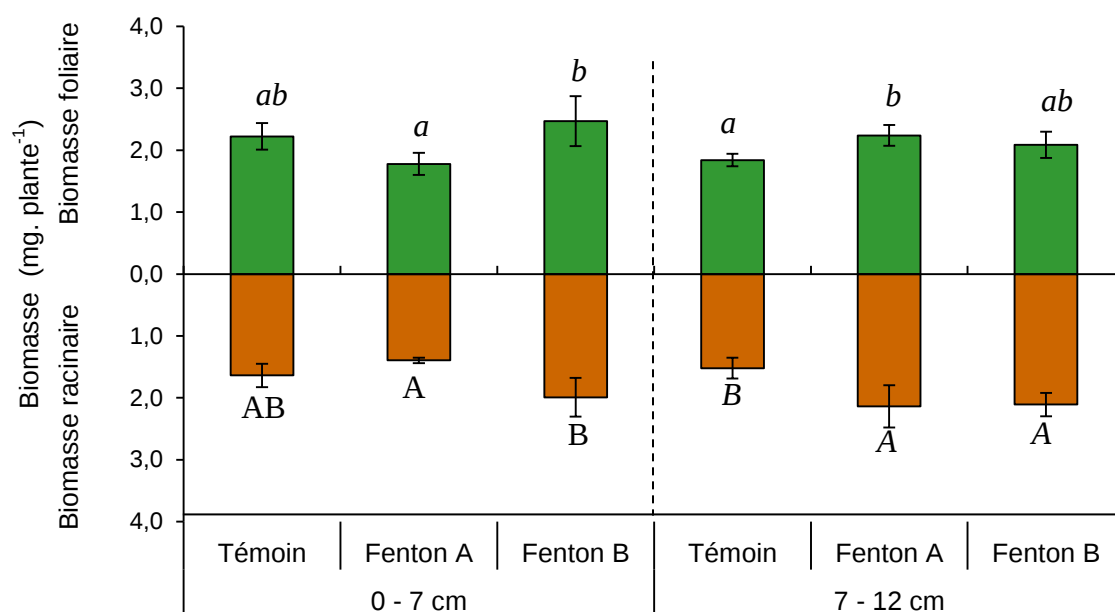


Figure 58 : Biomasses aériennes et racinaires du ray-grass (moyenne et écartype, n=4) après 15 jours de culture sur la terre témoin ou sur les terres traitées par réaction de Fenton pour les prélèvements H1 et H2. Les lettres de chaque catégories indiquent les différences significatives (Anova, p < 0,05)

Il existait des variations entre les biomasses récoltées sur les prélèvements à 7 et 12 cm. Dans le cas des terres prélevées à 7 cm les biomasses aériennes et racinaires sur les terres traitées par Fenton n'étaient pas significativement différentes de celle sur la terre témoin, même si les lysimètres A et B présentaient des résultats différents entre eux. Pour les prélèvements à 12 cm, la biomasse aérienne était plus importante sur les terres traitées par Fenton A, comparée à

la terre témoin, avec une augmentation significative de 18%. Néanmoins, les biomasses racinaires étaient, pour les terres des deux lysimètres Fenton A et B, supérieures à celle mesurée pour le témoin, avec une augmentation de 38%.

3.1.4 Discussion

L'impact de l'oxydation chimique sur les paramètres physico-chimiques et biologiques est représenté par l'ACP (Annexe VI), qui montre un « gradient d'impact » de l'oxydation .

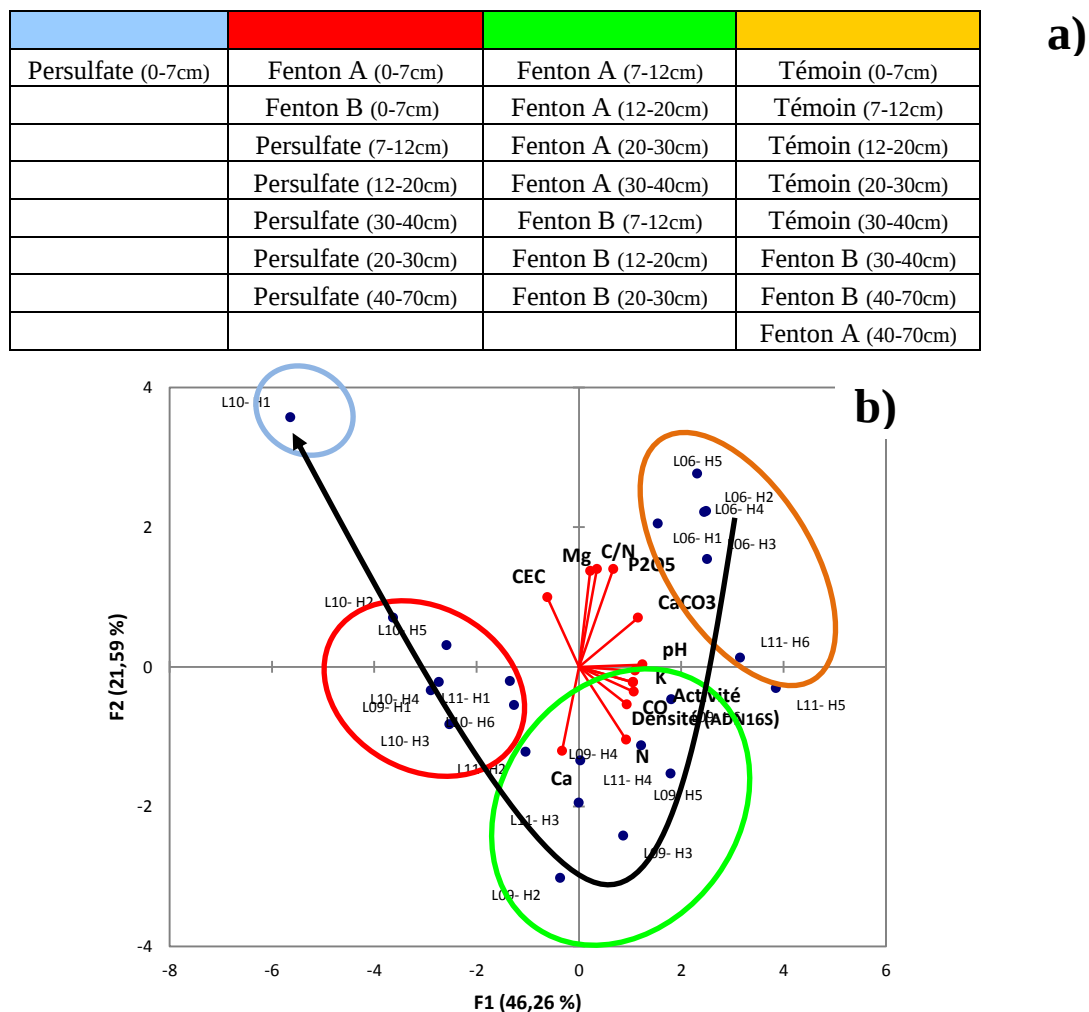


Figure 59 : a) représentation des groupes déterminés par classification k-means. b) projection sur les axes des attributs de l'ACP avec les différentes caractéristiques physico-chimiques et biologiques mesurées sur les prélèvements de terre des lysimètres traités par réaction Fenton ou persulfate activé et du lysimètre témoin. Lysimètre L06 : témoin, L09 et L10 : traités par Fenton, L11 : traité par persulfate. La flèche représente le « gradient de perturbation »

Cette ACP (figure 59) montre un premier axe qui explique 46 % des variations qui correspond au pH, à la teneur en carbonates à l'activité microbienne et la densité bactérienne, et un deuxième axe qui explique 21 % des variations et correspond à la CEC et aux bases

échangeables. Cette ACP a permis de distinguer 4 groupes, i) un groupe détaché, composé des horizons de surface de terres traitées par persulfate (groupe 1) fortement impacté, ii) un groupe composé des prélèvements plus profonds des terres traitées par persulfate et des terres de surfaces traitées par réaction de Fenton (groupe 2), iii) un groupe comprenant les prélèvements les plus profonds des terres traitées par réaction de Fenton (groupe 3), iv) un groupe comprenant les prélèvements des terres témoins et les prélèvements les plus profonds du lysimètre B traité par Fenton (groupe 4).

3.1.4.1 *Impact de l'oxydation in situ sur la dégradation des HAP*

Les rendements de dégradation des HAP dans la terre NM étaient au maximum de l'ordre de 30 % dans les terres de surface (0-7 cm) des lysimètres traités par réaction de Fenton et par persulfate. Ces rendements ont été supérieurs à ceux calculés dans les chapitres 4 et 5. Il avait été constaté que l'apport fractionné et alterné d'oxydant n'avait pas amélioré le rendement de dégradation par rapport à l'apport direct (chapitre 3), que ce soit en colonne ou en malaxeur. L'hypothèse émise était que l'effet tampon induit par la présence de carbonates pouvait être supérieur lors d'un apport fractionné et induisait une perte d'efficacité de la réaction. Dans l'expérimentation *in situ*, avec des apports fractionnés, le pH a diminué plus fortement que dans l'expérimentation des chapitres précédents et la concentration en carbonates a fortement diminué dans les horizons de surfaces. On peut toutefois noter que la dégradation des HAP n'a été observée que dans l'horizon superficiel (0-7 cm) et que le rendement théorique de dégradation visé dans le premier mètre des lysimètres n'a pas été atteint, quel que soit l'oxydant. Les limites de l'oxydation chimique énoncées dans les chapitres précédents semblent ainsi être applicables quelle que soit l'échelle du dispositif étudié.

3.1.4.2 *Impact de l'oxydation in situ sur les caractéristiques physico-chimiques*

L'impact mesuré sur les caractéristiques physico-chimiques de la terre NM traitée *in situ* par oxydation chimique a été très proche de celui observé en colonnes de laboratoire (Chapitre 4). L'acidification des terres a été principalement mesurée en surface et a entraîné une perte en carbonates. La forte teneur initiale en carbonates n'a ainsi pas suffi pour tamponner le milieu, et l'acidification a été mesurée jusqu'à une profondeur de 40 cm après traitement par persulfate. Les pH inférieurs à 4 des terres de surfaces étaient alors susceptibles d'être un obstacle au développement des activités biologiques.

Les teneurs en P_{Olsen} ont diminué après oxydation, de la même manière que pour la terre NM oxydée dans les chapitres 4 et 5. Les diminutions des teneurs en P_{Olsen} dans les terres oxydées par réaction de Fenton et persulfate ont été mesurées jusqu'à 70 cm. L'acidification ainsi que la complexation avec des ions Ca , CO_3 ou Fe seraient des hypothèses expliquant la séquestration du P après oxydation et ont déjà été formulées précédemment.

La texture a évolué uniquement dans la terre de surface traitée par persulfate, entraînant la formation d'argiles granulométriques au détriment des sables. Il est possible que la diminution de la teneur en matières organiques observée en surface après traitement par persulfate ait été un facteur explicatif de ce changement. Les associations organo-minérales permettant la formation d'agrégats de plus grande taille (Abiven et al., 2008) ont ainsi pu être détruites par l'interaction avec les radicaux libres qui détruisent la matière organique (Chapitre 4). Cette hypothèse pourrait être appuyée par les fortes concentrations en C retrouvés dans les eaux de percolations (Cf.6§5.1.3). De plus, il est possible que l'action des ions sodiques ait induit une forte déstructuration de la terre (Calvet, 2003) et entraîné la formation d'argiles.

La teneur en oligo-éléments assimilables a été diminuée dans les terres de surface. Si une diminution des teneurs en K a été observée, il a été difficile d'évaluer si cette diminution pouvait avoir un effet sur la croissance de végétaux. Pour les teneurs en Mg et Ca, le constat a été identique. La terre NM a des teneurs élevées en Cu, Mg, Mn et autres métaux (Zn, Fe), parfois dix fois supérieures à celles que l'on peut observer dans des sols classés dans la catégorie des « sols riches » pour l'élément considéré (Katyal et Randhawa, 1986 ; Outils cartographique de la BDTA ; WikiLCA, 2011). Toutefois les interprétations de ces mesures portent le plus souvent sur des sols agricoles ou forestiers et ne sont pas forcément transposables à des terres industrielles très anthropisées.

3.1.4.3 Impact de l'oxydation sur les fonctions biologiques

Densité et activité bactérienne

Les résultats se rapprochent de ceux observés dans l'expérimentation en colonnes du chapitre 4. Le traitement par réaction de Fenton entraîne une diminution plus faible de la densité bactérienne comparé au persulfate. La persistance de l'oxydant est un des facteurs pouvant expliquer que la densité bactérienne est affectée sur plus de 50 centimètre de profondeur après traitement par persulfate contre seulement 10 centimètre après réaction de Fenton. Le persulfate est beaucoup plus persistant et se trouve lixivié avec la solution comme le montrent les dosages d'oxydant. Son action oxydante a donc eu un effet sur les

microorganismes sur toute la profondeur du lysimètre. De plus, on peut penser que la forte quantité de sodium injectée, et lixiviée à travers la colonne de sol a pu avoir un effet sur les microorganismes et plus particulièrement sur la pression osmotique exercée par la solution du sol fortement chargé en ions. Pour la réaction de Fenton, seule la densité bactérienne de la terre de surface a été affectée. Cependant, il est possible que dans cette expérimentation, l'effet du peroxyde d'hydrogène sur les microorganismes soit sous-évalué. Dans le chapitre 3, nous avons pu démontrer que si la densité bactérienne diminuait après traitement, après un mois cette densité revenait aux mêmes valeurs qu'avant le traitement, voire était supérieure pour certaines communautés. Dans cette expérimentation, pour des raisons techniques, le prélèvement n'a pu être réalisé qu'après 1 mois. Il est possible que pendant ce mois, les bactéries du sol se soient développées et que l'impact mesuré après oxydation soit inférieur à celui qui aurait pu être mesuré directement après traitement. L'effet du fer, ajouté en quantité importante sous forme de sulfate de fer, ne semble pas entraîner de conséquence particulière sur le développement bactérien. Cela pourrait s'expliquer par le statut du fer, qui dans notre cas réside après oxydation essentiellement sous forme Fe^{3+} et que l'assimilation du fer sous cette forme passe par des mécanismes spécifiques (Braun et Killmann, 1999), qui ne sont pas forcément présents chez toutes les espèces.

Au niveau de l'activité enzymatique globale mesurée par les hydrolases, les observations sont différentes. Un mois après le traitement, aucune activité n'est mesurée sur les 70 centimètres des terres traitées par persulfate et sur les terres de surface traitées par réaction de Fenton. L'effet du traitement en surface est donc fort, car même si les densités bactériennes reviennent après un mois, les conditions ne semblent pas optimales pour fournir un milieu biologiquement actif. Au vu de nos résultats et d'une manière générale, le persulfate a un impact plus fort sur l'activité et la densité bactérienne que la réaction de Fenton, contrairement à ce que mettent en avant certaines études (Tsitonaki et al., 2008).

Germination et croissance

La fonction de support de végétation est affectée différemment avec la terre traitée par réaction de Fenton et par persulfate. Après traitement par persulfate, la germination des graines de ray-grass n'est pas observable. L'observation du persulfate condensé en surface pendant le test suggère que son action oxydante, couplée à un pH relativement acide a pu inhiber la germination. Pour les terres de surface traitées par réaction de Fenton, un retard de germination est observé, mais le taux final de germination n'est pas différent de celui observé sur le lysimètre traité à l'eau. Au niveau de la croissance racinaire on observerait même un

effet positif de la réaction de Fenton sur la terre prélevée à 12 centimètres, qui pourrait être expliqué par le fait que le traitement permettrait à cette terre, initialement hydrophobe, une meilleure circulation de l'eau. Cette observation avait été déjà relevée par (Sirguy et al., 2008). Cet effet n'est cependant pas observé sur la terre prélevée à 7 centimètres. Pour la biomasse foliaire, il est difficile de conclure à un effet net du traitement par réaction de Fenton car les résultats obtenus pour les deux terres traitées par Fenton sont différents. Cependant les biomasses récoltées sont assez proches de celles du témoin pour affirmer que le traitement n'a pas un effet négatif sur la croissance des plantes à court terme. D'une manière générale, la baisse de pH et la diminution en P_{Olsen} ne semble pas, dans cette expérimentation, affecter la croissance des plantes à court terme contrairement à ce qui a été observé dans le chapitre 3. Cette différence pourrait être expliquée par le pH de la terre qui dans cette expérimentation atteint une valeur de 5,5 contre 4,8 dans le chapitre 3.

3.2 Impact de la refonctionnalisation

3.2.1 Evolution de la teneur en HAP

Les teneurs en HAP mesurées un an après le traitement (Trefonc.8) en surface dans le lysimètre témoin étaient deux fois plus faibles que celles mesurées un mois après le traitement (TOx.1). Concernant le lysimètre traité par persulfate, l'apport initial de matériaux d'amendement a induit une diminution de la teneur en HAP dans la terre de surface, par un effet de dilution. Cette concentration n'a pas évolué dans la couche de surface (0-7 cm) pendant les huit mois après l'incorporation des amendements. Cependant, sur toute la hauteur, les concentrations en HAP étaient inférieures à celles mesurées un mois après le traitement (TOx). Pour le lysimètre traité par réaction de Fenton « B », les concentrations ont semblé diminuer au cours du temps après l'apport d'amendements et seulement dans les dix premiers centimètres alors que pour le lysimètre traité par réaction de Fenton « A », les résultats sont plus difficiles à interpréter car la teneur en HAP a semblé augmenter après 8 mois entre 40 et 20 cm de profondeur.

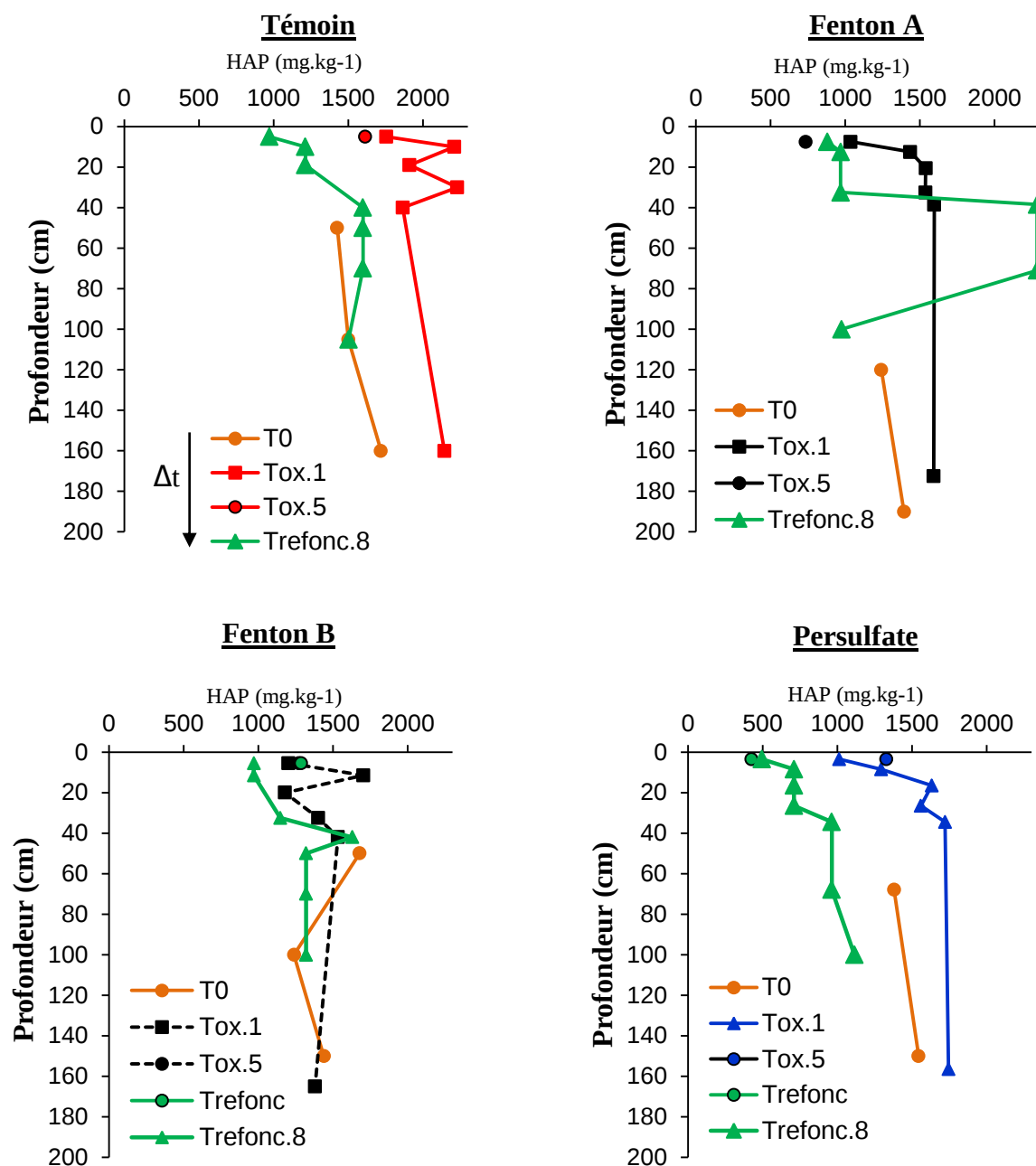


Figure 60 : Evolution des teneurs en HAP dans les lysimètres témoin et Fenton A et les lysimètres Fenton B et persulfate amendés à « Trefonc ».

3.2.2 Effet des amendements sur le pH

Les mesures réalisées sur les terres prélevées huit mois après l'apport d'amendement (T.refonc.8), montrent que pour l'ensemble des échantillons les valeurs du pH se situent aux alentours de 7.

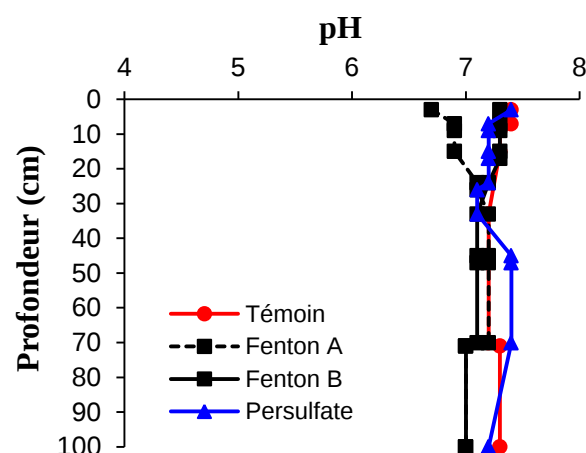
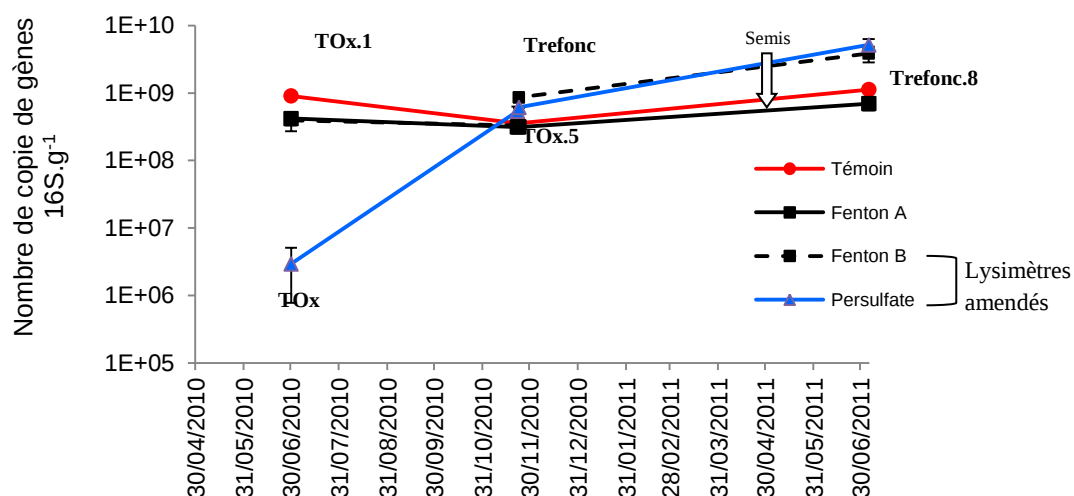


Figure 61 : pH en fonction de la profondeur, dans la terre témoin et les terres traitées par réaction de Fenton ou persulfate, au temps de prélèvement Trefonc.8

3.2.3 Effet des amendements sur la densité bactérienne

Juste après oxydation ($T_{Ox.1}$), le nombre de copies de gène d'ADNr 16S dans la couche de surface (0-7 cm) était significativement plus faible pour la terre traitée par le persulfate que dans les autres lysimètres (figure 23).



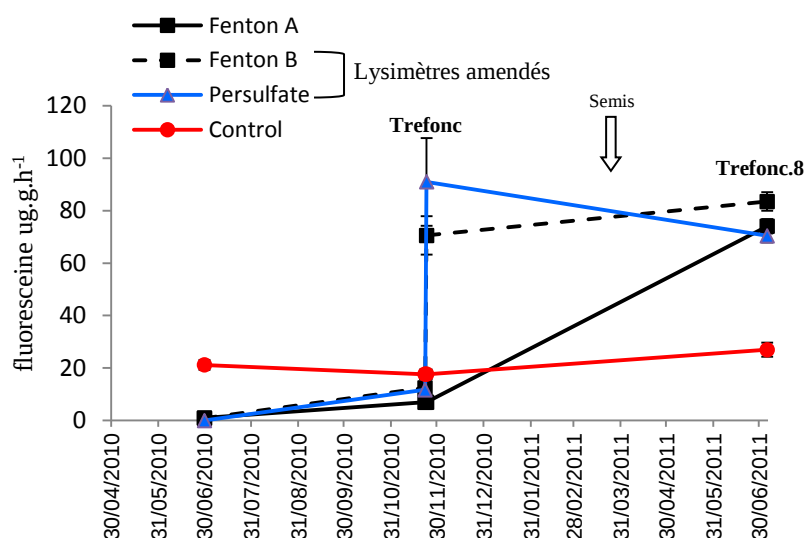
	Témoin	Fenton "A"	Fenton "B"	Persulfate
30/06/2010 1 mois après oxydation	A	A	A	B
23/11/2010 6 mois après oxydation	AB*	A*	A	B*
23/11/2010 Après amendement			A*	A*
05/07/2011 8 mois après amendement	A*	A*	B*	B*

Figure 62 : Nombre de copies de gène d'ADNr 16S dans les terres de surface (0-7 cm) des lysimètres témoins, traités par réaction de Fenton et persulfate au cours des procédés d'oxydation, et de refonctionnalisation (moyenne et erreur standard, $n=3$). Les lettres représentent les résultats des tests statistiques sur les comparaisons entre lysimètres à un temps précis (Anova, $p < 0,05$). Les * présentent les modalités qui ont évolué significativement par rapport au précédent prélèvement. Les cellules grisées représentent les modalités n'étant pas concernées par le test statistique.

Mais au bout de 5 mois ($T_{Ox.5}$), ce nombre avait augmenté et était significativement plus élevé que dans les autres lysimètres. L'apport des matériaux d'amendement a entraîné une hausse significative du nombre de copies de gène 16S (T_{refonc}). Huit mois après l'étape d'amendement ($T_{refonc.8}$), le nombre de copies de gène 16S était significativement plus élevé, d'un facteur 10, dans toutes les terres de surface des lysimètres amendés.

3.2.4 Effet des amendements sur l'activité bactérienne

Comme décrit précédemment (cf.6§3.3.2), les activités des hydrolases dans les terres de surface traitées par réaction de Fenton et persulfate étaient presque nulles, même 1 mois après le traitement ($T_{Ox.1}$). Après 5 mois ($T_{Ox.5}$), les activités mesurées en surface de ces terres oxydées ont augmenté significativement (Figure 63). Les valeurs étaient cependant toujours inférieures à celles qui ont pu être mesurées dans les terres témoins. Après l'ajout de SPP et de CDV (T_{refonc}), les activités des hydrolases ont augmenté significativement et respectivement d'un facteur 6 et 8 dans les terres de surface des lysimètres traités par réaction de Fenton « B » et par persulfate. Huit mois après l'ajout de matériaux d'amendement, les activités des hydrolases n'avaient pas évolué significativement. Pour ce temps de prélèvement ($T_{refonc.8}$), les prélèvements d'échantillons avaient été effectués sur toute la profondeur. Ainsi, pour les terres traitées par persulfate, les activités des hydrolases mesurées en profondeur ont augmenté et après 8 mois de refonctionnalisation étaient proches des valeurs retrouvées en surface à $T_{Ox.5}$ (*données non présentées*). Pour rappel, à $T_{Ox.1}$ aucune activité n'était mesurable dans les terres traitées par persulfate, quelle que soit la profondeur. A $T_{refonc.8}$, les activités mesurées dans les terres de surface du lysimètre traité par réaction de Fenton « A » non amendé avaient augmenté d'un facteur 10 par rapport à celles mesurées à T_{refonc} , et n'étaient pas statistiquement différentes des activités des hydrolases dans le lysimètre traité par persulfate et amendé. Une légère mais significative augmentation des activités des hydrolases a pu être constatée dans les terres du lysimètre témoin.



	Témoin	Fenton "A"	Fenton "B"	Persulfate
30/06/2010 1 mois après oxydation	A	B	B	C
23/11/2010 6 mois après oxydation	A	C *	B *	B *
23/11/2010 Après amendement			A*	A*
05/07/2011 8 mois après amendement	A *	B *	C	B

Figure 63 : Evolution de l'activité des hydrolases dans les terres de surface (0-7 cm) des lysimètres témoins, traités par réaction de Fenton et persulfate au cours des procédés d'oxydation et de refonctionnalisation (moyenne et erreur standard, n=3). Les lettres représentent les résultats des tests statistiques sur les comparaisons entre lysimètres à un temps donné (Anova, $p < 0,05$). Les * représentent les modalités qui ont évolué significativement par rapport au précédent prélèvement. Les cellules grisées représentent les modalités n'étant pas concernées par le test statistique.

3.2.5 Croissance des plantes

La biomasse du ray-grass et du trèfle blanc au cours des 4 premiers mois a été plus élevée dans le lysimètre traité par réaction de Fenton, amendé ou non, que dans le lysimètre témoin. . Cependant, pour les terres traitées par réaction de Fenton, la biomasse aérienne récoltée était 3 fois plus élevée lorsque l'amendement a été appliqué. La biomasse de chaque plante n'a pas été quantifiée, cependant un mois après la coupe, le ray-grass était la plante qui dominait. Pour le lysimètre traité par persulfate, le ray-grass n'a pas poussé. La biomasse du trèfle était très faible après 4 mois mais cette espèce s'est toutefois fortement développée au cours du mois suivant (Figure 64). Dans le lysimètre témoin, la biomasse produite était faible et principalement composée d'espèces autres que le trèfle et le ray-grass.

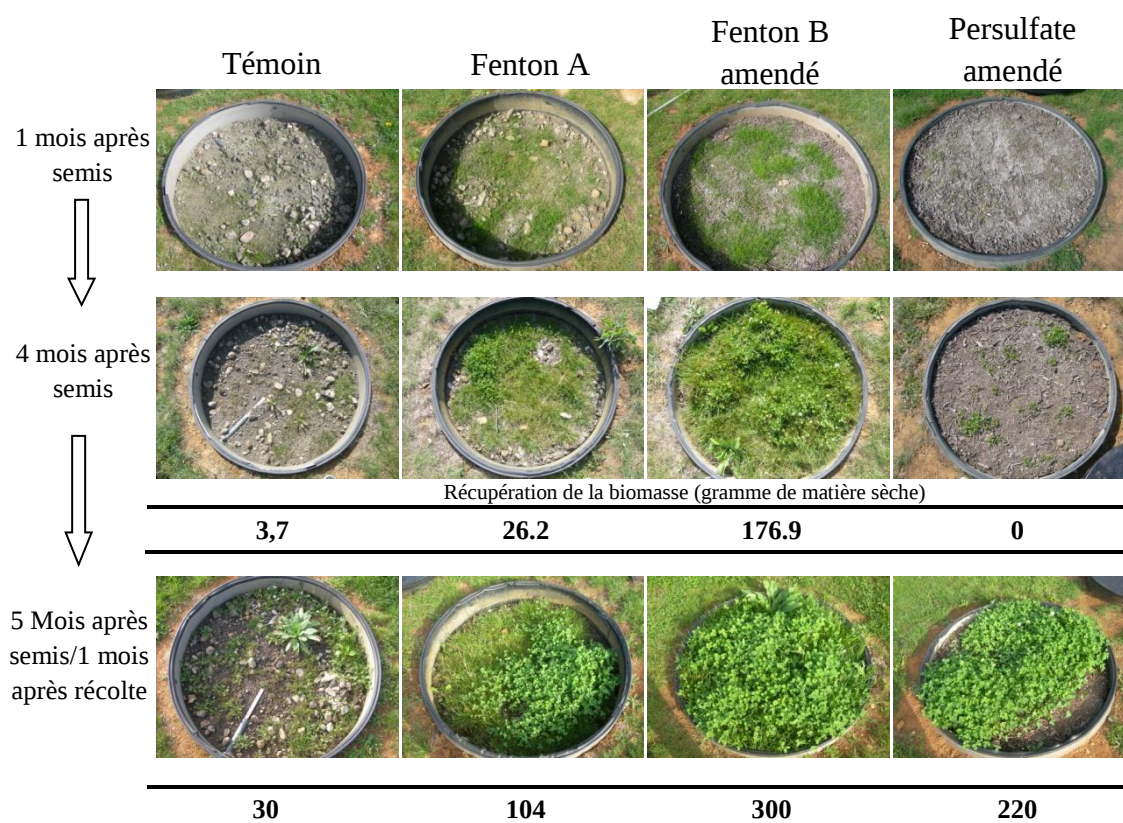


Figure 64 : Photographies de la végétation des lysimètres au cours des 5 mois suivant le semis de ray-grass et de trèfle blanc dans les terres témoins et les terres oxydées par réaction de Fenton et persulfate et amendées

3.2.6 Discussion

3.2.6.1 *Evolution des teneurs en HAP dans les terres*

Les teneurs en HAP dans les terres amendées ont diminué au cours du temps uniquement dans le cas du traitement par persulfate. En effet, si l'apport d'amendements en forte quantité (31 % de SPP) sur l'horizon de surface (0-30 cm) a induit une « dilution » de la pollution, dans les horizons plus profonds (40, 60 et 100 cm), les teneurs en HAP étaient toutes inférieures à 1000 mg.kg^{-1} , ce qui constitue, malgré l'hétérogénéité marquée de la terre NM, une valeur plus faible que les teneurs moyennes mesurées initialement. Ce résultat suggère que l'oxydation des HAP par le persulfate activé s'est poursuivie après un mois (TOx.1), en liaison avec la persistance de l'oxydant. De plus, des mécanismes de biodégradation ont pu être couplés à l'effet de l'oxydant (NaS_2O_8 et H_2O_2), comme cela a été observé avec la réaction de Fenton dans le chapitre précédent. En effet, la densité et l'activité bactérienne, qui ont été fortement affectées par l'oxydation par persulfate activé ont bien augmenté pendant les 6 mois suivant l'oxydation et les 8 mois suivant l'apport des amendements, suggérant une reprise de l'activité microbienne. Cependant, dans le lysimètre traité par Fenton, malgré une

activité microbienne équivalente, il n'y a pas eu de dégradation des HAP après la refonctionnalisation. Enfin, dans le lysimètre témoin, les teneurs en HAP mesurées après un an étaient aussi largement inférieures à celles mesurées à T.Ox1. Cette diminution pourrait aussi être liée à l'atténuation naturelle et à la biodégradation des HAP induits suite à un apport conséquent d'eau et à la présence d'une végétation (Binet et al., 2000 ; Corrigé et al., 2003). Pourtant des travaux antérieurs avaient montré une faible biodégradation des HAP in situ dans la terre NM en raison de leur faible disponibilité (Ouvrard et al., 2011). Ces résultats soulignent le problème de la variabilité et de l'hétérogénéité des teneurs en HAP mesurées in situ qui est une contrainte majeure lors de l'étude des pollutions résiduelles de types HAP sur des terres de friches industrielles.

3.2.6.2 *Evolution des paramètres biologiques*

Concernant les paramètres biologiques, les traitements par oxydation chimique ont eu un effet temporaire. Ainsi, si l'apport d'amendement stimule l'activité biologique, l'installation de la végétation apparaît dans les essais de terrains comme étant un moteur majeur de la dynamique biologique s'installant post traitement. Les mesures d'activité des hydrolases ainsi que la quantification de la densité bactérienne ont été évaluées au cours du temps sur les terres ayant subi une étape de refonctionnalisation et sur les terres non amendées après traitement. Cinq mois après le traitement, les activités dans les terres de surface traitées par Fenton et persulfate, se situent au niveau de l'activité mesurée dans le témoin. Il en est de même pour la densité bactérienne, où après 5 mois, les valeurs mesurées sont revenues au niveau des valeurs mesurées dans la terre témoin. Ce phénomène, décrit dans le chapitre 3 est observé, autant après réaction de Fenton qu'après traitement par persulfate (Tsitonaki et al., 2008). De telles évolutions mettent en avant la faculté du sol à recouvrir une activité biologique même lorsque l'impact a été très fort, comme avec le persulfate.

L'ajout de matériaux d'amendements, possédant une forte activité biologique, permet d'obtenir un mélange présentant une forte activité biologique. Cet apport fertile a permis un meilleur développement de la biomasse dans les terres traitées par réaction de Fenton et persulfate, même si la végétation s'est développée plus rapidement dans les terres traitées par réaction de Fenton. Le ray-grass ne semble pas s'être développé dans la terre traitée par persulfate et semble avoir souffert d'un stress hydrique important au moment de la croissance des plantules. Par ailleurs, au bout de 5 mois, le trèfle s'est développé de manière importante sur ce lysimètre. Concernant l'effet bénéfique des amendements sur la croissance des plantes, observé pour les terres traitées par réaction de Fenton, on peut supposer que la forte capacité de

rétenction en eaux des boues de papeterie (Fierro et al., 1999) associées aux nutriments apportés par le compost peuvent être des facteurs explicatifs. Cette observation est contradictoire de celle du chapitre 5. En effet, dans le chapitre précédent, nous avons observé que l'apport d'amendements à la terre de friches traitée par réaction de Fenton entraînait un effet « néfaste » sur la croissance des plantes. L'hypothèse avait été mise que les conditions hydriques de laboratoire avaient pu entraîner des complications. Dans un système ouvert comme les lysimètres, subissant les variations pluviométriques, la teneur en eau du sol se régule naturellement. L'apport d'amendements sur cette terre traitée n'a donc pas un effet systématique sur la croissance des végétaux, et semble plus particulièrement être bénéfique en conditions naturelles. Cela met en avant la nécessité de procéder à la fois à des essais de laboratoires et de terrains afin d'expliquer au mieux les résultats observés. Par ailleurs, comme dans d'autres études (Gomez et al., 2006), on observe que l'apport d'amendements couplé à l'installation de la végétation permet un développement plus important de la biomasse bactérienne.

Néanmoins, dans la terre traitée par réaction de Fenton et non amendée, l'activité biologique a fortement augmenté pendant l'installation de la végétation et se situait finalement très proche de l'activité mesurée dans les modalités amendées. Finalement, la dynamique biologique a été favorisée par l'implantation de la végétation avec ou sans amendement dans les terres traitées, quel que soit le traitement appliqué, qui est finalement supérieure à celle du témoin où la végétation a eu du mal à s'implanter. Cela peut sembler évident, tant l'installation de la végétation permet de stimuler l'activité biologique du sol (Gobat, 1998). De la même manière, la terre présente un pouvoir tampon fort vis-à-vis des processus d'acidification. En effet, dans la modalité non amendée, le pH des terres de surface a augmenté de plus d'une unité au cours de l'année ayant suivi l'oxydation par réaction de Fenton.

3.3 Suivi des éléments majeurs et traces dans les eaux de percolations

Dans l'expérience en lysimètres, les eaux de percolation ont été récoltées régulièrement et ont fait l'objet d'analyses de cations, d'anions, de COD, de phosphore et d'éléments en traces métalliques. Ces analyses avaient pour objectif de suivre l'évolution de ces concentrations, donc la fonction de filtre des terres, suite à l'oxydation et à la refonctionnalisation. Les prélèvements ont été réalisés de manière ponctuelle et les concentrations ne sont pas reliées au volume total de percolats récoltés pendant les deux points de prélèvements.

3.3.1 Transferts des éléments chimiques majeurs en solution

3.3.1.1 *Suivi de la concentration en cations majeurs*

Le suivi de la concentration en cations majeurs dans les eaux de percolations des différents lysimètres a permis de mettre en évidence l'impact important du persulfate sur la dynamique de ces éléments.

Mg : Les concentrations en Mg^{2+} dans les eaux de percolations du lysimètre traité par persulfate étaient quatre fois supérieures à celles mesurées dans les eaux du témoin. La concentration en Mg^{2+} dans les eaux issues des lysimètres traités par réaction de Fenton a par ailleurs augmenté de 20 à 45% au cours des 6 mois suivant l'oxydation (Figure 65). Les concentrations retrouvées après 1 an étaient identiques à celles du témoin, contrairement aux eaux du lysimètre traité par persulfate où les concentrations restaient 3 fois supérieures après 1 an.

Na, K : Les concentrations en Na^+ et K^+ pour les eaux des lysimètres traités par réaction de Fenton et témoin n'ont pas varié au cours des 12 mois de suivi. Les eaux du lysimètre traité par persulfate, récoltées après oxydation, étaient au minimum 20 fois plus concentrées en Na^+ et K^+ en comparaison à celles du témoin. La concentration maximale en K^+ a été atteinte au bout d'un mois et est redescendue ensuite. Les concentrations en Na^+ ont augmenté après oxydation et ont atteint un maximum six mois après l'oxydation (Figure 65).

Ca : Pendant l'oxydation, les teneurs en Ca retrouvées dans les eaux du lysimètre traité par persulfate étaient 2 fois supérieures à celles des autres lysimètres. Par la suite, les concentrations dans les différents lysimètres se sont avérées identiques.. Si la période d'oxydation a entraîné des perturbations sur la mobilité de certains éléments, aucune variation n'était visible suite à la refunctionalisation des lysimètres traités par réaction de « Fenton B » et persulfate.

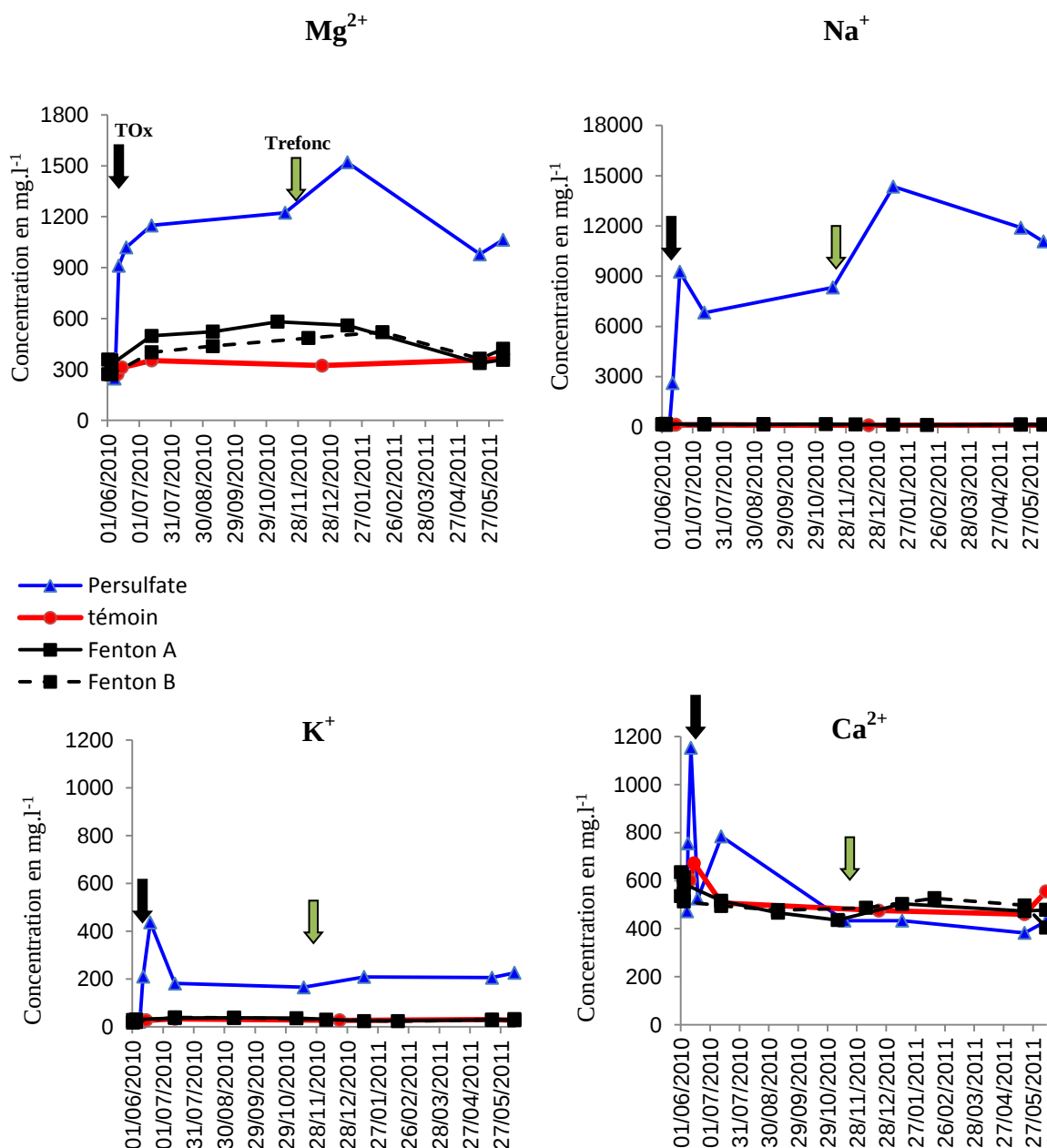


Figure 65 : Suivi des concentrations en cations majeurs, magnésium (Mg^{2+}), sodium (Na^+), potassium (K^+) et calcium (Ca^{2+}) dans les solutions de percolations des lysimètres témoin et traités par réaction de Fenton ou persulfate. Les flèches représentent les périodes d'oxydation et de refonctionnalisation des lysimètres concernés.

3.3.1.2 Suivi de la concentration en ions sulfates et nitrates

Sulfates : Les concentrations ont augmenté immédiatement après l'oxydation par persulfate. Elles sont par ailleurs restées relativement identiques dans les eaux des lysimètres témoin et traités par réaction de Fenton. Les teneurs retrouvées dans les eaux du lysimètre traité par persulfate ont augmenté pendant les 12 mois suivant l'oxydation et ont atteint des valeurs 10 fois supérieures à celles du témoin (Figure 66).

Nitrates : Au cours du temps, la concentration en nitrates dans les eaux de percolation du lysimètre témoin a varié de 200 mg.l⁻¹ à 600 mg.l⁻¹. Les valeurs dosées dans les eaux des lysimètres traités par oxydation chimique se situaient dans cette gamme de valeur, sauf au moment de l'oxydation où les concentrations en nitrates semblaient être plus fortes dans les eaux des lysimètres traités par oxydation.

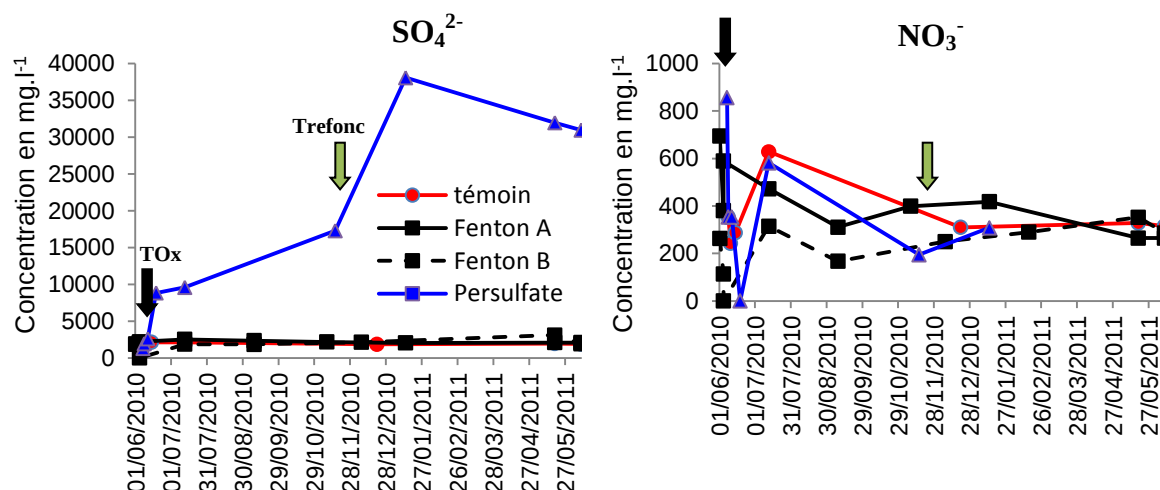


Figure 66 : Suivi des concentrations en sulfate (SO_4^{2-}) et en nitrate (NO_3^-) dans les solutions de percolations des lysimètres témoin et traités par réaction de Fenton ou persulfate. Les flèches représentent les périodes d'oxydation et de refunctionalisation des lysimètres concernés.

3.3.1.3 Mesure du carbone organique dissous (COD)

Les prélèvements d'eau du lysimètre traité par persulfate effectués les jours suivant l'oxydation ont montré une augmentation d'un facteur 3 de la concentration en COD. La teneur en COD a continué d'augmenter au cours de 6 mois suivants pour se stabiliser autour de 1 g.l⁻¹ (Figure 67). Pour les eaux des lysimètres traités par réaction de Fenton ou du lysimètre témoin, aucune variation n'a été observée.

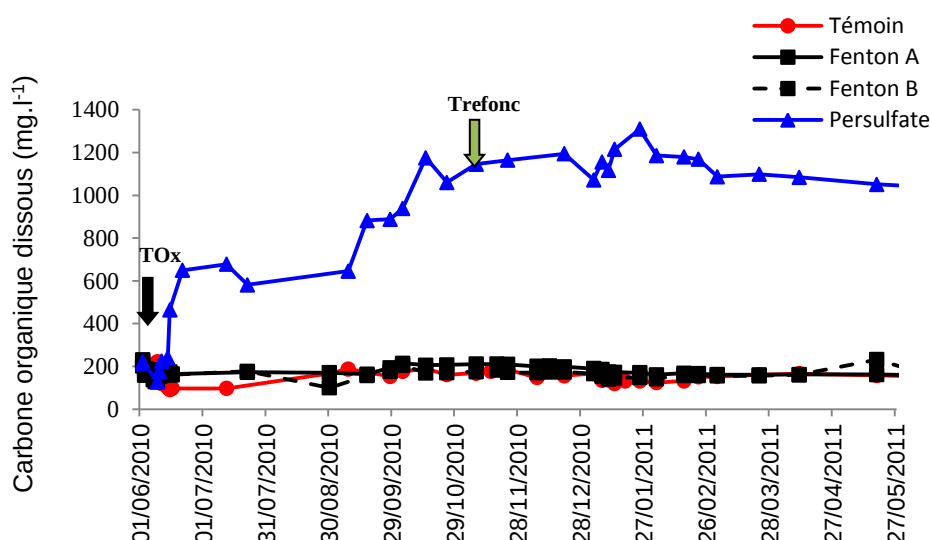


Figure 67 : Teneur en carbone organique dissous dans les eaux de percolations des lysimètres témoins et traités par réaction de Fenton ou persulfate. Les flèches représentent les périodes d'oxydation et de refunctionalisation des lysimètres concernés.

3.3.1.4 Suivi des concentrations en éléments traces métalliques et en phosphore

Cr, As : Aucune différence n'a été observée entre les concentrations en As et en Cr dans les eaux de percolations des lysimètres traités et témoin. Ces concentrations n'ont pas dépassé respectivement les concentrations de 80 et 40 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (données non présentées).

Cd : Les concentrations en Cd dans les eaux de percolations se situaient en dessous des limites de détection ($< 5 \mu\text{g.l}^{-1}$).

Cu, Mn, Ni, P : Les concentrations retrouvées dans les percolats du lysimètre traité par persulfate activé étaient toutes supérieures après oxydation aux concentrations mesurées dans les percolats des lysimètres témoin et traités par réaction de Fenton. Ces teneurs étaient au minimum 40 fois supérieures à celles du témoin. Le traitement par réaction de Fenton n'a pas eu d'effet détectable sur la mobilité de ces éléments dans les eaux de percolation. Pour le Mn, les concentrations ont continué à augmenter un après le traitement, alors que pour les autres éléments une stabilisation, voire une diminution des concentrations a été observée.

Pb : les concentrations en Pb dans les eaux étaient toutes inférieures à 0,04 mg.l^{-1} .

Zn : le traitement par persulfate activé a augmenté le transfert de Zn dans les percolats pendant le premier mois après oxydation (Figure 68). Ensuite, la concentration a diminué tout en restant au minimum 20 fois supérieure aux concentrations des autres lysimètre et ceci 1 an après oxydation. Dans les lysimètres traités par réaction de Fenton et le lysimètre témoin, les concentrations en Zn étaient inférieures à 0,005 mg.l^{-1} .

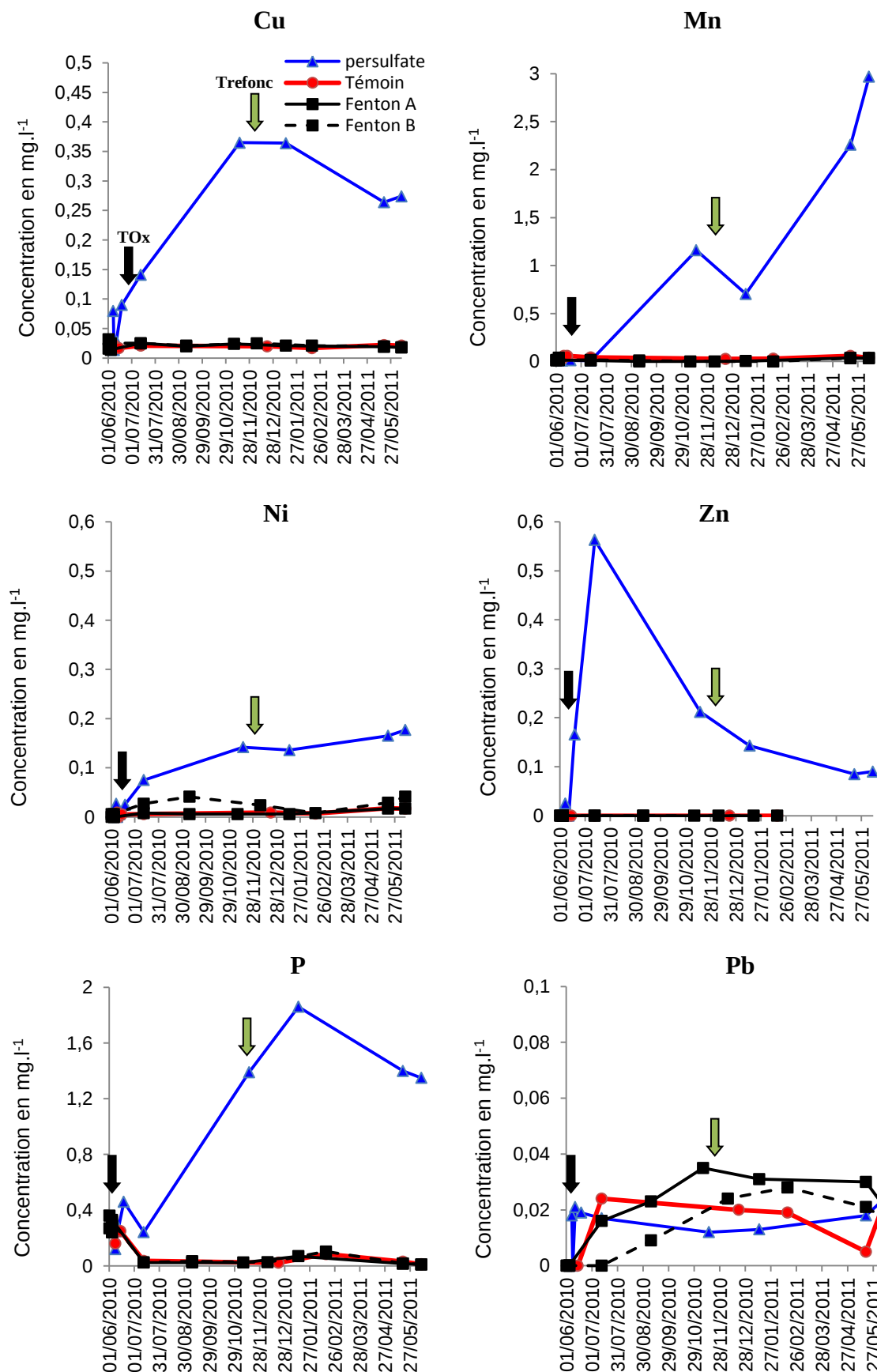


Figure 68 : Suivi des concentrations en cuivre (Cu), manganèse (Mn), nickel (Ni), zinc (Zn), phosphore (P) et plomb (Pb) dans les solutions de percolations des lysimètres témoin et traités par réaction de Fenton ou persulfate. Les flèches représentent les périodes d'oxydation et de refonctionnalisation des lysimètres concernés.

3.3.2 Discussion

Le dosage des éléments en solution a permis de mettre en évidence certains transferts préférentiels suite à l'oxydation chimique des terres. L'utilisation du persulfate de sodium a induit la percolation d'une forte quantité d'ions sodiques à travers la colonne de sol. Selon Calvet (2003), un sol dont la conductivité électrique de l'extrait aqueux est supérieure à 4 dS.m⁻¹, est classé dans les sols dits « salés ». La conductivité mesurée dans les bougies poreuses à 50 cm était supérieure à 10 dS.m⁻¹, un an après le traitement (*données non présentées*), la conductivité augmentant par ailleurs avec la profondeur et le transfert des ions sodiques à travers la colonne de sol. La présence de fortes concentrations en ions sodiques a pu déstructurer les agrégats en participant à la dispersion des colloïdes minéraux. L'effet d'une forte concentration en sels dissouts dans le sol a aussi pu conduire à un déficit de disponibilité d'eau pour les plantes à cause d'une pression osmotique élevée de la solution du sol. Ceci pourrait expliquer que le ray-grass ait eu des difficultés à s'installer sur le lysimètre traité par persulfate activé.

Outre le transfert de Na, le transfert d'éléments majeurs ou en traces dans les eaux de percolations a été uniquement induit par le traitement par persulfate activé. Les teneurs en P soluble dans les eaux de percolations ont aussi considérablement augmenté après traitement. On pourrait alors penser que le persulfate activé a dégradé des molécules contenant du P (ex : hétéroatomes) le mobilisant ainsi. Cette hypothèse pourrait être liée à la diminution du pH, à la teneur en COD qui augmente de la même manière que la teneur en P dissous et à la diminution du P_{Olsen} mesurée au temps T_{Ox.1}. De la même manière, les concentrations élevées en COD mesurées après traitement par persulfate ont mis en avant une altération de la matière organique suite au traitement. Ainsi, l'hypothèse émise plus haut (cf.6§3.4.2) d'une possible déstructuration de certains agrégats organo-minéraux suite au traitement pourrait alors être confirmée.

Parallèlement, les dosages des éléments métalliques totaux dans la terre oxydée (cf.6§3.1.2) ont montré que la réaction de Fenton entraînait des diminutions des teneurs en Cd, Ni et Zn des terres de surfaces et des modifications dans l'adsorption des certains oligo-éléments comme K et Mg. Cependant, ces modifications n'ont pas été traduites par un transfert accru de ces éléments dans les eaux de percolation. On pourrait alors supposer qu'une lixiviation des métaux depuis la surface vers la profondeur ait été possible mais non observable du fait de la forte hétérogénéité constatée dans les différents prélèvements pour ces éléments.

De manière générale, des pertes en éléments, induites en partie par l'acidification ont dû intervenir. Le persulfate a entraîné le transfert d'éléments comme Cu, K, Mg, Mn, Ni et Zn. Les espèces réactives du peroxyde d'hydrogène peuvent réagir avec des composés comme Cu, K, Mg (Huling et Pivetz, 2006). Cependant l'hypothèse que ce soit le contact direct avec le peroxyde d'hydrogène qui ait induit le transfert de ces éléments dans les eaux ne peut être validée. En effet, aucun transfert n'a été observé suite aux traitements par réaction de Fenton. Le transfert de ces éléments pourrait alors être augmenté par l'action oxydative des radicaux sulfate sur les métaux (Tsitonaki et al., 2008). Pour certains éléments comme K, le transfert observé après traitement par persulfate pourrait expliquer les faibles teneurs échangeables dosées dans les terres traitées. L'acidification peut induire des processus de désorption du K présent sur les complexes d'échanges, entraînant ainsi une lixiviation de cet élément (Girard, 2005). Il est cependant difficile d'interpréter ces résultats avec la littérature scientifique car à notre connaissance, aucune étude n'a décrit la dynamique des métaux après un traitement par oxydation chimique, quel que soit l'oxydant utilisé, même si le risque de la mobilisation des métaux de transition est régulièrement évoqué (Huling et Pivetz, 2006 ; Touzé et al., 2005). Ces données sont donc relativement nouvelles et ont montré que lors d'un traitement par persulfate, l'impact sur les métaux ne se limitait pas qu'à la période d'injection. En effet, un an après l'oxydation, les flux en éléments n'avaient toujours pas diminué. Par ailleurs, il a pu être constaté que l'apport d'amendements n'induisait aucune variation sur les concentrations en éléments retrouvés dans les eaux de percolations. Ainsi, soit l'ajout sur les 30 premiers cm a été insuffisant pour influencer la dynamique des métaux présents sur toute la colonne de sol, soit le temps de suivi n'a pas été assez long pour l'observer. Il est possible que la spéciation de certains métaux ait été modifiée et que leurs flux dans les eaux de percolations ne puissent s'arrêter qu'après épuisement de la forme mobile de l'élément. Ceci pourrait entraîner lors de l'utilisation de volume important d'oxydant des pollutions métalliques non négligeables.

4. Conclusion

Les résultats obtenus en lysimètres montrent sur la teneur en polluants :

- L'oxydation des HAP présents dans les terres de friches industrielles atteint environ 30% dans la couche de surface (10 cm) de la terre traitée, quel que soit l'oxydant utilisé, un mois après l'oxydation. Le persulfate semble cependant entraîner une dégradation des HAP à moyen terme (≈ 1 an).

- Parallèlement, le traitement par persulfate activé entraîne une solubilisation des métaux. L'effet est notamment très marqué pour Cu, Mn, Ni et Zn. Aucun transfert préférentiel n'est observé après traitement par réaction de Fenton
- Les concentrations en polluants métalliques dans les eaux de percolation des terres traitées par persulfate activé ne diminuent pas, même après ajout d'amendements,

sur les fonctions biologiques des terres:

- L'impact de l'oxydation sur les fonctions biologiques varie en fonction de l'oxydant. Une diminution plus forte de ces fonctions est observée après traitement par persulfate activé. Cet impact n'est cependant que temporaire, et après 5 mois les valeurs de densité et d'activité bactériennes reviennent au niveau de celles de la terre témoin.
- L'apport d'amendement permet de rétablir rapidement et de stimuler l'activité microbienne. A moyen terme, les activités microbiennes et les densités bactériennes ne sont pas sensiblement différentes de celles mesurées dans la terre NM traité par réaction de Fenton non amendée. L'amendement a cependant eu un effet positif sur la croissance des plantes à moyen terme (≈ 1 an)
- En comparaison avec la terre témoin non traitée, le traitement par réaction de Fenton facilite l'installation de la végétation à moyen terme, malgré l'impact sur certains paramètres physico-chimiques, et permet ainsi d'améliorer les fonctions biologiques de la terre (biomasse, densité bactérienne, activité microbienne)

sur les propriétés physico-chimiques et les transferts dans les eaux de percolations :

- Les effets observés (*e.g.* diminution des concentrations en P_{Olsen} , en carbonates et du pH) varient en fonction de la profondeur du profil. Dans les 10 premiers cm les terres sont fortement altérées, l'effet diminuant avec la profondeur
- Les processus d'acidification sont plus forts avec le traitement par persulfate activé
- Le persulfat activé augmente les concentrations en C_{org} P, Ca, K et Mg dans les eaux de percolations. Aucun effet n'est observé après réaction de Fenton
- Les procédés de refunctionalisation sur un pas de temps inférieur à 1 an n'entraînent pas de modification dans les transferts d'éléments

DISCUSSION GENERALE

1. Introduction

Les techniques de traitement de dépollution des sols par oxydation chimique présentent un intérêt croissant. Cependant, malgré les quelques travaux qui peuvent exister sur l'impact que peuvent avoir ces traitements sur la dynamique des communautés bactériennes, la prise en compte et les connaissances sur le fonctionnement du sol après de tels traitements restent très lacunaires. L'originalité de ce travail consistait à : i) renforcer les connaissances sur l'impact que peuvent avoir des traitements d'oxydation chimique par réaction de Fenton et persulfate activé sur les paramètres physico-chimiques et biologiques, ii) coupler une approche de mesure d'impact et de refonctionnalisation des fonctions du sol.

Les différentes expérimentations réalisées dans ce travail de thèse ont permis de suivre l'évolution de plusieurs paramètres du sol au cours des différentes opérations d'oxydation et de refonctionnalisation. Les paramètres mesurés (C_{org} , N_{tot} , P_{Olsen} , CEC, densité bactérienne, activité microbienne, concentration en HAP, etc...) ne sont pas forcément liés à des fonctions précises du sol, mais ils permettent de définir un état du sol, sur la base de sa capacité à être support de vie et de végétation, et sur sa capacité à épurer la pollution présente. Ainsi, la diminution de la pollution dans un sol constitue un « gain » en termes de « santé du sol ». En revanche, les traitements de dépollution sont susceptibles d'altérer certaines fonctions du sol et de diminuer son état « général ». L'application d'un procédé de remédiation comme l'oxydation chimique constitue ainsi une perturbation anthropique capable d'améliorer l'état du sol mais aussi de le dégrader. Des traitements successifs d'oxydation et de refonctionnalisation sont susceptibles d'entraîner des variations dans le fonctionnement du sol, qui peuvent intervenir à court ou moyen terme (Figure 69). La résultante de ces processus peut être mesurée à l'aide d'indices basés sur les différents paramètres suivis et comparée aux valeurs correspondantes dans le sol pollué, puisque, dans cette étude, le sol équivalent non pollué n'était pas disponible. C'est cette approche qui a été choisie pour analyser et synthétiser les résultats de la thèse.

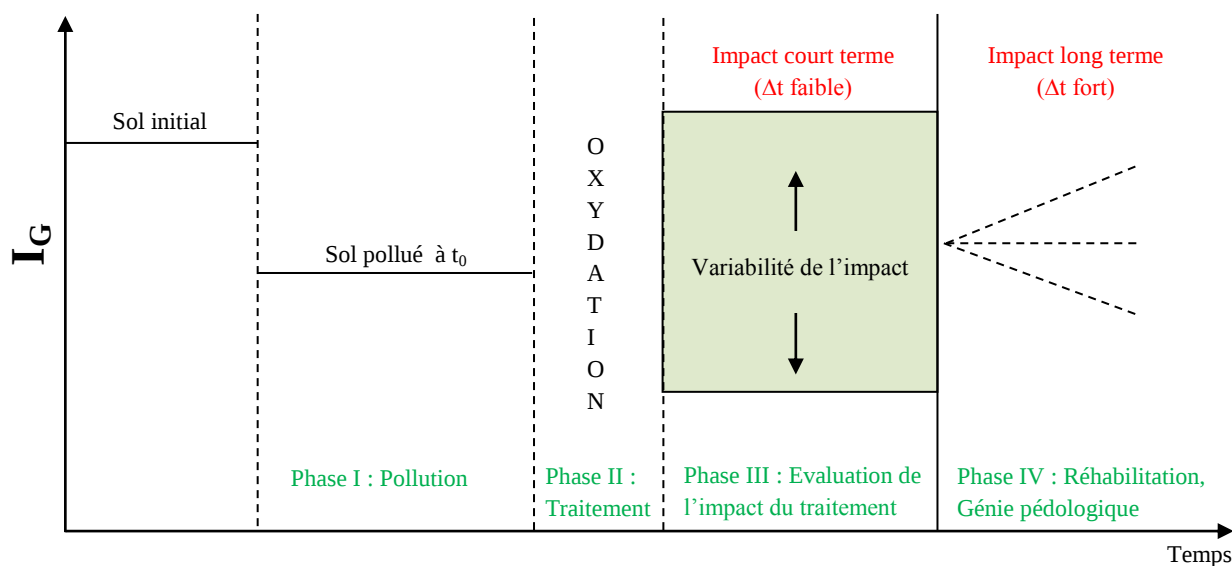


Figure 69 : Indice global de l'état du sol en fonction des différentes activités anthropiques

2. Synthèse des résultats

Différents indices (I_{AB} , I_{PC} , I_{HAP} et I_G) ont été choisis et définis (Cf.2§2.6) en vue de synthétiser les valeurs mesurées pour les différents paramètres, et ceci pour chaque expérience. Les paramètres ont été choisis en fonction de ceux trouvés dans la littérature, et en fonction des évolutions significatives observées lors de l'oxydation et à la refonctionnalisation. Pour construire **l'indice d'activité biologique (I_{AB})**, trois paramètres ont été choisis : la **minéralisation**, couramment utilisée dans les indices de qualité des sols (Masto et al., 2007 ; Trasar-Cepeda et al., 1998) ; la **mesure d'activité enzymatique globale par FDA**, qui peut présenter un intérêt dans l'évaluation de la qualité biologique des sols (Wiehnhold et al., 2009) ; le **nombre de copies de gène codant pour l'ARN 16S**. Concernant les microorganismes, beaucoup d'études utilisent la biomasse microbienne totale (Andrews et al., 2004 ; Masto et al., 2007 ; Wiehnhold et al., 2009). Cependant, dans toutes nos expérimentations, le nombre de copie de gènes codant pour l'ARN 16S a fortement évolué en fonction des traitements et a permis de caractériser l'effet de ces derniers sur les populations bactériennes. C'est pourquoi ce paramètre a été utilisé pour construire l'indice d'activité biologique. Pour construire **l'indice des paramètres physico-chimiques (I_{PC})**, le **pH**, la **CEC**, le **$K_{échangeable}$** , la **teneur en C_{org}** , **P_{Olsen}** et le **rapport C/N** ont été choisis. Les cinq premiers paramètres ont déjà été utilisés dans beaucoup d'études et ont été souvent associés à la fonction de support de végétation (Andrew et al., 2004 ; Glover et al., 2000 ; Kang et al., 2005 ; Lee et al., 2006 ; Masto et al., 2007).

Tableau 28 : Indices représentant l'activité biologique (I_{AB}), les propriétés physico-chimique (I_{PC}), la teneur en polluant (I_{HAP}) et l'indice global (I_G) pour les différentes expérimentations. Dans chaque expérimentation, les indices ont été calculés de manière totalement indépendante pour chaque type de terre Ch (non carbonatée, contamination artificielle), NM (carbonatée, contamination ancienne) ou Ho (carbonatée, contamination ancienne). En gras sont représentés les indices mesurés pour les terres non traitées par oxydation chimique.

	Activité biologique (I _{AB})	Physico- chimiques (I _{PC})	Teneur en polluant (I _{HAP})	Indice global (I _G)	Evolution
Modalités	Expérimentation en colonne (Chapitre 4) : IMPACT DE L'OXYDATION				
Ch Eau	2,05	1,10	0,00	0,98	Diminution de l'IG après oxydation, plus forte après persulfate activé. Impact sur l'IAB, l'IPC et l'IHAP
Ch Fenton	0,73	0,55	0,55	0,48	
Ch Persulfate	0,22	0,94	0,00	0,09	
NM Eau	1,46	1,09	0,00	0,69	Diminution de l'IG après oxydation. Impact majeur sur l'IAB.
NM Fenton	0,82	0,93	0,00	0,33	
NM Persulfate	0,80	1,04	0,00	0,36	
Ho Eau	1,31	0,92	0,00	0,52	Diminution de l'IG après oxydation. Impact majeur sur l'IAB, et plus fort après persulfate
Ho Fenton	1,03	0,82	0,00	0,37	
Ho Persulfate	0,65	0,99	0,00	0,28	
	Expérimentation en cosmes (Chapitre 5) : IMPACT DE L'OXYDATION ET DE LA REFUNCTIONALISATION				
Ch	0,68	0,93	0,00	0,27	Diminution de l'IG après oxydation. Impact sur l'IAB, l'IPC et l'IHAP Augmentation durable de l'IG après amendement
Ch(Ox) T0	0,01	0,47	0,52	0,11	
Ch(Ox) T5	0,06	0,49	0,52	0,13	
Ch(Ox)SPP8 T0	0,98	1,20	0,52	1,00	
Ch(Ox)SPP8 T5	1,19	1,19	0,98	1,62	
Ch(Ox)SPP31 T0	1,97	1,16	0,52	1,69	
Ch(Ox)SPP31 T5	1,44	1,11	0,97	1,76	
NM	0,77	0,96	0,00	0,32	Diminution de l'IG après oxydation. Impact faible sur l'IAB. Augmentation temporaire de l'IG après amendement
NM(Ox) T0	0,65	0,82	0,00	0,23	
NM(Ox) T5	0,57	0,76	0,15	0,27	
NM(Ox)SPP8 T0	1,93	1,41	0,00	1,18	
NM(Ox)SPP8 T5	1,07	1,05	0,15	0,63	
	Expérimentation en lysimètres (Chapitre 6) : IMPACT DE L'OXYDATION				
Témoin (0-7 cm)	1,34	1,27	0,00	0,73	Diminution de l'IG après oxydation, essentiellement observable sur l'horizon 0-7cm. Diminution plus forte après traitement par persulfate sur toute la profondeur
Témoin (7-12 cm)	1,18	1,31	0,00	0,67	
Témoin (40-70 cm)	1,53	1,29	0,00	0,85	
Fenton A (0-7 cm)	0,56	0,71	0,41	0,39	
Fenton A (7-12 cm)	1,30	0,92	0,18	0,70	
Fenton A (40-70 cm)	1,58	1,02	0,12	0,84	
Fenton B (0-7 cm)	0,55	0,74	0,32	0,35	
Fenton B (7-12 cm)	1,39	0,91	0,03	0,58	
Fenton B (40-70 cm)	1,38	1,09	0,33	1,00	
Persulfate (0-7 cm)	0,39	0,91	0,42	0,42	
Persulfate (7-12 cm)	0,39	0,86	0,26	0,29	
Persulfate (40-70 cm)	0,49	0,80	0,07	0,18	

Pour construire cet indice il a été choisi d'intégrer le C/N qui représente le potentiel de minéralisation. En effet, dans les sols fortement pollués aux hydrocarbures, les concentrations en C_{org} peuvent être élevées, sans toutefois représenter une source accessible aux microorganismes. Ainsi, intégrer le rapport C/N permettait de compenser ces fortes teneurs.

Un **indice relatif à la pollution (I_{HAP})** a été ajouté permettant de refléter **la teneur en polluant** ou la capacité du sol à épurer la pollution. Enfin, un indice global a été calculé à partir des trois précédents, d'après Kang et al., (2007) (Cf.2§2.6). Comme décrit dans le chapitre 2, chaque expérimentation ayant été réalisée dans des conditions particulières, les valeurs des indices ne sont à considérer que pour une expérience. Le Tableau 28 présente l'ensemble des indices calculés dans les différentes expérimentations et a servi de base pour la discussion générale. Pour l'expérimentation en lysimètres, les indices n'ont pu être calculés que sur la partie oxydation, en raison de données manquantes pour la partie refonctionnalisation.

Pour IAB : j = minéralisation, activité hydrolases, nombre de copies de gènes ADNr 16S

Pour IPC : j = pH, CEC, $K_{échangeable}$, C_{org} , P_{Olsen} , $1/C/N$

Pour IHAP : j = HAP

2.1 De l'impact de l'oxydation sur les caractéristiques et les fonctions des sols

2.1.1 Limite des réactions d'oxydation chimique sur la dégradation des HAP

Ainsi, parmi les indices estimés dans ce travail, l'indice correspondant à la pollution aux HAP a moins évolué que les autres indices. Il a essentiellement augmenté dans la terre artificiellement contaminée et traitée par oxydation traduisant ainsi une diminution de la teneur en polluant. Les différents résultats acquis au cours des expérimentations en colonnes, vases de végétation ou lysimètres ont été relativement similaires et ont bien traduit la difficulté de dégrader, par oxydation chimique, les HAP présents dans la terre *NM* (faible évolution de I_{HAP}). L'utilisation d'une terre artificiellement contaminée et présentant des caractéristiques physico-chimiques différentes a permis de mettre en évidence que les caractéristiques de la terre et la disponibilité de la pollution jouent un rôle majeur dans l'efficacité des réactions d'oxydation chimique. La présence d'une forte teneur en C_{org} et en carbonates ont été autant de paramètres interagissant avec les oxydants (Lemaire, 2011 ; Usman, 2011) et diminuant l'efficacité de la réaction. La faible disponibilité des HAP dans la

terre *NM* est aussi un élément majeur expliquant les faibles rendements de dégradation de ces polluants (Lemaire, 2011 et Usman, 2011). Il est aussi certain que les protocoles d'injection en conditions insaturées n'ont pas permis un contact optimum entre la pollution et les oxydants. Dans le cas de la réaction de Fenton, l'injection de fer comme catalyseur sous forme de sulfate de fer a pu être moins efficace, en partie dû à une trop rapide oxydation du fer (Usman, 2011).

Dans ce cadre-là, l'injection de minéraux comportant du fer comme l'hématite ou la ferrihydrite pourrait permettre une catalyse plus efficace de la réaction (Usman, 2011). Dans le cas du persulfate, la teneur en HAP a semblé diminuer au cours du temps et donner des résultats encourageants à plus ou moins long terme (> 1 an). Toutefois, ces résultats sur les rendements de dégradation sont difficilement comparables aux résultats acquis dans la littérature car ces derniers sont souvent acquis dans des conditions saturées et donc totalement différentes.

Dans les conditions expérimentales de cette thèse, l'oxydation chimique des terres n'a pas permis une remédiation des HAP supérieure à 50 % dans le sol. Toutefois, il faut souligner que mesurer l'efficacité des procédés d'oxydation chimique est difficile, en raison de la forte hétérogénéité des valeurs obtenues lors du dosage de la pollution dans des matrices très complexes que sont les sols contaminés. Toutefois, les résultats acquis notamment dans l'expérimentation en vases de végétation montrent que l'oxydation a permis d'instaurer des conditions favorables à la dégradation microbienne, facilitant la biodégradation de ces polluants (Kulik et al., 2006 ; Palmroth et al., 2006).

2.1.2 Le pouvoir tampon : une fonction clé des sols face aux traitements par oxydation

Les paramètres biologiques (I_{AB}) et physico-chimiques (I_{PC}) ont été évalués sur des terres aux propriétés physico-chimiques différentes et les résultats ont mis en évidence des impacts variés, dépendants des propriétés des terres. Ces deux indices ont fortement diminué dans la terre où le pouvoir tampon était le plus faible et où le pH a alors fortement diminué.

2.1.2.1 *Impact sur les paramètres physico-chimiques et la croissance des plantes*

L' I_{PC} a plus fortement diminué suite à l'oxydation dans la terre *Ch*, ne présentant pas de carbonates, que dans la terre *NM* (carbonate $> 20 \text{ g.kg}^{-1}$). En effet, si les carbonates sont des

éléments inhibant les réactions d'oxydation chimique par des mécanismes radicalaires, ils sont avant tout garants du pouvoir tampon d'un sol face au phénomène d'acidification. Ces différentes expérimentations ont confirmé le fait que les traitements par oxydation chimique, utilisant la réaction de Fenton et le persulfate activé, pouvaient entraîner d'intenses processus d'acidification (Ferguson et al., 2004 ; Laurent et al., 2012 ; Sirguez et al., 2008). Dans la terre *Ch*, les diminutions des I_{PC} , donc des conditions nécessaires à l'installation de la végétation, sont principalement dues à la diminution du pH, avec dans certains des cas des valeurs inférieures à 3, de la CEC et du P_{Olsen} . Ces fortes diminutions de ces paramètres ont instauré des conditions inhibitrices pour la germination des plantes. Dans la terre *NM*, dans les cas où l'acidification a été plus forte (ex : dans la couche de surface des lysimètres), l'effet sur le pH et la CEC a été plus marqué. Cependant, la présence de carbonates a souvent limité l'acidification de la terre ($pH > 5$). Dans cette terre, la diminution de l' I_{PC} est donc principalement liée aux diminutions systématiques du P_{Olsen} après oxydation. Toutefois, il a été difficile de déterminer si ces diminutions pouvaient expliquer les diminutions de croissance des plantes. En effet, dans certains cas (ex : lysimètres), la croissance des plantes a été plus élevée sur les terres traitées par réaction de Fenton que sur les terres témoins. Les seules modalités de la terre *NM* ayant présenté une inhibition de la germination des plantes ont été les terres traitées par persulfate, présentant un pH plus faible (< 4) et une teneur en oxydant résiduel probablement toxique pour les graines.

Par ailleurs, après traitement des terres *Ch* par réaction de Fenton et persulfate activé, des transferts préférentiels de certains éléments comme le Cu, K, Mn, Mg, Ni, P, Zn ont pu être observés. Les pertes en certains éléments (Mn ou P) ont, par ailleurs, pu atteindre plus de 10 % de la teneur initiale. Pour la terre *NM*, le transfert de ces éléments n'a été observé qu'après traitement par persulfate activé dans l'expérimentation réalisée sur le terrain. De plus, les concentrations pour certains éléments (Mn, Ni, P ou SO_4^{2-}) dépassent les $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$, ce qui pourrait poser des problèmes de pollution, eu égard aux valeurs citées dans l'arrêté du 2 février 1998 relatif aux pollutions des eaux superficielles, dans le cas où les volumes utilisés pour le traitement seraient relativement élevés. Dans une politique de gestion des contaminations résiduelles, l'application de procédés utilisant le persulfate activé nécessiterait de prendre en compte la récupération des effluents potentiellement toxiques. La matière organique est souvent annoncée comme étant un des facteurs limitant la dégradation des polluants par oxydation chimique car elle entre en compétition avec les radicaux libres. Dans les différentes expérimentations réalisées avec une quantité d'oxydant relativement équivalente, il a été difficile de quantifier précisément l'impact des réactions d'oxydation

chimique sur la teneur en matière organique. Dans la terre *NM*, ceci s'explique par la forte hétérogénéité et les fortes teneurs mesurées pour la matière organique. Cependant, la matière organique de cette terre a été oxydée suite au traitement par persulfate activé puisque les concentrations en COD retrouvées dans les eaux de percolation ont augmenté considérablement après l'oxydation. Pour la terre *Ch*, où la matière organique est plus facilement assimilable car naturelle, les traitements des terres en colonnes de laboratoire par réaction de Fenton et persulfate activé ont conduit à la dégradation du C_{org} avec des pertes pouvant aller jusqu'à 30 %. Toutefois, dans l'expérimentation d'oxydation en malaxeur, aucune dégradation significative du C_{org} n'a été observée, suggérant ainsi que le mode d'injection pourrait induire des variations différentes sur les teneurs en C_{org} . Il semblerait que cette dernière remarque puisse aussi concerner les teneurs en P_{Olsen} qui augmentent dans les terres *Ch* traitées en colonnes mais diminuent dans les terres traitées en malaxeur. .

2.1.2.2 *Impact sur les paramètres biologiques*

Comme décrit dans le chapitre 1, les travaux réalisés sur le fonctionnement biologique des terres traitées après oxydation chimique portent essentiellement sur l'étude des microorganismes et leur capacité à dégrader les polluants résiduels. Ce travail a donc permis d'évaluer, sur différentes terres, l'impact des deux oxydants sur les microorganismes et leurs activités. Ainsi, comme le montre l'évolution des I_{AB} (tableau 1), les paramètres biologiques ont été fortement altérés par les traitements par oxydation chimique quelles que soient les terres et les oxydants. Ce sont les valeurs de cet indice qui ont le plus varié dans les expériences. Les traitements par oxydation chimique ont systématiquement entraîné une diminution des communautés bactériennes ou fongiques, que ce soit dans la terre *Ch* artificiellement contaminée ou dans la terre issue de friches industrielles *NM*, ce qui avait déjà été démontré dans d'autres études (Ferguson et al., 2004 ; Palmroth et al., 2006 ; Tsitonaki et al., 2008).

Les I_{AB} mesurés pour les différentes expérimentations montrent clairement que le fonctionnement biologique de la terre *Ch* a été beaucoup plus atteint que celui de la terre *NM*. Il est certain que la diminution du pH de la terre *Ch* traitée par oxydation a entraîné des conditions défavorables pour le développement des plantes et des microorganismes. Dans la terre *Ch* oxydée, l' I_{AB} était très faible comparé à celui de la terre non traitée, alors que dans la terre *NM* la diminution de l' I_{AB} a été beaucoup plus faible. Dans la terre *Ch*, les diminutions des populations microbiennes ont été tellement fortes que celles-ci n'étaient plus

quantifiables. Si les interactions des radicaux libres avec les membranes cellulaires des microorganismes ont été évoquées, ces fortes diminutions semblent être préférentiellement dues à la forte acidification du milieu suite au traitement. De la même manière, les activités enzymatiques globales, spécifiques ont toutes été inhibées suite à l'oxydation.

L'évolution au cours du temps de cet I_{AB} a aussi varié en fonction des terres. La valeur de l' I_{AB} dans la terre Ch oxydée par réaction de Fenton est restée faible au cours du temps. L'impact sur les propriétés physico-chimiques était suffisamment important pour empêcher un retour des populations bactériennes contrairement aux populations fongiques (plus acidophiles) qui se sont rétablies au cours du temps (chapitre 5). Pour la terre NM, si les densités bactériennes ont diminué, avec parfois une diminution d'un facteur 1000, cet effet n'a été que temporaire (chapitre 3). En effet, pour cette terre, les augmentations d'activités enzymatiques spécifiques et des taux de minéralisation mesurées après le traitement par réaction de Fenton ont démontré qu'une forte activité biologique se mettait en place. Trois semaines après l'oxydation, les populations microbiennes, quelles qu'elles soient (fongique, bactérienne cultivable, dégradante ou globale) étaient revenues au niveau des densités mesurées avant traitement (Chapitre 3, Laurent et al., 2012). L'hypothèse avancée serait que les microorganismes détruits par l'oxydation ont constitué une source de carbone et d'azote facilement assimilable pour les microorganismes restant (Palmroth et al., 2006). Dans le chapitre 5, la même dynamique a été observée mais, malgré l'augmentation des populations microbiennes, l' I_{AB} a peu évolué au cours des 5 mois (Tableau 28). Dans cette expérimentation, au moment de la mise en place, une forte activité de minéralisation s'est mise en place malgré la diminution des communautés bactériennes. Après 5 mois, l'activité a diminué alors qu'une augmentation de la densité bactérienne a été observée. L'évolution contraire de ces deux paramètres s'est traduite par un I_{AB} stable au cours du temps. L'oxydation par réaction de Fenton a induit des changements dans la structure des communautés avec une perte de la diversité. Par ailleurs, sous l'effet de la végétation et au cours du temps, ces communautés ont continué d'évoluer en se diversifiant fortement (chapitre 5). Ces résultats peuvent être reliés à ceux des études menées par Cébron et al (2009, 2011) sur des terres traitées par désorption thermique. Ces auteurs ont montré que les communautés bactériennes fortement diminuées par un tel traitement pouvaient se développer et se diversifier relativement rapidement (< 2 ans) sous l'influence de la modification des propriétés physico-chimiques et de l'implantation d'une végétation (Cébron et al., 2009, 2011).

La diminution de l' I_{AB} suite à l'oxydation par la réaction de Fenton, liée à son impact sur les densités et les activités microbiennes, a aussi été observée avec le persulfate activé, avec une plus forte intensité dans les expérimentations en colonnes et en lysimètres (chapitre 4 et 6). Cependant, les données acquises sur les lysimètres ont montré que, bien que l'action du persulfate activé ait été très forte, au bout de huit mois, les valeurs mesurées dans la terre avant traitement pouvaient être atteintes, que ce soit en termes de densité ou d'activité microbienne (chapitre 6). De plus, les dernières données acquises sur la concentration en polluants, semblent indiquer que le traitement par persulfate activé pourrait agir à plus long terme et que des processus de biodégradation puissent se mettre en place après un tel traitement.

2.2 De la nécessité de la refonctionnalisation

La quantité du mélange de boues de papeterie et de compost de déchets, utilisé comme amendement pour la refonctionnalisation, avait été déterminée à l'aide des courbes des pH, pour rétablir un pH proche de la neutralité, particulièrement dans la terre *Ch* où les valeurs étaient très faibles. Ainsi, les expérimentations réalisées en vases de végétation et en lysimètres (chapitre 5 et 6) ont permis de confirmer le pouvoir tampon des boues de papeteries (Pichtel et al., 1994). Une faible quantité (8 %) en boues de papeteries a donc permis d'obtenir une augmentation de 3 unités pH (chapitre 5). L'apport d'amendement dans la terre *Ch* traitée par réaction de Fenton a permis de restaurer des conditions physico-chimiques favorables au développement des plantes et microorganismes, ce qui s'est traduit par une forte augmentation des valeurs de I_{PC} dans les terres amendées. L'apport de boues de papeteries et de compost de déchets verts a aussi augmenté la valeur de l' I_{AB} par l'installation durable d'activités biologiques quelle que soit la quantité de matériaux apportée. En comparant les I_{AB} calculés, on observe que dans la modalité la plus amendée (31 % SPP) cet indice a diminué au cours du temps, mais restait largement plus élevé que celui mesuré pour la terre avant traitement, alors que dans la modalité la moins amendée (8 %) il a continué d'augmenter. Après 5 mois, la croissance des plantes a d'ailleurs été plus élevée dans la modalité avec 8 % et les I_{AB} de ces deux modalités se sont rapprochés. Si on extrapole aux apports pouvant être utilisés sur de grandes surfaces, l'amendement avec 8 % de SPP et 5 % de CDV représenterait un apport en matériaux d'environ 100 t.ha⁻¹. De telles quantités sont proches de ce qui peut être utilisé pour restaurer les anciens sites miniers (Alvarenga et al., 2008 ; Fierro et al., 1999, 2000 ; Shipitalo et al., 2008) ou pour commencer la reconstitution de sol (ADEME, 2005). A moyen terme (5 mois), il semblerait que l'apport à 8 % soit

suffisant pour améliorer le fonctionnement biologique du sol. Par ailleurs, comme démontré par Fierro et al (2000), une partie de la matière organique apportée par les matériaux a été rapidement dégradée. De plus, dans cette terre, la refonctionnalisation a permis la dégradation de la pollution en HAP résiduelle, permettant d'atteindre, en associant l'oxydation et la refonctionnalisation, des rendements de dégradation supérieurs à 95 %, ce qui se traduit par une augmentation forte des valeurs d' I_{HAP} .

Pour la terre *NM*, l'apport de SPP et de CDV a permis l'augmentation du pH dans la couche de surface des lysimètres où une diminution forte du pH avait été observée. Dans les terres oxydées par réaction de Fenton dans l'expérimentation en vases de végétation (chapitre 5), l'apport de matériaux a conduit à une augmentation de l' I_{AB} et de l' I_{PC} , mais la stimulation de l'activité biologique a été de courte durée puisqu'après 5 mois, l' I_{AB} a diminué. Dans l'expérimentation en lysimètres, l'apport de matériaux dans les terres traitées par réaction de Fenton a permis d'augmenter la croissance des plantes, mais l'activité biologique mesurée était relativement proche de celle mesurée dans la terre traitée par réaction de Fenton et non amendée (chapitre 6). Ainsi l'apport de matériaux riches en microorganismes et en matière organique facilement assimilable n'a pas permis de stimuler de manière très forte le fonctionnement biologique de cette terre, ni d'augmenter le taux de biodégradation des HAP comme cela a pu être observé dans l'étude de Gandolfi et al. (2010). Les données acquises sur les activités spécifiques ont montré une forte stimulation des activités biologiques après incorporation des matériaux, comme Sánchez-Monedero et al. (2008) l'ont observé. Cependant, cette stimulation n'a été que temporaire, traduisant essentiellement une assimilation forte des composés assimilables par les communautés microbiennes.

L'apport d'amendement a cependant été nécessaire dans les terres traitées par persulfate (chapitre 6) et a permis de restaurer les conditions nécessaires pour la croissance des plantes. A ce jour, seule la croissance des légumineuses a été observée sur le lysimètre refonctionnalisé suggérant d'éventuelles carences en azote. L'apport de matériaux réalisé en surface n'a pas permis de limiter le transfert préférentiel de certains éléments dans les eaux de percolation, tout du moins sur les huit mois suivant les opérations de refonctionnalisation. Une modalité « éponge » (Séré, 2007), constituée en plus d'une couche de boues de papeteries disposée deux mètres en dessous de l'horizon de surface pourrait être envisagée pour limiter ces transferts, en complexant à ce niveau les différents éléments.

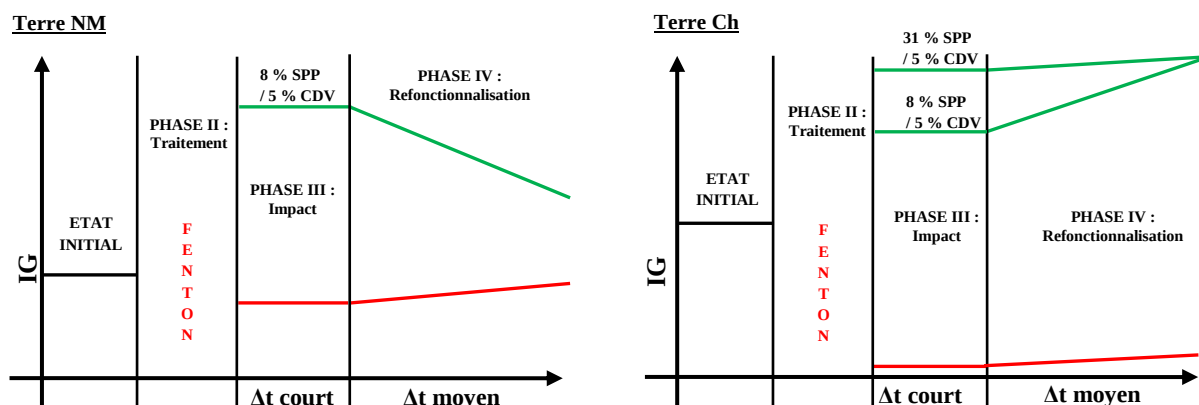


Figure 70 : Représentation schématique de l'évolution des IG des terres NM et Ch après les étapes d'oxydation et de refonctionnalisation

Le calcul de l'indice global I_G , qui résume l'ensemble des données en une seule valeur, montre une diminution de cet indice après oxydation, plus forte avec le persulfate qu'avec la réaction de Fenton, et plus forte avec la terre *Ch* qu'avec la terre *NM*. La refonctionnalisation par les apports de SPP et de compost conduit à une forte augmentation de la valeur de l' I_G , au-delà des valeurs des terres initiales contaminées (Figure 70).

3. Limites et perspectives

3.1 Limites expérimentales et analytiques

3.1.1 Mise en place des expériences

Les dispositifs expérimentaux au laboratoire présentent des biais par rapport aux conditions in situ, qu'il faut prendre en compte. Ainsi, dans l'étude sur la refonctionnalisation réalisée en vases de végétation au laboratoire la difficulté à maintenir une humidité constante dans les pots a pu avoir des conséquences sur la croissance des végétaux. En effet, sous l'effet du tassement la capacité au champ des mélanges a évolué et a pu induire certaines erreurs, principalement dans la modalité *NM*. L'installation de dispositifs avec des sondes (type TDR) permettant une mesure de l'humidité quotidienne, pourrait être envisagée afin d'éviter d'éventuels problèmes d'hydromorphie.

Dans les différentes expériences, les mesures de paramètres physico-chimiques et biologiques ont été réalisées au cours du temps pour les terres oxydées et amendées, mais pas pour les terres initiales contaminées (chapitre 5), qui ont pu aussi évoluer. En absence de terres témoins non contaminées, les caractéristiques des terres après oxydation et

refonctionnalisation ont été comparées à celles des terres contaminées. Pour aborder la qualité des terres traitées, la référence à un sol non contaminé serait pourtant nécessaire.

3.1.2 Problèmes analytiques

Ce travail a été réalisé avec une terre artificiellement contaminée par deux HAP et deux terres de friches industrielles historiquement contaminées par un mélange de HAP. Il faut souligner la difficulté pour obtenir une contamination homogène d'une quantité importante de terre malgré l'utilisation d'un malaxeur (chapitre 5). De vrais problèmes ont été rencontrés lors du dosage des teneurs en HAP dans les terres de friches industrielles. Malgré la mise en place d'un protocole rigoureux, tant en termes d'échantillonnage que de pré-traitements (lyophilisation, broyage, extraction), de fortes hétérogénéités ont été observées. Il reste donc difficile d'évaluer des variations relativement faibles (< 15-20 %), particulièrement lors des analyses effectuées sur des échantillons de terres prélevés sur le terrain.

Sur les mélanges constitués de terre oxydée et de boues de papeteries fraîches, des problèmes ont été observés lors du broyage des échantillons. La mesure des teneurs en C_{org} dans les terres fraîchement amendées a donc été plus difficile et de plus fortes hétérogénéités ont été observées. Les mesures des capacités au champ ont été réalisées sur toutes les modalités de l'expérimentation en vases de végétation (chapitre 5). Cependant les terres oxydées ainsi que les boues de papeteries sèches ont présenté une certaine hydrophobicité limitant la montée de l'eau par capillarité. Une adaptation de la norme était donc nécessaire et donc par manque de temps, ce paramètre n'a pas pu être évalué correctement.

3.2 Perspectives

A l'issue de ce travail et des différents résultats obtenus, différentes perspectives peuvent être dégagées.

Les résultats ont clairement montré que l'impact de l'oxydation et de la refonctionnalisation sur l'ensemble des paramètres mesurés (physico-chimiques, biologiques, polluants, concentrations en éléments dans les eaux de percolations) doit être suivi au cours du temps et devrait l'être aussi sur le long terme. Il serait donc intéressant de continuer l'étude sur les terres mises en place dans les lysimètres, en effectuant un prélèvement après un temps plus long (par exemple après une année supplémentaire). Cela permettrait de confirmer entre autres les données acquises sur l'évolution de la pollution, qui dans le cas du traitement par persulfate activé, semblent montrer une diminution de la concentration en HAP au cours du temps.

Une autre perspective très générale concernerait l'évaluation de l'impact des traitements par oxydation chimique et des procédés de refonctionnalisation sur les paramètres physiques du sol (porosité, stabilité structurale, densité apparente). En effet, dans ce travail l'étude de la physique du sol n'a été appréhendée qu'à travers la mesure des capacités aux champs, dont la mesure a posé des difficultés, et de la porosité. Tout un travail reste à faire sur la stabilité des agrégats, la résistance des sols à l'érosion. Dans l'ensemble de ce travail, seuls les 16 HAP ont fait l'objet d'une analyse. Il serait ainsi intéressant de doser les métabolites issus de la dégradation des HAP, qui sont souvent plus polaires et peuvent ainsi être plus facilement lixiviés et engendrer des toxicités accrues. De plus, les sols de friches industrielles présentent une contamination par des polluants organiques autres que seulement des HAP, qu'il serait intéressant de suivre tout au long de la filière étudiée. Enfin, si les teneurs en ETM ont été suivies dans les terres et dans les eaux de percolations, tout un travail reste à faire sur l'évolution de la spéciation des métaux suite au traitement notamment par persulfate activé, afin de préciser les risques de mobilisation.

De manière plus spécifique, les différentes expérimentations ont mis en avant des résultats intéressants mais qui restent à expliquer. Ainsi, il a été observé que dans la terre *NM*, certaines activités biologiques pouvaient être fortement stimulées après traitement par réaction de Fenton. Il serait intéressant de coupler ces données avec des mesures d'assimilation de substrats, comme les tests Biolog Ecoplates™, renseignant sur la nature des sources de carbones utilisés, afin de préciser les éventuels mécanismes se mettant en place après oxydation.

L'évolution des communautés bactériennes n'a été appréhendée qu'à partir de l'indice de Shannon-Weaver. Cependant, sans détermination des espèces initialement présentes et des espèces recolonisatrices, il a été très difficile de conclure précisément sur la dynamique des communautés bactériennes après oxydation par réaction de Fenton. Il serait donc intéressant de séquencer les espèces majoritaires et les identifier, afin d'évaluer si des espèces spécifiques se sont développées préférentiellement. Par ailleurs, suivre à plus long terme les populations fongiques et bactériennes de la terre *Ch* traitée par réaction de Fenton permettrait éventuellement d'effectuer des comparaisons avec les populations microbiennes et le fonctionnement biologique particulier qui se met en place dans des milieux très acides et oxydés, comme les anciens sites miniers (Moynahan et al., 2002).

L'ensemble des résultats ont été obtenus sur deux types terres *NM* et *Ch*, qui ont des caractéristiques contrastées, mais qui ne sont pas forcément extrapolables à l'ensemble des

terres carbonatées ou non carbonatées. Il serait intéressant de travailler avec une terre présentant des caractéristiques proches de la terre *NM* mais ne possédant pas une teneur en carbonates élevée. Cela permettrait de préciser le rôle du « pouvoir tampon » dans la résistance des terres aux traitements d'oxydation chimique.

La démarche utilisée dans ce travail, avec les indices proposés, pourrait tout à fait être utilisée pour aborder d'autres filières de traitement de sols contaminés ou perturbés, y compris les travaux de construction de sols (Séré, 2008), étudier leur impact sur les caractéristiques et les fonctions du sol et contribuer à définir l'acceptabilité de ces techniques.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail représente à notre connaissance, le premier travail couplant à la fois des procédés d'oxydation chimique, en vue de dépolluer des sols contaminés aux HAP, et des techniques de refonctionnalisation utilisées pour restaurer le fonctionnement du sol.

Les expériences réalisées en laboratoire et en lysimètres ont permis de mettre en évidence un impact des réactions d'oxydation chimique sur les polluants, les paramètres physico-chimiques et biologiques du sol, dépendant à la fois des propriétés des terres et de l'oxydant utilisé.

Il a été démontré que l'efficacité des réactions d'oxydation chimique par réaction de Fenton et persulfate activé sur la dégradation des HAP étaient beaucoup plus faibles lorsque la pollution était peu disponible et que les terres présentaient de fortes teneurs en carbonates et en C_{org} . De manière générale, l'oxydation chimique par la réaction de Fenton et par le persulfate activé a eu un impact plus faible sur les terres carbonatées (*NM* et *Ho*), que ce soit sur les paramètres physico-chimiques ou biologiques. Ce travail a mis en évidence que ces deux réactions entraînaient des processus d'acidification intense dans la terre ne présentant pas de carbonates, comme la terre *Ch*, des diminutions fortes et durables du pH, de la CEC, du PO_{lsen} , des densités et diversités bactériennes et des activités biologiques (enzymatiques ou globale). Dans la terre *NM*, ces diminutions ont été beaucoup plus faibles et temporaires, car une forte activité biologique (augmentation rapide de la minéralisation et des communautés microbiennes) s'est mise en place après traitement par réaction de Fenton. Par ailleurs, ces travaux ont mis en évidence que le traitement par persulfate activé a eu un effet plus fort sur le fonctionnement biologique et sur les paramètres physico-chimiques, et qu'un tel traitement est susceptible d'entraîner la mobilisation de certains éléments majeurs (K, Mg) et traces (Ni, Mn, P, Zn) dans les eaux de percolations.

L'apport de matériaux d'amendement a permis de rétablir durablement des conditions physico-chimiques favorables au développement des plantes et des activités microbiennes dans la terre *Ch*. L'ajout de boues de papeteries et de compost a permis d'augmenter le pH et d'apporter des nutriments facilement assimilables qui ont stimulé durablement l'activité biologique. Le couplage de l'oxydation par réaction de Fenton avec l'ajout de matériaux d'amendements a permis d'atteindre un taux de dégradation des HAP supérieure à 98%. Cependant, il faut souligner que la quantité de matériaux optimale pour atteindre un meilleur fonctionnement biologique n'était pas la quantité la plus élevée testée. Au cours des

expérimentations de refonctionnalisation réalisées avec la terre *NM*, il a pu être observé que cette stimulation du fonctionnement biologique, liée à l'apport de matériaux, n'a été que temporaire. Si des processus de biodégradation se sont mis en place à plus ou moins long terme dans les terres *NM* oxydées, l'apport de matériaux n'a pas permis d'augmenter ces taux de dégradation obtenus.

L'ensemble de ces résultats a permis de préciser la nature des paramètres physico-chimiques et biologiques pouvant être affectés par les réactions de Fenton et persulfate activé. Ils sont également une démonstration que les terres de friches, bien que fortement polluées, présentent un fonctionnement biologique et une capacité de résistance à l'oxydation chimique. Par ailleurs, ils convergent vers la nécessité de prendre en compte les mesures d'impact lors du traitement par oxydation chimique, particulièrement quand les terres traitées présentent un faible pouvoir tampon face aux processus d'acidification. Dans ce cadre-là, l'association des traitements d'oxydation chimique et des techniques de refonctionnalisation pourrait représenter un moyen de réhabilitation efficace. Par ailleurs, l'indice proposé, dont l'objectif était de représenter l'état du sol en fonction du poids accordé aux différents paramètres, a permis d'évaluer les variations induites par les traitements d'oxydation et les procédés de refonctionnalisation.

BIBLIOGRAPHIE

- Abiven S., Menasseri S., Chenu C., 2009. The effects of organic inputs over time on soil aggregate stability - A literature analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 1-12.
- Achten C., Hofmann T., 2009. Native polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in coals - A hardly recognized source of environmental contamination. *Science of The Total Environment*, 407, 2461-2473.
- Adam G., Duncan H., 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 943-951.
- ADEME, 2005. Utilisation des produits organiques en reconstitution de sol : Inventaire des pratiques en France , état de l'art des connaissances liées aux impacts de ces pratiques, Données et références, 124 p.
- ADEME, 2006. Identification et gestion des sites pollués: Guide méthodologique, 150 p.
- Afnor, 2010. Mesure en microplaques de l'activité enzymatique dans des échantillons de sol en utilisant des substrats fluorogènes. XP ISO/TS 22939, 19 p.
- Allan D.L., Killorn R., 1996. Assessing soil nitrogen, phosphorus and potassium for crop and environmental risk. *Soil Science Society of America Special Publication*, 49, 187-201.
- Allard A.S., Remberger M., Neilson A.H., 2000. The negative impact of aging on the loss of PAH components in a creosote-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46, 43-49.
- Alvarenga P., Gonçalves A.P., Fernandes R.M., de Varennes A., Vallini G., Duarte E., Cunha-Queda A.C., 2008. Evaluation of composts and liming materials in the phytostabilization of a mine soil using perennial ryegrass. *Science of the Total Environment*, 406, 43-56.
- Amlinger F., Götz B., Dreher P., Geszti J., Weissteiner C., 2003. Nitrogen in biowaste and yard waste compost: dynamics of mobilisation and availability—a review. *European Journal of Soil Biology*, 39, 107-116.
- Andrews S.S., Karlen D.L., Cambardella C.A., 2004. The soil management assessment framework: A quantitative soil quality evaluation method. *Soil Science Society for America Journal*, 68, 1-107.
- Arrêté du 2 février 1998 relatif aux prélèvements et à la consommation d'eau ainsi qu'aux émissions de toute nature des installations classées pour la protection de l'environnement soumises à autorisation, *JO du 3 Mars 1998*, n° 52.
- Arshad M.A., Lowery B., Grossman B., 1996. Physical tests for monitoring soil quality. *Soil Science Society of America Special Publication*, 49, 123-141.
- Bradshaw A., 2000. The use of natural processes in reclamation-advantages and difficulties. *Landscape and Urban Planning*, 51, 89-100.
- Baize D., Girard M.C., 2008. *Référentiel Pédologique*, INRA, 332 p
- Barnier C., 2009. Evolution des composants organiques d'un sol de cokerie en contexte d'atténuation naturelle. Thèse de doctorat en Sciences agronomiques, Nancy, 215p.
- BASOL, 2011. Pollution des sols, <http://basol.ecologie.gouv.fr>.
- Bastida F., Zsolnay A., Hernández T., García C., 2008. Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma*, 147, 159-171.

- Bernal M.P., Navarro A.F., Sánchez-Monedero M.A, Roig A., Cegarra J., 1998. Influence of sewage sludge compost stability and maturity on carbon and nitrogen mineralization in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 305-313.
- Binet P., Portal J.M., Leyval C., 2000. Dissipation of 3-6-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 2011-2017.
- Blair J.M., Bohlen P.J., Freckman D.W., 1996. Soil invertebrates as indicators of soil quality. *Soil Science Society of America Journal Special Publication*, 49, 273-291.
- Block P. A., Brown R.A., Robinson D., 2004. Novel Activation Technologies for Sodium Persulfate In Situ Chemical Oxidation. In *Proceedings of the Fourth International Conference on the Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds*. Monterey, 1-8.
- Bogan B.W., Trbovic V., 2003. Effect of sequestration on PAH degradability with Fenton's reagent: roles of total organic carbon, humin, and soil porosity. *Journal of Hazardous Materials*, 100, 285-300.
- Boluda R., Quintanilla JF., Bonilla JA, Saez E., Gamon M., 2002. Application of the Microtox® test and pollution indices to the study of water toxicity in the Albufera Natural Park (Valencia, Spain). *Chemosphere*, 46, 355-369.
- Boularbah A., Schwartz C., Bitton G., Morel J.M., 2006. Heavy metal contamination from mining sites in South Morocco: 1. Use of a biotest to assess metal toxicity of tailings and soils. *Chemosphere*, 63, 802-810.
- Braun V., Killmann H., 1999. Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends in Biochemical Sciences*, 24, 104-109.
- Bresson L. M., Koch C., Le Bissonnais Y., Barriuso E., Lecomte V., 2001. Soil surface structure stabilization by municipal waste compost application. *Soil Science Society of America Journal*, 65, 1804-1811.
- Bui C.T., Cotton R.G.H., 2002. Comparative study of permanganate oxidation reactions of nucleotide bases by spectroscopy. *Bioorganic Chemistry*, 30, 133-137.
- Buyuksonmez F., Hess T.F., Crawford R.L., Watts R.J., 1998. Toxic effects of modified Fenton reactions on *Xanthobacter flavus* FB71. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3759-3764.
- Calace N., Campisi T., Iacondini A., Leoni M., Petronio B.M., Pietroletti M., 2005. Metal-contaminated soil remediation by means of paper mill sludges addition: chemical and ecotoxicological evaluation. *Environmental Pollution*, 136, 485-492.
- Calvet R., 2003. Le sol: propriétés et fonctions (Tome 2). *Dunod*, 511p.
- Camiña, F., Trasar-Cepeda C., Gil-Sotres F., Leirós C., 1998. Measurement of dehydrogenase activity in acid soils rich in organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 1005-1011.
- Carter, M.R., 2002. Soil quality for sustainable land management: organic matter and aggregation interactions that maintain soil functions. *Agronomy Journal*, 94, 38-47.
- CCME, 2008. Canadian soil quality guidelines for carcinogenic and other polycyclic aromatic hydrocarbons (Environmental and human health effects). *Canadian Council of Ministers of the Environment*, 218p.
- Cébron A., Norini M.P., Beguiristain T., Leyval C., 2008. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods*, 73, 148-159.
- Cébron A., Beguiristain T., Faure P., Norini M.P., Masfaraud J.F., Leyval C., 2009. Influence of vegetation on the *in situ* bacterial community and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degraders in aged PAH-

- contaminated or thermal-desorption-treated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 6322-6330.
- Cébron A., Cortet J., Criquet S., Biaz A., Calvert V., Caupert C., Pernin P., Leyval C., 2011. Biological functioning of PAH-polluted and thermal desorption-treated soils assessed by fauna and microbial bioindicators. *Research in Microbiology*, 162, 896-907.
- Cerniglia C. E., 1997. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19, 324-333.
- Chambers J.C., Wade G.L., 1992. Evaluating reclamation success using ecological principles: a holistic approach. In *Proceedings of a Symposium : American Society for Surface Mining and Reclamation*, April 23-26, Charleston, West Virginia
- Chen D., Xing B., Xie W., 2007. Sorption of phenanthrene, naphthalene and o-xylene by soil organic matter fractions. *Geoderma*, 139, 329-335.
- Cherif H., Ayari F., Ouzari H., Marzorati M., Brusetti L., Jedidi N., Hassen A., Daffonchio D., 2009. Effects of municipal solid waste compost, farmyard manure and chemical fertilizers on wheat growth, soil composition and soil bacterial characteristics under Tunisian arid climate. *European Journal of Soil Biology*, 45, 138-145.
- Chiou C.T., McGroddy S., Kile D.E., 1998. Partition characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils and sediments. *Environmental Science Technology*, 32, 264-269.
- Colombano C., Saada A., Guerin V., Bataillard P., Bellenfant G., Beranger S., Hube D., Blanc C., Zornig C., Girardeau I., 2010. Quelles techniques pour quels traitements - Analyses coûts-bénéfices. In *Rapport final BRGM/RP-58609-FR*, 1-150.
- Corgié S.C., Joner E.J., Leyval C., 2003. Rhizospheric degradation of phenanthrene is a function of proximity to roots. *Plant and Soil*, 257, 143-150.
- Crecchio C., Curci M., Pizzigallo M.D.R., Ricciuti P., Ruggiero P., 2004. Effects of municipal solid waste compost amendments on soil enzyme activities and bacterial genetic diversity. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 1595-1605.
- Cuypers C., Grotenhuis T., Joziase J., Rulkens W., 2000. Rapid persulfate oxidation predicts PAH bioavailability in soils and sediments. *Environmental Science and Technology*, 34, 2057-2063.
- Czerniawska-Kusza I., Ciesielczuk T., Kusza G., Cichoń A., 2006. Comparison of the Phytotoxkit microbiotest and chemical variables for toxicity evaluation of sediments. *Environmental Toxicology*, 21, 367-372.
- Davet P., 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. *INRA Edition*, 378 p.
- Delhaize E., Ryan P.R., 1995. Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiology*, 107, 315-321.
- Deschamps T., Benzaazoua M., Bussière B., Belem T., Mbonimpa M., 2006. Mécanismes de rétention des métaux lourds en phase solide : cas de la stabilisation des sols contaminés et des déchets industriels. *Vertigo, La revue électronique en sciences de l'environnement*, 7, <http://vertigo.revues.org/2171>.
- Diacono M., Montemurro F., 2010. Long-term effects of organic amendments on soil fertility: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 30, 401-422.
- Diaz E., 2004. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 7, 173-80.

- Dick R.P., Breakwell D.P., Turco R.F., 1996. Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrated microbiological indicators. *Soil Science Society of America Journal Special Publication*, 49, 247-271.
- Douben P.E.T., 2003. PAHs: An ecotoxicological perspective. *Ecological and environmental toxicology series*, Volume 4, 392 p.
- Dubus I., 1997. La rétention du phosphore dans les sols : principe d'étude, modélisation, mécanismes et compartiments du sol impliqués. *ORSTOM Noumea, Document Scientifiques et Techniques*, 3, 1-78.
- EAA, 2002. Down to earth: Soil degradation and sustainable development in Europe - A challenge for the 21st century. *Environmental issue report*, 6, 1-32.
- Environmental Assessment of Soil for Monitoring Project, <http://www.envasso.com/>
- Eom I.C., Rast C., Veber A.M., Vasseur P., 2007. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67, 190-205.
- Felske A., Akkermans A.D.L., De Vos W.M., 1998. Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4581-4587
- Ferguson S. H., Woinarski A.Z., Snape I., Morris C.E., Revill A.T., 2004. A field trial of in situ chemical oxidation to remediate long-term diesel contaminated Antarctic soil. *Cold Regions Science and Technology*, 40, 47-60.
- Ferrarese E., Andreottola G., Oprea I.A., 2008. Remediation of PAH-contaminated sediments by chemical oxidation. *Journal of Hazardous Materials*, 152, 128-139.
- Fierro A., Angers D.A., Beauchamp C.J., 1999. Restoration of ecosystem function in an abandoned sandpit: plant and soil responses to paper de-inking sludge. *Journal of Applied Ecology*, 36, 244-253.
- Fierro A., Angers D.A., Beauchamp C.J., 2000. Decomposition of paper de-inking sludge in a sandpit minesoil during its revegetation. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 143-150.
- Fiorenza S., Ward C.H., 1997. Microbial adaptation to hydrogen peroxide and biodegradation of aromatic hydrocarbons. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18, 140-151.
- Fismes J., Schwartz C., Perrin-Ganier C., Moren J.L., Charissou A.M., Jourdain, 2004. Risk of contamination for edible vegetables growing on soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbon. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 24, 827-836.
- Floch, C., Chevremont A.C., Joanico K., Capowiez Y., Criquet S., 2011. Indicators of pesticide contamination: Soil enzyme compared to functional diversity of bacterial communities via Biolog® Ecoplates. *European Journal of Soil Biology*, 47, 256-263.
- Foley B.J., Cooperband L.R., 2002. Paper mill residuals and compost effects on soil carbon and physical properties. *Journal of Environmental Quality*, 31, 2086-2095.
- Franzlubbers A. J., Haney R. L., 2006. Assessing soil quality in organic agriculture, Critical issue report. USDA Agricultural research service, 17 p.
- Gan S., Lau E.V., Ng H.K., 2009. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials*, 172, 532-549

- Gandolfi I., Sicolo M., Franzetti A., Fontanarosa E., Santagostino A., Bestetti., 2010. Influence of compost amendment on microbial community and ecotoxicity of hydrocarbon-contaminated soils. *Bioresource Technology*, 101, 568-575.
- Gao Y., Ren L., Gong S., Sun B., Zhang Y., 2010. Desorption of phenanthrene and pyrene in soil by root exudates. *Bioresource Technology*, 101, 1159-1165.
- Garcia-Gomez A., Bernal M.P., Roig A., 2003. Carbon mineralisation and plant growth in soil amended with composts samples at different degrees of maturity. *Waste Management and Research*, 21, 161-171.
- Glover J.D., Reganold J.P., Andrews P.K., 2000. Systematic method for rating soil quality of conventional, organic, and integrated apple orchards in Washington State. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 80, 29-45.
- Gianfreda L., Rao M.A., Piotrowska A., Palumbo G., Colombo C., 2005. Soil enzyme activities as affected by anthropological alterations intensive agriculture practice and organic pollution. *Science of the Total Environment*, 341, 265-279.
- Gildon A., Rimmer D.L., 1993. Soil respiration on reclaimed coal-mine spoil. *Biology and Fertility of Soils*, 16, 41-44.
- Girard M., Walter C., Rémy J.C., Berthelin J., Morel J.L., 2005. Sols et Environnement. *Dunod*, 816 p.
- Gobat J.M., Aragno M., Matthey W., 1998. Le Sol vivant. *Presses polytechniques et universitaires romandes*, 519 p
- Gomez E., Ferreras L., Toresani S., 2006. Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application. *Bioresource Technology*, 97, 1484-1489.
- Green S.V., Stott E.D., Diack M., 2006. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity : Optimization for soil samples. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 693-701.
- Gros R., 2002. Fonctionnement et qualité des sols soumis à des perturbations physiques et chimiques d'origine anthropique : réponse du sol, de la flore et de la microflore bactérienne tellurique. Thèse de Doctorat en Biologie des populations et des écosystèmes, Université de Savoie, 252 p.
- Harrington A. C., 1999. Forest planted for ecosystem restoration or conservation. *New Forest*, 17, 175-199.
- Hatzinger P.B., Alexander M., 1995. Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environmental Science and Technology*, 29, 537-545.
- Hill T. C.J., Walsh K.A., Harris J., Moffett B.F., 2003. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 43, 1-11.
- Hrapovic L., Sleep E.B., Major D.J., Hood E.D., 2005. Laboratory study of treatment of trichloroethene by chemical oxidation followed by bioremediation. *Environmental Science and Technology*, 39, 2888-2897.
- Huling S.G., Pivetz B.E., 2006. In-Situ Chemical Oxidation - Engineering Issue. In *EPA/600/R-06/072*, 60 p.
- Illmer P., Marschall K., Schinner F., 1995. Influence of available aluminium on soil micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology*, 21, 393-397.
- INERIS, 2003. Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) - Évaluation de la relation dose-réponse pour des effets cancérogènes : Approche substance par substance (facteurs d'équivalence toxique - FET) et approche par mélanges. *Rapport final*, 64 p.

- INERIS, 2005. Hydrocarbures aromatiques polycycliques : Guide méthodologique. *Rapport d'étude*, n° 66244, 99 p.
- Izawa S., Inoue Y., Kimura A., 1996. Importance of catalase in the adaptative response to hydrogen peroxide : Analysis of acatalasaemic *saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry Journal*, 320, 61-67.
- Johnsen A.R., Wick L.Y., Harms H., 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, 133, 71-84.
- Joner E.J., Johansen A., Loibner A.P., De La Cruz M.A., Szolar O.H.J., Portal J.M., Leyval L., 2001. Rhizosphere effects on microbial community structure and dissipation and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in spiked soil. *Environmental Science and Technology*, 35, 2773-2777.
- Jones K.C., Stratford J.A., Waterhouse K.S., Vogt N.B., 1989. Organic contaminants in Welsh soils: polynuclear aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and technology*, 23, 540-550.
- Jonsson S., Persson Y., Frankki S., Lundstedt S., van Bavel B., Haglund P., Tysklind M., 2006. Comparison of Fenton's reagent and ozone oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aged contaminated soils. *Journal of Soils and Sediments*, 6, 208-214.
- Jonsson S., Persson Y., Frankki S., van Bavel B., Lundstedt S., Haglund P., Tysklind M., 2007. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in contaminated soils by Fenton's reagent: A multivariate evaluation of the importance of soil characteristics and PAH properties. *Journal of Hazardous Materials*, 149, 86-96.
- Juhasz A.L., Naidu R., 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 45, 57-88.
- Kang G.S., Beri V., Sidhu B.S., Rupela O.P., 2005. A new index to assess soil quality and sustainability of wheat-based cropping systems. *Biology and Fertility of Soils*, 41, 389-398.
- Karaca A., Naseby D., Lynch L., 2002. Effect of cadmium contamination with sewage sludge and phosphate fertiliser amendments on soil enzyme activities, microbial structure and available cadmium. *Biology and Fertility of Soils*, 35, 428-434.
- Karlen L.D., Mausbach J.M., Doran W.J., Cline G.R., Harris F.R., Schuman E.G., 1997. Soil quality : A concept, definition, and framework for evaluation. *Soil Science Society of America Journal*, 61, guest éditorial, 10 p.
- Katayama A., Bhula R., Burns G.R., Carazo E., Felsot A., Hamilton D., Harris C., Kim Y.-H., Kleter G., Koerdel W., Linders J., Peijnenburg J.G.M.W., Sabljic A., Stephenson R.G., Racke D.K., Rubin B., Tanaka K., Unsworth J., Wauchope R.D., 2010. Bioavailability of xenobiotics in the soil environment. *Review of Environment Contamination and Toxicology*, 203, 1-86.
- Katyal J.C., Randhawa N.S., 1986. Les Oligots-éléments. Bulletin FAO engrais et nutrition végétale, 88 p.
- Kawahara F.K., Davila B., Al-Abed S.R., Vesper S.J., Ireland J.C., Rock S., 1995. Polynuclear aromatic hydrocarbon (PAH) release from soil during treatment with Fenton's reagent. *Chemosphere*, 31, 4131-4142.
- Kipopoulou A.M., Manoli E., Samara C., 1999. Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in an industrial area. *Environmental Pollution*, 106, 369-380.

- Kulik N., Goi A., Trapido M., Tuhkanen T., 2006. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by combined chemical pre-oxidation and bioremediation in creosote contaminated soil. *Journal of Environmental Management*, 78, 382-391.
- Lal R., Blum W.H., Stewart B.A., 1997. Methods for Assessment of Soil Degradation. *CRC Press*, 558 p.
- Laurent F., Cébron A., Schwartz C., Leyval, C. 2011. Oxidation of a PAH polluted soil using modified Fenton reaction in unsaturated condition affects biological and physico-chemical properties. *Chemosphere*, 86, 659-664.
- Lowery BHickey W.J., Arshad M.A., Lal R., 1996. Soil water parameters and soil quality. *Soil Science Society of America Special Publication*, 49, 143-155.
- Lee L.S., Rao P.S.C., Okuda I., 1992. Equilibrium partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons from coal tar into water. *Environmental Science and Technology*, 28, 2110-2115.
- Lee B.D., Hosomi M., 2001. A hybrid Fenton oxidation-microbial treatment for soil highly contaminated with benz(a)anthracene. *Chemosphere*, 43, 1127-1132.
- Lee C.-H., Wu M.-Y., Asio V.B., Zueng-Sang C., 2006. Using a soil quality index to assess the effects of applying swine manure compost on soil quality under a crop rotation system in Taiwan. *Soil Science*, 171, 210-222.
- Lehmann A., 2006. Technosols and other proposals on urban soils for the WRB (World Reference Base for Soil Resources). *International Agrophysics*, 20, 129-134.
- Leifeld J., Kögel-Knabner I., 2001. Organic carbon and nitrogen in fine soil fractions after treatment with hydrogen peroxide. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 2155-2158.
- Lemaire J., 2011. Traitement par oxydation chimique de sols de friches industrielles contaminés par des hydrocarbures aromatiques polycyclique. Thèse de doctorat en Génie des procédés, Nancy, 243 p.
- Lepš J., Osbornová-Kosinová J., Rejmánek M., 1982. Community stability, complexity and species life history strategies. *Plant Ecology*, 50, 53-63.
- Leyval C., Binet P., 1998. Effect of Polycyclic aromatic hydrocarbon in soil on arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of Environmental Quality*, 27, 402-407.
- Liu D., Maguire R.J., Pacepavicius G.J., Nagy E., 1992. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic nitrogen heterocyclics. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 7, 355-372.
- Loi n° 76-629 du 10 juillet 1976 relative à la protection de la nature, *JORF*.
- Loi n° 95-101 du 2 février 1995 relative au renforcement de la protection de l'environnement, *JORF*.
- Lopes S.I.C., Capela M.I., van Hullebusch E.D., van der Veen A., Lens P.N.L., 2008. Influence of low pH (6, 5 and 4) on nutrient dynamics and characteristics of acidifying sulfate reducing granular sludge. *Process Biochemistry*, 43, 1227-1238.
- Lueders T., Wagner B., Claus P., Friedrich M.W., 2004. Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylotroph community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environmental Microbiology*, 6, 60-72.
- Maddox J., Soileau J., 1991. Effects of phosphate fertilization, lime amendments and inoculation with VA-mycorrhizal fungi on soybeans in an acid soil. *Plant and Soil*, 134, 83-93.

- Manzo S., De Nicola F., De Luca Picione F., Maisto G., Alfani A., 2008. Assessment of the effects of soil PAH accumulation by a battery of ecotoxicological tests. *Chemosphere*, 71, 1937-1944.
- Marschner P., Crowley D., Yang C.H., 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil*, 261, 199-208.
- Marx M.C., Wood M., Jarvis C., 2001. A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 1633-1640.
- Masto R.E., Chhonkar P.K., Singh D., Patra A.K., 2007. Soil quality response to long-term nutrient and crop management on a semi-arid Inceptisol. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 118, 130-142.
- Meckenstock R.U., Mouttaki H., 2011. Anaerobic degradation of non-substituted aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 406-414.
- Menzie A.C, Santodonato J., 1992. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environmental Science Technology*, 26, 1278-1284.
- Mikutta R., Kleber M., Kaiser K., Jahn R., 2005. Review: Organic matter removal from soils using hydrogen peroxide, sodium hypochlorite, and disodium peroxodisulfate. *Soil Science Society of America Journal*, 69, 120-135.
- Miller M.C., Valentine R.L., Roehl M.E., Alvarez P.J.J., 1996. Chemical and microbiological assessment of pendimethalin-contaminated soil after treatment with Fenton's reagent. *Water Research*, 30, 2579-2586.
- Monahan M.J., Teel A.L., Watts R.J., 2005. Displacement of five metals sorbed on kaolinite during treatment with modified Fenton's reagent. *Water Research*, 39, 2955-2963.
- Monsérié M-F., 2009. Processus d'aggrégation dans un technosol: contribution des constituants anthropiques (oxydes de fer, laitiers, HAP, ETM) à la formation des associations organo-minérales. Thèse de doctorat en Sciences agronomiques, Nancy, 185 p.
- Monsérié M-F., Watteau F., Villemain G., Ouvreard S., Morel J.L., 2009. Technosol genesis: identification of organo-mineral associations in a young Technosol derived from coking plant waste materials. *Journal of Soils and Sediments*, 9, 537-546.
- Moorman T.B., 1996. Assessing organic chemical contaminants in soil. *Soil Science Society of America Special Publication*, 49, 311-326.
- Moynahan O.S., Zabinski C.A., Gannon J.E., 2002. Microbial community structure and carbon-utilization diversity in a mine tailings revegetation study. *Restoration Ecology*, 10, 77-87.
- Naeem S., Thompson L.J., Lawler S.P., Lawton J.H., Woodfin R.M., 1994. Declining biodiversity can alter the performance of ecosystems. *Nature*, 368, 734-737.
- Nam K., Rodriguez W., Kukor J.J., 2001. Enhanced degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by biodegradation combined with a modified Fenton reaction. *Chemosphere*, 45, 11-20.
- Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Pietramellara G., Renella G., 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54, 655-670.
- Ncibi M.C., Mahjoub B., Gourdon R., 2007. Effects of aging on the extractability of naphthalene and phenanthrene from Mediterranean soils. *Journal of Hazardous Materials*, 146, 378-384.
- Nemati R.M., Caron J., Gallichand J., 2000. Using paper de-inking sludge to maintain soil structural form : Field measurements. *Soil Science Society of America Journal*, 64, 275-285.

- Norini M-P., 2007. Ecodynamique des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) et des communautés microbiennes dans des sols à pollution mixte (HAP, métaux) avant et après traitement par biopile et par désorption thermique: Influence de la rhizosphère et de la mycorhization, Thèse de doctorat en Géosciences , Nancy, 243 p.
- Outils cartographique de la BDAT. Version 3.2.0.1 du 01/12/2008. <http://bdat.gissol.fr/geosol/main.php>
- Ouvrard S., Lapole D., Morel J.L., 2006. Root exudates impact on phenanthrene availability. *Water, Air and Soil Pollution: Focus*, 6, 343-352.
- Ouvrard S., Barnier C., Bauda P., Beguiristain T., Biache C., Bonnard M., Caupert C., Cébron A., Cortet J., Cotel S., Dazy M., Faure P., Masfaraud J.F., Nahmani J., Palais F., Poupin P., Raoult N., vasseur P., Morel J.L., Leyval C., 2011. *In situ* assessment of phytotechnologies for multicontaminated soil management. *International Journal of Phytoremediation*, 13, 245-263.
- Pageau D., Carré, 2009. La France vue par CORINE Land Cover: Outil européenne de suivi de l'occupation des sols. 1-4. *Observation et statistiques*, 10, 1-4.
- Palmroth M., Langwaldt J., Aunola T., Goi A., Münster U., Puhakka J., Tuhkanen T., 2006a. Effect of modified Fenton's reaction on microbial activity and removal of PAHs in creosote oil contaminated soil. *Biodegradation*, 17, 29-39.
- Palmroth, M., Langwaldt J., Aunola T., Goi A., Puhakka J., Tuhkanen T., 2006b. Treatment of PAH-contaminated soil by combination of Fenton's reaction and biodegradation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, 598-607.
- Pascual J.A., Hernandez T., Garcia C., Ayuso M., 1998. Enzymatic activities in an arid soil amended with urban organic wastes: Laboratory experiment. *Bioresource Technology*, 64, 131-138.
- Passioura J. B., 2002. Soil conditions and plant growth. *Plant, Cell and Environment*, 25, 311-318.
- Parkin T.B., Franco-Vizcaino J.W., 1996. Field and laboratory tests of soil respiration. *Soil Science Society of America Journal Special Publication*, 49, 231-245.
- Pavoni B., Caliceti M., Sperti L., Sfriso A., 2003. Organic micropollutants (PAHs, PCBs, pesticides) in seaweeds of the lagoon of Venice. *Oceanologica Acta*, 26, 585-596.
- Peng R.H, Xiong A.S, Xue Y., Fu X.Y., Gao F., Zhao W., Tian Y.S., Yao Q.H., 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbon. *FEMS Microbiological Review*, 32, 927-955.
- Pey B., 2010. Contribution de la faune du sol au fonctionnement et à l'évolution des Technosols. Thèse de doctorat en Sciences agronomiques, Nancy, 299 p.
- Pichtel J.R., Dick W.A., Sutton P., 1994. Comparison of amendments and management practices for long-term reclamation of abandoned mine lands. *Journal of Environmental Quality*, 23, 766-772.
- Pimm S.L., 1984. The complexity and stability of ecosystems. *Nature*, 307, 321-326.
- Ribeiro P., Albuquerque A., Quinta-Nova L., Cavaleiro V., 2010. Recycling pulp mill sludge to improve soil fertility using GIS tools. *Resources, Conservation and Recycling*, 54, 1303-1311.
- Rice C.W., Moorman T.B., Beare M., 1996. Role of microbial biomass carbon and nitrogen in soil quality. *Soil Science Society of America Special Publication*, 49, 203-215.
- Rivas J.F., 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed on soils: A short review of chemical oxidation based treatments. *Journal of Hazardous Materials*, 138, 234-251.

- Ros M., Hernandez M.T., Garcia C., 2003. Soil microbial activity after restoration of a semiarid soil by organic amendments. *Soil Biology and Biochemistry*, 35,463-469.
- Sadowsky M.J., 1996. DNA fingerprinting and restriction fragment length polymorphism analysis. *Soil Science Society of America Book Series 5, Methods for soil analysis, Part 2 : Microbiological and biochemical properties*, 647-664.
- Sahl J., Munakata-Marr J., 2006. The effects of in situ chemical oxidation on microbiological processes: A review. *Remediation Journal*, 16, 57-70.
- Saison, C., Degrange V., Oliver R., Millard P., Commeaux C., Montange D., Le Roux X., 2006. Alteration and resilience of the soil microbial community following compost amendment: effects of compost level and compost-borne microbial community. *Environmental Microbiology*, 8, 247-257.
- Sánchez-Monedero M., Mondini C., Cayuela M., Roig A., Contin M., De Nobili M., 2008. Fluorescein diacetate hydrolysis, respiration and microbial biomass in freshly amended soils. *Biology and Fertility of Soils*, 44, 885-890.
- Séré G., 2007. Fonctionnement et évolution pédogénétique de Technosols issus d'un procédé de construction de sol. Thèse de doctorat en Sciences agronomiques, Nancy, 226 p.
- Séré G., Schwartz C., Ouvrard S., Sauvage C., Renat J.C., Morel J.L., 2008. Soil construction: A step for ecological reclamation of derelict lands. *Journal of Soils and Sediments*, 8, 130-136.
- Seybold C.A., Herrick E.J., Brejda J.J., 1999. Soil resilience : A fundamental component of soil quality. *Soil Science*, 164, 224-234.
- Shipitalo M.J., Bonta J.V., 2008. Impact of using paper mill sludge for surface-mine reclamation on runoff water quality and plant growth. *Journal of Environmental Quality*, 37, 2351-2359.
- Sies, H., 1993. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, 215, 213-219. *European Journal of Biochemistry*, 215, 213-219.
- Sikora L.J., Stott D.E., 1996. Soil organic carbon and nitrogen. *Soil Science Society of America Special Publication*, 49, 157-167.
- Sinsabaugh R. L., Gallo M.E., Lauber C., Waldrop M.P., Zak D.R., 2005. Extracellular enzyme activities and soil organic matter dynamics for northern hardwood forests receiving simulated nitrogen deposition. *Biogeochemistry*. 75, 201-215.
- Sirguey C., De Souza e Silva P.T., Schwartz C., Simonnot M.O., 2008. Impact of chemical oxidation on soil quality. *Chemosphere*, 72, 282-289.
- Slater T.F., 1984. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochemistry Journal*, 222, 1-15.
- Smith M.J., Flowers T.H., Duncan J., Alder J., 2006. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues. *Environmental Pollution*, 141, 519-525.
- Sourková M., Frouz J., Fettweis U., Bens O., Hüttl R.F., Santrucková H., 2005. Soil development and properties of microbial biomass succession in reclaimed post mining sites near Sokolov (Czech Republic) and near Cottbus (Germany). *Geoderma*, 129, 73-80.
- Summer M.E., Miller W.P., 1996. Cation exchange capacity and exchange coefficients. *Science Society of America Book Series 5: Methods of Soil Analysis, Part 3: Chemical methods*, 1201-1229.
- Tabatabai M.A., 2003. Soil Enzymes. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, 211 p.

- Tejada M., Hernandez M.T., Garcia C., 2009. Soil restoration using composted plant residues: Effects on soil properties. *Soil and Tillage Research*, 102, 109-117.
- Trasar-Cepeda C., Leiros C., Gil-Sotres F., Seoane S., 1998. Towards a biochemical quality index for soils : An expression relating several biological and biochemical properties. *Biology and Fertility of Soils*, 26, 100-106.
- Touzé S., Igniatidis I., Saada A., Gaboriau H., 2005. Etat de l'art de la technologie de l'oxydation *in situ*. In *Rapport final BRGM/RP-54096-FR*, 60 p.
- Tran L.-H., Drogui P., Mercier G., Blais J.-F., 2010. Comparison between Fenton oxidation process and electrochemical oxidation for PAH removal from an amphoteric surfactant solution. *Journal of Applied Electrochemistry*, 40, 1493-1510.
- Tsitonaki A., Benjamin P., Crimi M., Mosbaek H., Siegrist R.L., Bjerg P.L., 2010. In situ chemical oxidation of contaminated soil and groundwater using persulfate: a review. *Critical Review in Science and Technology*, 40, 55-91.
- Tsitonaki A., Smets B.F., Bjerg P.L., 2008. Effects of heat-activated persulfate oxidation on soil microorganisms. *Water Research*, 42, 1013-1022.
- TVD, 2003. Dossier de demande d'autorisation d'extension du plan d'épangage de sous-produits papetiers. *Volet général, additif n°3*, 22 p.
- Usman M., 2011. Formation of mixed $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{III}}$ oxide and their reactivity to catalyze chemical oxidation: Remediation of hydrocarbon contaminated soil. Thèse de Doctorat en Géosciences,
- Valderrama C., Alessandri R., Aunola T., Cortina J.L., Gamisans X., Tuhkanen T., 2009. Oxidation by Fenton's reagent combined with biological treatment applied to a creosote-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 166, 594-602.
- Vessigaud S., 2007. Re-mobilisation des hydrocarbures aromatiques polycycliques de terres industrielles de cokerie et mécanismes impliqués dans le « vieillissement » du fluoranthène. Thèse de doctorat en Sciences agronomiques, Nancy, 263p.
- Vetterlein D., Hüttel R., 1999. Can applied organic matter fulfil similar functions as soil organic matter? Risk-benefit analysis for organic matter application as a potential strategy for rehabilitation of disturbed ecosystems. *Plant and Soil*, 213, 1-10.
- Villa R.D., Trovó A.G., Nogueira R.F.P., 2008. Environmental implications of soil remediation using the Fenton process. *Chemosphere*, 71, 43-50.
- Weissenfels W.D., Klewer H.J., Langhoff J., 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, 689-696.
- Westerhoff P., Aiken G., Amy G., Debroux J., 1999. Relationships between the structure of natural organic matter and its reactivity towards molecular ozone and hydroxyl radicals. *Water Research*, 33, 2265-2276.
- Wienhold B.J., Karlen D.L., Andrews S.S., Stott D.E., 2009. Protocol for indicator scoring in the soil management assessment framework (SMAF). *Renewable Agriculture and Food Systems*, 24, 260-266.
- WikiLCA, 2011. Les Oligots-éléments, <http://wiki.laboratoirelca.com>.

- Wilcke W., 2000. Synopsis: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Soil - a Review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163, 229-248.
- Yap C.L., Gan S., Ng H.K., 2011. Fenton based remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons-contaminated soils. *Chemosphere*, 83, 1414-1430.
- Yasuo H., Akio I., 1977. The oxidation products formed from soil organic matter by hydrogen peroxide treatment. *Soil Science and Plant nutrition*, 23, 513-521.
- Yeh C.K-J., Wu H-M., Chen T.C., 2003. Chemical oxidation of chlorinated non-aqueous phase liquid by hydrogen peroxide in natural sand systems. *Journal of Hazardous Materials*, 96, 29-51.

ANNEXES

ANNEXE I

Analyse du C_{tot} et C_{org} dans l'expérimentation du chapitre 4

C_{tot} : pour cette mesure, 10 g de sol préalablement séchés à l'air ont été broyés. De 8 à 10 mg de terre *Ho*, *NM* ou *Ch* ont alors été pesés dans des capsules en argent. Le C_{tot} a été mesuré par un analyseur élémentaire vario MICRO cube Elementar.

C_{org} : pour cette mesure, 10 g de sol préalablement séchés à l'air ont été broyés. De 8 à 10 mg de terre *Ho*, *NM* ou *Ch* ont alors été pesés dans des capsules en argent. Les sols ont été décarbonatés à l'aide d'acide chlorhydrique ($0,62 \text{ mol.L}^{-1}$). Pour améliorer la décarbonatation en capsules, un planning d'alternance d'application d'acide a été établi (Tableau ci-après). Le carbone organique a ensuite été mesuré par un analyseur élémentaire vario MICRO cube Elementar.

Alternance des pulvérisations d'acide chlorhydrique et des phases de séchages, pour la décarbonatation des sols

Temps de séchage minimum (h) à 60°C	3	1	1	1	1	1	3	3	3	3
Volume µl pour Ho	60	20	20	20	20	10	60	100	80	80
Volume µl pour NM	60	20	20	20	20	40				
Volume µl pour Ch	60	20								

Note : La phase de décarbonatation a été relativement délicate, car malgré les calculs, et la quantité d'acide chlorhydrique rajoutée en excès pour dégrader tout les carbonates du sol, les résultats montrent une grande variabilité pour H_O . Il est probable que la décarbonatation en capsule ait des limites pour les sols fortement carbonatés.

ANNEXE II

Protocole de la fluorescéine diacetate adapté de (Adam et Duncan., 2001) :

Rappel :

La conservation des échantillons de sol devant servir aux analyses enzymatiques doit toujours se faire à 4°C et ne doit pas dépasser 2 semaines.

Pesées :

Prise d'essai optimisée à 1g de sol pour la fluorescéine diacetate. On fait 2 pesées par échantillon de sol : le 1^{er} sert témoin enzyme (TE) et l'autre constitue l'essai (E). Prévoir un tube sans sol pour le témoin substrat (TS).

Tampons et pH :

On utilise le tampon potassium phosphate au pH 7.6.

Solution stock de K₂HPO₄ et de KH₂PO₄ à 60 mM. Dissoudre 8.7 g de K₂HPO₄ et 1.3 g de KH₂PO₄ dans 800 mL d'eau déminéralisée. Ajuster le pH à 7.6 avec du NaOH. Compléter à 1 L et garder 4°C.

Substrat :

La fluorescéine diacétate ou FDA. Préparer une solution à 1mg.ml⁻¹ dans de l'acétone et conserver à -20°C.

Réactifs pour stopper la réaction:

On utilise de l'acétone à 100%.

Préparation et incubation :

TS : 15 mL de tampon + 200 µL de FDA.

TE : 15 mL de tampon + 200 µL H₂O + 1 g de sol.

E : 15 mL de tampon + 200 µL de FDA + 1g de sol.

Boucher les tubes et vortexer légèrement. Incuber pendant une heure sous agitation à 30°C (50 rpm).

Arrêt de la réaction :

Au bout d'une heure d'incubation, prélever dans des tubes eppendorfs 1mL la solution de sol et ajouter 1 mL d'acétone. Vortexer et centrifuger pendant 5 minutes à 10000 tours/minutes.

Lecture au spectrophotomètre :

Prélever 1mL du surnageant et lire l'émission à 523 nm après excitation à 494 nm

Gamme étalon de la fluorescéine :

solution mère de fluorescéine à 1 mg.ml⁻¹ : dissoudre 100 mg de fluorescéine (F7505 sigma) dans 100 mL d'acétone.

Solution fille de fluorescéine à 100 µg/mL : diluer 1 mL de la solution mère dans 9 mL d'acétone. Calibration des standards : faire 6 points de gammes de la manière suivante :

Gamme étalon utilisée pour les mesures des expérimentations

Concentration	Volume en µl		
	tampon	acétone	solution fille
0	1000	1000	0
0,5	995	995	10
1	990	990	20
1,5	985	985	30
2	980	980	40
2,5	975	975	50

Mesure en microplaque des activités enzymatiques (cellulase et peptidase) adapté de la norme XP ISO/TS 22939

Tampon d'extraction:

Tampon acétate : 50 mM (pH = 5)

Solution A : introduire 1,25 g d'acétate de sodium dans 300 ml d'eau distillée

Solution B : introduire 2,5 ml d'acide acétique dans 875 ml d'eau distillée

Mélanger 250 ml de solution A + 750 ml de solution B et ajuster le pH à 7.

Tampon K-phosphate : 0,06 M, pH 7.6

8,7 g de K_2HPO_4 et 1,3g de KH_2PO_4 dans 800 mL d'eau déminéralisée.

Ajuster le pH à 7.6 (NaOH) et compléter à 1 L.

Le tampon d'extraction utilisé pour les activités hydrolases est constitué d'un mélange de tampon K-phosphate/acétate dans des proportions équivalentes (50/50). Le pH du tampon d'extraction est ajusté à 7.

Tampon enzymatique:

Tampon MES (4-MUF- β -d-cellobioside)

0,1 M à pH 6 $\Rightarrow$ 21,7 g/L $\Rightarrow$ 2,2 g de MES + 100 mL d'eau distillée

Tampon Trizma[®] (1-Leucine-7amido-methylcoumarin)

0,05 M à pH 8 $\Rightarrow$ 6,06 g/L $\Rightarrow$ 0,6 g de THAM + 100 mL d'eau distillée

Solution de substrats utilisés :

Solution mère de 5-MUF- β -d-cellobioside (fluorochrome : MUF):

Préparer une solution de 10 mM (5 mg.ml⁻¹) dans de l'éthylène glycol monométhyl-ether.

Préparer une solution fille à 1mM dans du tampon d'extraction MES et du tampon d'extraction (rapport : 50/50). (*Ex : 1ml de solution mère + 4,5 ml MES + 4,5ml tampon d'extraction*)

Solution mère de 1-Leucine-7amido-methylcoumarin (fluorochrome AMC) :

Préparer une solution de 10 mM (3,2 mg.l⁻¹) dans de l'eau ultra pure stérile

Préparer une solution fille à 1mM dans du tampon d'extraction Trizma et du tampon d'extraction (rapport : 50/50)

Mise en solution du sol :

Dans des flacons plastiques étanches, mettre 3 g de sol frais dans 40 ml de tampon d'extraction K-phosphate/acétate.

Agiter à 100 rpm pendant 10 min.

sonication des flacons 1 min (à 50 J.s⁻¹) puis re-agiter à 100 rpm pendant 5 min

Utiliser les solutions de sol pour remplir les microplaques

Essais enzymatiques (mélange réactionnel en microplaques)

Le mélange des substrats, de la solution de sol et du tampon enzymatique se fait dans un volume final de 250 μ l, avec la répartition suivante :

Volume substrat (1mM)	50 μ l
Volume tampon enzyme (MES ou Trizma)	100 μ l
Volume tampon extraction	50 μ l
Volume extrait sol	50 μ l

IL faut ajouter le substrat en dernier. Chaque extrait de sol est distribué en triplicats dans la microplaque afin d'avoir une représentativité de la solution du sol plus importante.

Incubation et lecture de la fluorescence :

Les plaques sont mises à incuber à 28°C avec une lecture toutes les 1h30 min durant 6 heures.

MUF : $\lambda_{\text{émission}} = 330 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{excitation}} = 450 \text{ nm}$

AMC : $\lambda_{\text{émission}} = 342 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{excitation}} = 440 \text{ nm}$

Gamme étalon :

Les gammes étalons sont effectuées dans des solutions de sol afin d'évaluer l'éventuelle diminution de la fluorescence induite par la chimie du sol.

Solution standard pour la fluorescence MUF : préparer une solution de 4-methylumbelliferone à 1 mM, 200 μM , 100 μM et 10 μM .

Solution standard pour la fluorescence AMC : préparer une solution de 7-amino-methylcoumarin à 1 mM, 100 μM et 10 μM .

Les différentes concentrations utilisées sont décrites ci-dessous :

concentration en $\mu\text{mol/L}$ (ou pmol/ul)	10			100				200
MUF ou AMC (pmol/ul)	0	2	4	6	12	20	40	80
MUF ou AMC (pmol/puits)	0	500	1000	1500	3000	5000	10000	20000
Vol solution MUF ou AMC (μl)	0	50	100	15	30	50	100	100
Vol tampon MES ou Trizma (μl)	100	100	100	100	100	100	100	100
Vol.tampon extraction (μl)	100	50	0	85	70	50	0	0
Vol.extrait de sol (μl)	50	50	50	50	50	50	50	50
MUF ou AMC (nmol/puits)	0	0,5	1	1,5	3	5	10	20

ANNEXE III

Tableau AIII-1 : Mesures des activités enzymatiques (hydrolases, cellobiohydrolase et aminopeptidase) de la terre de Chenevières initiale (*Ch*), oxydée (*Ch(Ox)*) et refonctionnalisée (*Ch(OxSPP8)*, *Ch(OxSPP31)*) au temps initial (T0) et après 5 mois (T5), et des matériaux d'amendement SPP et CDV.

		Hydrolases ($\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	Cellobiohydrolase mU	Aminopeptidase mU
<i>Ch</i>		$42 \pm 3,7$	$0,51 \pm 0,09$	$1,85 \pm 0,14$
<i>Ch(Ox)</i>	T0	$0,3 \pm 0,04$	$0,03 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,07$
	T5	$6,2 \pm 2,7$	$0,04 \pm 0,03$	$0,26 \pm 0,05$
<i>Ch(OxSPP8)</i>	T0	$16,3 \pm 1,2$	$0,31 \pm 0,07$	$0,86 \pm 0,23$
	T5	$89,2 \pm 4,3$	$0,45 \pm 0,11$	$2,41 \pm 0,32$
<i>Ch(OxSPP31)</i>	T0	$51 \pm 9,6$	$0,72 \pm 0,10$	$2,67 \pm 0,05$
	T5	$106,1 \pm 2,0$	$0,51 \pm 0,17$	$3,53 \pm 0,93$
CDV		$149,2 \pm 10,5$	$5,35 \pm 1,12$	$12,82 \pm 5,56$
SPP		$44,5 \pm 1,5$	$0,12 \pm 0,01$	$2,51 \pm 0,29$

Tableau AIII-2 : Le tableau présente les tests statistiques. Les lettres et les * représente les différences significatives (n.s : non significatif). L'effet du traitement a été évalué par Anova ($p < 0.05$) pour la cellobiohydrolase et l'aminopeptidase et par un test de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) pour les hydrolases.

		<i>Ch</i>	<i>Ch(Ox)</i>		<i>Ch(OxSPP8)</i>		<i>Ch(OxSPP31)</i>	
			T0	T5	T0	T5	T0	T5
Hydrolases	Effet traitement		← *		← *		← *	
	Effet modalités		A		B		C	
	Effet temps		← *		← *		← *	
Cellobiohydrolases	Effet traitement		← *		← *		← *	
	Effet modalités		A		B		C	
	Effet temps		n.s		n.s		n.s	
Aminopeptidases	Effet traitement		← *		← *		← *	
	Effet modalités		A		B		C	
	Effet temps		← *		← *		← *	

Tableau AIII-3 : Mesures des activités enzymatiques (hydrolases, cellobiohydrolase et aminopeptidase) de la terre de Neuves-Maisons initiale (*NM*), oxydée (*NM(Ox)*) et refonctionnalisée (*NM(OxSPP8)*) au temps initial (T0) et après 5 mois (T5) et des matériaux d'amendement.

		Hydrolases ($\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	Cellobiohydrolase mU	Aminopeptidase mU
<i>NM</i>		$20,22 \pm 4,35$	$0,04 \pm 0,01$	$0,44 \pm 0,05$
<i>NM(Ox)</i>	T0	$4,75 \pm 1,05$	$0,2 \pm 0,05$	$0,66 \pm 0,06$
	T5	$8,33 \pm 1,78$	$0,04 \pm 0,01$	$0,27 \pm 0,15$
<i>NM(OxSPP8)</i>	T0	$35,46 \pm 8,45$	$1,04 \pm 0,24$	$2,58 \pm 0,12$
	T5	$44,9 \pm 5,41$	$0,36 \pm 0,13$	$1,07 \pm 0,25$
CDV		$149,2 \pm 10,5$	$5,35 \pm 1,12$	$12,82 \pm 5,56$
SPP		$44,5 \pm 1,5$	$0,12 \pm 0,01$	$2,51 \pm 0,29$

Tableau AIII-4 : Le tableau présente les tests statistiques. Les lettres et les * représente les différences significatives (n.s : non significatif). L'effet du traitement a été évalué par Anova ($p < 0.05$) pour la cellobiohydrolase et l'aminopeptidase et par un test de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) pour les hydrolases.

		<i>NM</i>	<i>NM(Ox)</i>		<i>NM(OxSPP8)</i>	
			T0	T5	T0	T5
Hydrolases	Effet traitement		← *		← *	
	Effet modalités		A		B	
	Effet temps		← *		← n.s	
Cellobiohydrolases	Effet traitement		← *		← *	
	Effet modalités		A		B	
	Effet temps		← *		← *	
Aminopeptidases	Effet traitement		← *		← *	
	Effet modalités		A		B	
	Effet temps		← *		← *	

ANNEXE IV

Tableau IV : Analyse chimique du sol prélevé dans les différentes modalités et à différents temps, et analyse chimique des matériaux utilisés pour les amendements
(moyenne et écart-type, n=4) (Lq : limite de quantification).

		pH	C _{org} g.kg ⁻¹	N _{tot} g.kg ⁻¹	C/N	Calcaire g.kg ⁻¹	P _{Olson} g.kg ⁻¹	Ca _{échangeable} cmol.kg ⁻¹	Mg _{échangeable} cmol.kg ⁻¹	K _{échangeable} cmol.kg ⁻¹	CEC cmol.kg ⁻¹
<i>Ch</i>		6,41 ± 0,05	11,7 ± 0,2	0,96 ± 0,01	12,2	< Lq	0,141 ± 0,002	4,49 ± 0,13	0,51 ± 0,01	0,73 ± 0,02	5,23 ± 0,10
<i>Ch(Ox)</i>	T0	3,39 ± 0,03	11,1 ± 3,2	0,95 ± 0,04	11,7	< Lq	0,066 ± 0,001	5,48 ± 0,20	0,68 ± 0,02	0,96 ± 0,04	< Lq
	T5	4,13 ± 0,05	8,0 ± 0,5	0,89 ± 0,03	9,0	< Lq	0,128 ± 0,010	4,97 ± 0,70	0,69 ± 0,03	0,46 ± 0,00	1,71 ± 0,70
<i>Ch(OxSPP8)</i>	T0	6,27 ± 0,05	39,3 ± 6,3	2,19 ± 0,21	17,9	30,0 ± 5,8	0,189 ± 0,010	36,88 ± 0,33	1,79 ± 0,03	2,39 ± 0,11	8,80 ± 0,20
	T5	7,3 ± 0,05	25,0 ± 2,4	1,75 ± 0,16	14,3	22,7 ± 2,7	0,234 ± 0,030	40,98 ± 3,60	1,18 ± 0,11	1,18 ± 0,02	8,54 ± 0,60
<i>Ch(OxSPP31)</i>	T0	7,27 ± 0,07	83,4 ± 8,7	2,40 ± 0,27	34,8	109,0 ± 14,4	0,207 ± 0,010	41,85 ± 1,13	1,89 ± 0,09	2,04 ± 0,11	10,22 ± 0,40
	T5	7,43 ± 0,00	59,2 ± 9,3	2,62 ± 0,20	22,6	130,0 ± 19,0	0,201 ± 0,010	47,13 ± 1,43	1,89 ± 0,08	1,29 ± 0,02	10,55 ± 0,20
<i>NM</i>	T0	7,27 ± 0,05	67,0 ± 3,3	2,47 ± 0,10	27,1	21,0 ± 0,5	0,076 ± 0,004	220,0 ± 11,05	4,73 ± 0,25	1,12 ± 0,03	9,26 ± 0,28
<i>NM(Ox)</i>	T0	7,11 ± 0,05	58,5 ± 2,5	2,08 ± 0,03	28,1	18,4 ± 1,8	0,026 ± 0,003	175,7 ± 4,19	5,28 ± 0,38	1,17 ± 0,04	8,63 ± 0,34
	T5	7,2 ± 0,00	58,2 ± 1,5	1,9 ± 0,03	30,7	14,6 ± 0,01	0,037 ± 0,004	186,9 ± 13,43	4,52 ± 0,18	0,71 ± 0,041	8,60 ± 0,29
<i>NM(OxSPP8)</i>	T0	7,27 ± 0,00	55,8 ± 20,3	3,27 ± 0,22	17,1	60,7 ± 3,9	0,193 ± 0,020	200,5 ± 1,80	6,15 ± 0,01	2,45 ± 0,00	8,08 ± 0,75
	T5	7,2 ± 0,00	66,1 ± 3,3	2,68 ± 0,15	24,7	36,8 ± 2,8	0,081 ± 0,010	166,75 ± 16,27	4,82 ± 0,78	1,61 ± 0,21	10,24 ± 0,50
<i>SPP</i>		8,13 ± 0,05	243,3 ± 1,1	1,6 ± 0,01	159,0	405,7 ± 3,1	0,011 ± 0,000	46,42 ± 0,33	2,17 ± 0,02	0,12 ± 0,00	9,28 ± 0,10
<i>CDV</i>		7,03 ± 0,06	160,5 ± 53,7	18,1 ± 5,7	8,9	90,7 ± 4,3	1,403 ± 0,025	79,33 ± 0,76	10,11 ± 0,125	19,74 ± 0,27	50,07 ± 1,00

ANNEXE V

Test d'atténuation de la mesure de l'hydrolyse de la fluorescéine diacétate par le persulfate

Le persulfate est un oxydant persistant et susceptible d'être encore présent dans le sol après le traitement, contrairement au peroxyde d'hydrogène qui se décompose rapidement. Dans cette optique nous avons testé l'action du persulfate sur le produit de dégradation de la FDA, la fluorescéine (dont on mesure la fluorescence pour quantifier le potentiel actif d'hydrolyse).

Différentes concentrations de persulfate ont été testées. La plus forte concentration représentant l'hypothèse la moins probable, c'est-à-dire que la totalité du persulfate injecté est resté dans le sol.

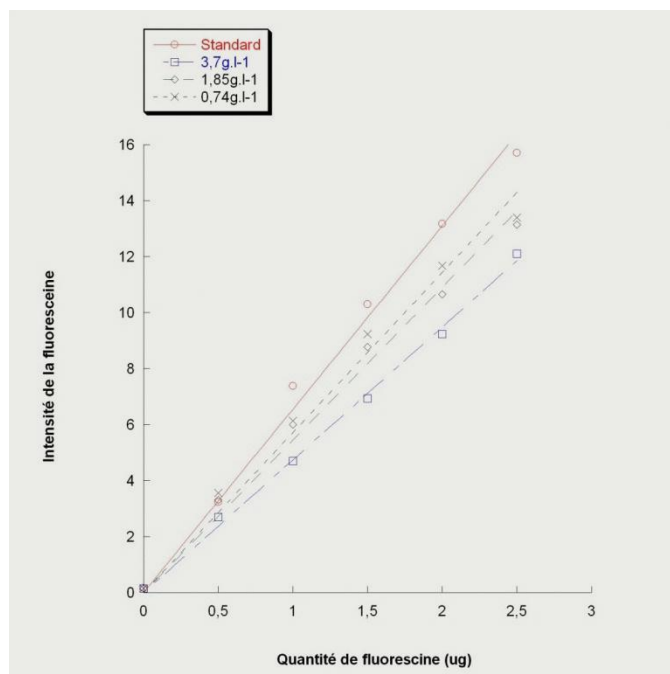


Figure AV-1: Intensité de la fluorescence de la fluorescéine en présence de différentes concentrations en persulfate de sodium

Une diminution de la fluorescence émise est observable après exposition à différentes concentrations en persulfate de sodium. Il y a donc un biais de la mesure de l'activité FDA lorsque le sol contient du persulfate résiduel. Cependant, dans notre expérience, la diminution maximale de la fluorescence n'a pas excédé (30 %). Cette inhibition ne peut pas expliquer que dans la terre *Ch*, aucune activité FDA n'ait été mesurée. Néanmoins, il est possible que cette inhibition puisse expliquer la différence d'activité mesurée pour les terres *Ho* et *NM*.

ANNEXE VI

Matrice de corrélation de Pearson de l'ACP

Variables	N	C/N	CO	MO	pH	CaCO3	P2O5	Ca	Mg	K	CEC	Densité (ADN16S)	Activité
N	1	-0,171	0,842	0,842	0,546	0,374	-0,010	0,233	-0,167	0,535	-0,585	0,437	0,513
C/N	-0,171	1	0,386	0,385	0,160	0,449	0,569	-0,609	0,346	-0,017	0,118	-0,096	-0,071
CO	0,842	0,386	1	1,000	0,599	0,594	0,292	-0,119	0,022	0,491	-0,488	0,358	0,441
MO	0,842	0,385	1,000	1	0,602	0,599	0,296	-0,115	0,026	0,494	-0,489	0,360	0,444
pH	0,546	0,160	0,599	0,602	1	0,869	0,525	-0,313	0,139	0,875	-0,476	0,779	0,861
CaCO3	0,374	0,449	0,594	0,599	0,869	1	0,706	-0,425	0,409	0,764	-0,193	0,572	0,705
P2O5	-0,010	0,569	0,292	0,296	0,525	0,706	1	-0,480	0,647	0,441	0,019	0,073	0,226
Ca	0,233	-0,609	-0,119	-0,115	-0,313	-0,425	-0,480	1	-0,144	-0,063	-0,005	-0,070	-0,027
Mg	-0,167	0,346	0,022	0,026	0,139	0,409	0,647	-0,144	1	0,215	0,456	-0,094	0,089
K	0,535	-0,017	0,491	0,494	0,875	0,764	0,441	-0,063	0,215	1	-0,204	0,650	0,841
CEC	-0,585	0,118	-0,488	-0,489	-0,476	-0,193	0,019	-0,005	0,456	-0,204	1	-0,353	-0,282
Densité (ADN16S)	0,437	-0,096	0,358	0,360	0,779	0,572	0,073	-0,070	-0,094	0,650	-0,353	1	0,901
Activité FDA	0,513	-0,071	0,441	0,444	0,861	0,705	0,226	-0,027	0,089	0,841	-0,282	0,901	1

Liste des figures

Figure 1 : Structure des 16 HAP classés comme polluants prioritaires par l'EPA (Environmental Protection Agency).....	16
Figure 2 : Schéma synthétisant les processus auxquels sont soumis les HAP dans les matrices pollués, présentant soit une pollution dispersée soit une pollution amassée (Vessigaud, 2007).....	20
Figure 3 : Principales réactions dérivées de la réaction de Fenton.....	24
Figure 4 : Principales réactions dérivées de l'oxydation du persulfate (Huling and Pivetz, 2006).....	25
Figure 5 : Représentation schématique du concept de qualité des sols utilisant des indicateurs en relations avec les fonctions du sol (<i>d'après Maubasch et Tugel, 1997, modifié par Gros R, 2002</i>).....	29
Figure 6 : Différentes trajectoires de la restauration écologique (tiré de Séré, 2007).....	36
Figure 7 : Dispositifs de laboratoire utilisés dans les expérimentations (a et b: colonnes et système d'aspersion (source ENSIC), c et d : malaxeur et système d'aspersion, e : disposition des pots dans la chambre de culture). 46	46
Figure 8 : Colonne lysimétrique avec les sondes de mesures (a : vue de la surface, b : vue de l'intérieur) (source : gisfi).....	46
Figure 9 : Représentation schématique du remplissage d'une cellule d'ASE.....	50
Figure 10 : Représentation schématique de conditions thermiques utilisées pour les PCR en temps réelles. Températures d'hybridation (T_{hy}) déterminées en fonction des communautés analysées.....	57
Figure 11 : Mesure de l'indice global à l'aide la surface du triangle adapté de Kang et al., (2007). <i>Le triangle est tracé à partir d'un point d'origine O et la longueur des segments représente le score de l'indice mesuré. Les extrémités des segments sont ensuite reliées afin de représenter le triangle dont l'aire représente l'indice global (IG).</i>	62
Figure 12 : Dégagement de CO_2 cumulé, mesuré dans les incubations des terres oxydées par réaction de Fenton avec les doses 6 et 65 g.kg^{-1} et la terre témoin au cours des 5 semaines d'incubation (moyenne et écart-type, $n=5$).	68
Figure 13 : Quantification des bactéries cultivables, du nombre de copies de gène d'ADNr 16S (bactéries totales), de PAH-RHD (bactéries dégradantes) et d'ADNr18S (champignons) dans les terres traitées par réaction de Fenton (6 et 65 g.kg^{-1}) au début (T_0) et après 5 semaines (T_5) d'incubation (moyenne et écart-type, $n=3$). <i>Deux lettres différentes dans chaque catégorie indiquent des différences significatives entre les traitements (Anova, $p < 0.05$). Les * représentent les différences entre T_0 et T_5 (test de Mann et Whitney, $p < 0.05$).</i>	69
Figure 14 : Cinétique de germination et biomasse des parties foliaires et racinaires du ray-grass pour les terres traitées par réaction de Fenton et témoin. <i>Les * indiquent des différences significatives entre les taux de germination (Plus petite différence significative (LSD) : 17 %) et les différentes lettres dans chaque catégorie indiquent des différences significatives de biomasse entre les traitements (Anova, $p < 0.05$).</i>	69
Figure 15 : Concentration en HAP (moyenne et écart-type, $n=3$) dans les lots de la terre Ch avant (T_0) et après traitement par réaction de Fenton (Fenton), par le persulfate activé (persulfate) et par l'eau (Témoin). <i>Deux lettres différentes indiquent une différence significative entre traitements (Test t Student, $p < 0,05$)</i>	78
Figure 16 : Concentration en HAP (moyenne et écart-type, $n=3$) dans les terres NM et Ho après traitement par réaction de Fenton (Fenton), par le persulfate activé (persulfate) et par l'eau (Témoin). <i>Deux lettres différentes indiquent une différence significative entre traitements (Anova, $p < 0,05$)</i>	79
Figure 17 : Teneur en carbone total et en carbone organique (moyenne et écart-type, $n=3$) pour les 3 terres (Ch, NM, Ho) traitées par réaction de Fenton (Fenton), par le persulfate activé (Persulfate) et par l'eau (Témoin). <i>Deux lettres différentes indiquent une différence significative entre traitements (Anova, $p < 0,05$)</i>	80
Figure 18 : Teneur en azote total (moyenne et écart-type, $n=3$) pour les 3 terres (Ch, NM, Ho) traitées par réaction de Fenton (Fenton), par le persulfate activé (Persulfate) et par l'eau (Témoin). <i>Deux lettres différentes indiquent une différence significative entre traitements (Anova, $p < 0,05$)</i>	80
Figure 19 : Teneur en P_{Olsen} (moyenne et écart-type, $n=3$) pour les 3 terres (Ch, NM, Ho) traitées par réaction de Fenton (Fenton), par le persulfate activé (Persulfate) et par l'eau (Témoin). <i>Deux lettres différentes indiquent une différence significative entre traitements (Anova, $p < 0,05$)</i>	81
Figure 20 : pH ($n=1$) des 3 terres (Ch, NM, Ho) traitées par réaction de Fenton (Fenton) ou persulfate activé (Persulfate) et par l'eau (Témoin).	81

Figure 21 : Capacité d'échange cationique (moyenne et écart-type, n=3) pour les 3 terres (Ch, NM, Ho) traitées par réaction de Fenton (Fenton), par le persulfate activé (Persulfate) et par l'eau (Témoin). Deux lettres différentes indiquent une différence significative entre traitements (Anova, $p < 0,05$)	82
Figure 22 : Densité des microorganismes cultivables (moyenne et écart-type, n=4) dans les 3 terres (Ch, NM, Ho) traitées par réaction de Fenton (Fenton), par le persulfate activé (persulfate) et par l'eau (Témoin). (Lq : Limite de quantification). Deux lettres différentes indiquent une différence significative entre traitements (Anova, $p < 0,05$).....	83
Figure 23: Activité des hydrolases (moyenne et écart-type, n=3) par mesure de la formation de fluorescéine à partir de la fluorescéine diacétate dans les 3 terres (Ch, NM, Ho) traitées par réaction de Fenton (Fenton), par le persulfate activé (persulfate) et par l'eau (Témoin). (Lq : Limite de quantification). Deux lettres différentes indiquent une différence significative entre traitements (Anova, $p < 0,05$)	83
Figure 24 : Représentation en graphique radar des données de chaque paramètre mesuré pour les terres CH, NM et HO traité par la réaction de Fenton (vert), par persulfate activé (rouge) et par l'eau (gris). Les données sont exprimées en pourcentage par rapport aux valeurs maximales mesurées pour chaque paramètre, en tenant compte des tests statistiques. Les données pour la densité en microorganismes cultivables ont été transformées en log avant d'être retranscrites en pourcentage.....	88
Figure 25 : Evolution du pH en fonction de la quantité d'amendement dans les terres artificiellement contaminée (Ch) et industrielle (NM) oxydées par réaction de Fenton. Les proportions en matériaux sont représentées en %SPP-%Terre oxydée (TO)-%CDV. Les proportions entourées en rouge sont les proportions utilisées dans cette expérimentation.....	97
Figure 26 : Plan expérimental et modalités étudiées (n= nombre de répétitions par modalités).....	98
Figure 27 : Concentrations en HAP dans les terres avant traitement (Ch) et (NM), traitées par oxydation (Ch(Ox), NM(Ox)) et amendées (Ch(OxSSP8), Ch(OxSPP31), NM(OxSPP8)) au temps initial (T0) et après 5 mois (T5) et dans les matériaux amendés (SPP et CDV) (moyenne et écart-type, n=4). Le tableau présente les résultats des analyses statistiques (lettre et *) de l'effet des modalités et du temps réalisées par Anova à deux facteurs ($p < 0,05$) et de l'effet traitement réalisée par test t ($p < 0,05$) (n.s : non significatif).	100
Figure 28 : Matière sèche des parties aériennes et racinaires (moyenne et écart-type, n=4) des plantes après 3 mois de culture sur les terres traitées par oxydation et amendées. Les catégories de lettres représentent les résultats des tests statistiques pour les parties aériennes et racinaires ($p < 0,05$).....	101
Figure 29 : Nombre de copies de gène d'ADNr18S dans les terres avant traitement (Ch) et (NM), oxydées (Ch(Ox), NM(Ox)) et amendées (Ch(OxSSP8), Ch(OxSPP31), NM(OxSPP8)) au temps initial (T0) et après 5 mois (T5) ainsi que dans les matériaux d'amendement (SPP et CDV) (moyenne et écart-type, n=3 (T0) et n=4 (T5)). La limite de quantification (Lq) est à 10^3 copies de gène par gramme. Le tableau présente les résultats des analyses statistiques (lettre et *) de l'effet des modalités et du temps réalisées par Anova à deux facteurs ($p < 0,05$) et de l'effet traitement réalisée par test t ($p < 0,05$) (n.s : non significatif).	102
Figure 30 : Nombre de copies de gène d'ADNr16S dans les terres avant traitement (Ch) et (NM), oxydées (Ch(Ox), NM(Ox)) et amendées (Ch(OxSSP8), Ch(OxSPP31), NM(OxSPP8)) au temps initial (T0) et après 5 mois (T5) ainsi que dans les matériaux d'amendement (SPP et CDV) (moyenne et écart-type, n=3 (T0) et n=4 (T5)). La limite de quantification (Lq) est à 10^3 copies de gène par gramme. Le tableau présente les résultats des analyses statistiques (lettre et *) de l'effet des modalités et du temps réalisées par Anova à deux facteurs ($p < 0,05$) et de l'effet traitement réalisées par test t ($p < 0,05$) (n.s : non significatif).	103
Figure 31 : Analyse en composantes principales de la structure des communautés bactériennes analysées par TTGE pour la terre de Chenevières. (a) Matériaux d'amendements et modalités à T0, (b) Modalités à T0 et T5. Le tableau présente les indices de diversité bactérienne. Les cercles représentent les groupes déterminés par classification hiérarchique de type k-means	104
Figure 32 : Analyse en composantes principales de la structure des communautés bactériennes analysées par PCR-TTGE pour la terre de Neuves-Maisons. (a) Matériaux d'amendements et modalités à T0, (b) Modalités à T0 et T5. Le tableau représente la diversité bactérienne. Les cercles représentent les groupes déterminés par classification hiérarchique de type k-means.	105
Figure 33 : Minéralisation de la matière organique dans les terres avant traitement (Ch) et (NM), oxydées (Ch(Ox), NM(Ox)) et amendées (Ch(OxSSP8), Ch(OxSPP31), NM(OxSPP8)) au temps initial (T0) et après 5 mois (T5) ainsi que dans les matériaux d'amendement (SPP et CDV) (moyenne et écart-type, n=3 (T0) et n=4	

(T5)). Le tableau présente les analyses statistiques (lettre et *) des effets des modalités et du temps réalisées par Anova à deux facteurs ($p < 0,05$) et de l'effet traitement réalisée par test t ($p < 0,05$) (n.s: non significatif).	106
Figure 34 : Représentations graphiques des activités enzymatiques (hydrolases, cellobiohydrolase et aminopeptidase) pour les différentes modalités. Les données utilisées pour la représentation graphique ont été obtenues à partir des tableaux de l'annexe X. Ces valeurs ont été calculées en pourcentage par rapport aux valeurs des activités mesurées avant traitement pour la terre de Chenevières (Ch) et de Neuves-Maisons (NM)	108
Figure 35 : Mesure du pH et de la CEC des terres avant traitement (Ch) et (NM), oxydées (Ch(Ox), NM(Ox)) et amendées (Ch(OxSPP8), Ch(OxSPP31), NM(OxSPP8)) au temps initial (T0) et après 5 mois (T5) ainsi que dans les matériaux d'amendement (SPP et CDV) (moyenne et écart-type, $n=3$ (T0) et $n=4$ (T5)). Le tableau présente les tests statistiques (lettre et *) des effets modalité et temps réalisé par Anova à deux facteurs ($p < 0,05$) et de l'effet traitement réalisé par test t ($p < 0,05$ (n.s: non significatif)).	110
Figure 36 : C_{org} (a), N_{tot} (b) et P_{Olsen} (c) des terres avant traitement (Ch) et (NM), oxydées (Ch(Ox), NM(Ox)) et amendées (Ch(OxSPP8), Ch(OxSPP31), NM(OxSPP8)) au temps initial (T0) et après 5 mois (T5) ainsi que dans les matériaux d'amendement (SPP et CDV) (moyenne et écart-type, $n=3$ (T0) et $n=4$ (T5)). Le tableau présente les tests statistiques (lettre et *) des effets modalité et temps réalisé par Anova à deux facteurs ($p < 0,05$) et de l'effet traitement réalisé par test t ($p < 0,05$ (n.s: non significatif). Pour le CDV certaines valeurs trop élevées pour une bonne représentation graphique ont été rajoutés en haut de l'histogramme.	112
Figure 37 : a) Exemple de lame mince réalisée sur la modalité (Ch(OxSPP31)) après 5 mois d'expérimentation. b) Zone intégrée pour la mesure de porosité. C) Traitement numérique de la lame.....	113
Figure 38 : Représentation en graphique radar des différents paramètres mesurés. Les données de chaque paramètre sont exprimées en pourcentage, par rapport aux valeurs maximales mesurées pour l'ensemble des modalités de la terre Ch ou NM. Ces pourcentages tiennent compte des tests statistiques. Les données pour la densité en microorganismes cultivables ont été transformées en log avant d'être retranscrites en pourcentage.	116
Figure 39 : Chronogramme des interventions sur les lysimètres (Ox : oxydation, refonc : refonctionnalisation, les chiffres accolés aux abréviations représentent le nombre de mois écoulés depuis l'oxydation ou la refonctionnalisation) (: prélèvement d'échantillons de terre pour les mesures des paramètres physico-chimiques et biologiques).....	125
Figure 40 : Photographies de la zone contrôlée (a) et (b) du dispositif d'injection utilisé pour l'oxydation <i>in situ</i> des terres polluées par des HAP	126
Figure 41 : Evolution du pH en fonction de la teneur en amendement dans les terres oxydées traitées par réaction de Fenton et persulfate activé. Les proportions en matériaux sont représentées en %Sous-produits papetiers (SPP)-%Terre oxydée (TO)-% Compost de déchets verts (CDV). Les proportions entourées en rouge sont les proportions utilisées dans cette expérimentation	128
Figure 42 : Photographies des différentes étapes de la refonctionnalisation : a) terre oxydée en place, b) décaissement de 15 cm de terre traitée, c) mélange de la terre avec les matériaux d'amendements en proportions définies, d) disposition du mélange dans le lysimètre	129
Figure 43 : Représentation schématique des lysimètres témoin, traité par réaction de Fenton et par persulfate activé.....	129
Figure 44 : Photographies du prélèvement dans les lysimètres, a) tarière, b) prélèvement d'un échantillon d'une hauteur de 15cm, c) disposition des échantillons destinés à être analysés dans une gouttière en plastique	130
Figure 45 : Profondeur des prélèvements analysés sur les terres à chaque étape. Les cases en gris correspondent aux couches de prélèvements qui ont été analysées pour les paramètres correspondants	131
Figure 46 : Concentrations en HAP (16 US-EPA) en fonction de la profondeur, dans la terre NM témoin et les terres traitées par réaction de Fenton ou persulfate (données issues de la thèse de Julien Lemaire, 2011). Les catégories de lettres représentent les résultats des tests statistiques pour chaque lysimètre (Anova, $p < 0,05$). Les * représentent les différences significatives par rapport aux valeurs du lysimètre témoin (Anova, $p < 0,05$). ..	132
Figure 47 : Teneurs en cadmium, nickel, plomb et zinc total, en fonction de la profondeur, dans la terre témoin et les terres traitées par réaction de Fenton ou persulfate.....	134
Figure 48 : Teneurs en C_{org} , N_{tot} , en P_{Olsen} et en carbonates en fonction de la profondeur, dans la terre témoin et les terres traitées par réaction de Fenton	138

Figure 49: pH et CEC en fonction de la profondeur, dans la terre témoin et les terres traitées par réaction de Fenton ou persulfate	138
Figure 50 : Evolution de la température dans les lysimètres traités par oxydation chimique et témoin traité à l'eau à différentes profondeurs (: 50 cm, : 100 cm, : 150 cm). Les flèches représentent le moment de la période d'injection.....	141
Figure 51 : Photographie de la zone contrôlée (a) et de la surface du lysimètre pendant l'oxydation <i>in situ</i>	141
Figure 52 : Nombre de copie de gène d'ADNr 16 s (moyenne et erreur standard, n=3) pour les terres traitées par réaction de Fenton ou persulfate activé et pour la terre témoin. Chaque catégorie de lettres représente les résultats des tests statistiques effectués sur les différentes couches d'un même lysimètre (Kruskall-wallis <0,05). Les * représentent les différences significatives par rapport aux valeurs du lysimètre témoin (Kruskall-wallis, p <0,05).	142
Figure 53 : a) Gel TTGE montrant les différents profils obtenus par les techniques de PCR-TTGE sur l'ADN 16S dans les prélèvements à 7 cm des terres des lysimètres témoin et traités par réaction de Fenton. b) Analyse en composante principale des profils de communautés bactériennes obtenus par TTGE. Les ellipses représentent les groupes déterminés par une classification k-means.	143
Figure 54 : Activité des hydrolases (moyenne et écart-type, n=3) par mesure de la formation de fluorescéine à partir de la fluorescéine diacétate dans les traitées par réaction de Fenton ou persulfate activé et la terre témoin. Les catégories de lettres représentent les résultats des tests statistiques pour chaque lysimètre (Anova, p <0,05). Les * représentent les différences significatives par rapport aux valeurs du lysimètre témoin (Anova, p <0,05)	143
Figure 55 : Croissance du ray-grass (<i>Lolium perenne</i>) après 15 jours de culture sur les différentes terres des prélèvements de surface H1 (a : terre témoin, b et c : terre traitée par réaction de Fenton, d : terre traitée par persulfate activé).	144
Figure 56 : Taux de germination du ray-grass après 4 j de culture sur les terres de la couche 0-7 cm des lysimètres traités par réaction de Fenton et témoin. Les étoiles représentent les différences significatives par test de Fisher (<0,05) entre les terres traitées par réaction de Fenton et la terre témoin pour le 4 ^{ème} jour (LSD : 16,7%) et le 5 ^{ème} jour (LSD : 16,4%)	144
Figure 57 : a : Cristaux de surface de la terre traitée par persulfate (grossissement x 20), b : graine de ray-grass non germée retrouvée dans la terre traitée par persulfate après 15 jours, c : graine de ray-grass originelle	145
Figure 58 : Biomasses aériennes et racinaires du ray-grass (moyenne et écartype, n=4) après 15 jours de culture sur la terre témoin ou sur les terres traitées par réaction de Fenton pour les prélèvements H1 et H2. Les lettres de chaque catégories indiquent les différences significatives (Anova, p <0,05)	145
Figure 59 : a) représentation des groupes déterminés par classification k-means. b) projection sur les axes des attributs de l'ACP avec les différentes caractéristiques physico-chimiques et biologiques mesurées sur les prélèvements de terre des lysimètres traités par réaction Fenton ou persulfate activé et du lysimètre témoin. Lysimètre L06 : témoin, L09 et L10 : traités par Fenton, L11 : traité par persulfate. La flèche représente le « gradient de perturbation »	146
Figure 60 : Evolution des teneurs en HAP dans les lysimètres témoin et Fenton A et les lysimètres Fenton B et persulfate amendés à « Trefonc ».....	151
Figure 61 : pH en fonction de la profondeur, dans la terre témoin et les terres traitées par réaction de Fenton ou persulfate, au temps de prélèvement Trefonct.8.....	152
Figure 62 : Nombre de copies de gène d'ADNr 16S dans les terres de surface (0-7 cm) des lysimètres témoins, traités par réaction de Fenton et persulfate au cours des procédés d'oxydation, et de refunctionalisation (moyenne et erreur standard, n=3). Les lettres représentent les résultats des tests statistiques sur les comparaisons entre lysimètres à un temps précis (Anova, p <0,05). Les * présentent les modalités qui ont évolué significativement par rapport au précédent prélèvement. Les cellules grisées représentent les modalités n'étant pas concernées par le test statistique.	152
Figure 63 : Evolution de l'activité des hydrolases dans les terres de surface (0-7 cm) des lysimètres témoins, traités par réaction de Fenton et persulfate au cours des procédés d'oxydation et de refunctionalisation (moyenne et erreur standard, n=3). Les lettres représentent les résultats des tests statistiques sur les comparaisons entre lysimètres à un temps donné (Anova, p <0,05). Les * représentent les modalités qui ont évolué significativement par rapport au précédent prélèvement. Les cellules grisées représentent les modalités n'étant pas concernées par le test statistique.	154

Figure 64 : Photographies de la végétation des lysimètres au cours des 5 mois suivant le semis de ray-grass et de trèfle blanc dans les terres témoins et les terres oxydées par réaction de Fenton et persulfate et amendées	155
Figure 65 : Suivi des concentrations en cations majeurs, magnésium (Mg^{2+}), sodium (Na^+), potassium (K^+) et calcium (Ca^{2+}) dans les solutions de percolations des lysimètres témoin et traités par réaction de Fenton ou persulfate. <i>Les flèches représentent les périodes d'oxydation et de refonctionnalisation des lysimètres concernés.</i>	159
Figure 66 : Suivi des concentrations en sulfate (SO_4^{2-}) et en nitrate (NO_3^-) dans les solutions de percolations des lysimètres témoin et traitées par réaction de Fenton ou persulfate. <i>Les flèches représentent les périodes d'oxydation et de refonctionnalisation des lysimètres concernés.</i>	160
Figure 67 : Teneur en carbone organique dissout dans les eaux de percolations des lysimètres témoins et traités par réaction de Fenton ou persulfate. <i>Les flèches représentent les périodes d'oxydation et de refonctionnalisation des lysimètres concernés.</i>	161
Figure 68 : Suivi des concentrations en cuivre (Cu), manganèse (Mn), nickel (Ni), zinc (Zn), phosphore (P) et plomb (Pb) dans les solutions de percolations des lysimètres témoin et traités par réaction de Fenton ou persulfate. <i>Les flèches représentent les périodes d'oxydation et de refonctionnalisation des lysimètres concernés.</i>	162
Figure 69 : Indice global de l'état du sol en fonction des différentes activités anthropiques	167
Figure 70 : Représentation schématique de l'évolution des IG des terres NM et Ch après les étapes d'oxydation et de refonctionnalisation	176

Liste des tableaux

Tableau 1 : Matrice d'applicabilité des techniques de dépollution pour les polluants organiques (adaptée de Colombano et al., 2010) (+ : envisageable ; - : non envisageable ; S : zone non saturée et sédiments ; W : zone saturée et eaux superficielles).....	22
Tableau 2 : Potentiel redox et persistance des oxydants utilisés pour les techniques ISCO, adapté de (Huling and Pivetz, 2006)	23
Tableau 3 : Synthèse des doses de peroxyde d'hydrogène proposées dans des communications scientifiques pour le traitement des sols par réaction de Fenton (<i>Créosote : site contaminé par des huiles chargées en créosote pour le traitement du bois. MGP : Manufactured Gaz production, site contaminé par sous déchets de production du gaz, - : pas de données, ** : expérimentation sous UV</i>). Les doses sont ramenées en gramme de peroxyde d'hydrogène pour homogénéiser les résultats des différentes études.	26
Tableau 4 : Liste non exhaustive d'indicateurs utilisés pour mesurer certains paramètres du sol en lien direct avec la qualité du sol. (Adapté de Franzlubber et Halley, 2006). Les V représentent les indicateurs utilisés dans ce travail.....	28
Tableau 5 : Synthèse des principaux effets de l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène sur les propriétés des sols	34
Tableau 6 : Exemples d'utilisation d'amendements organiques ou minéraux associée à des traitements biophysico-chimiques de sols pollués (<i>d'après (Séré,2007; Bresson et al.,2001; Harrington ,1999 ; Tejada et al., 2008; Fierro et al., 1999)</i>).....	37
Tableau 7 : Caractéristiques physico-chimiques des terres utilisés dans les expérimentations (<Lq : Limite de quantification, nd : non détecté). Les deux valeurs définies pour certains paramètres représentent les valeurs extrêmes retrouvées dans les différents lots utilisés pour les expérimentations. Pour les paramètres présentant des valeurs stables entre les différents lots, aucun intervalle de valeur n'a été donné. Les teneurs en HAP sont celles des lots des HAP utilisés dans le chapitre 4 et représentent les valeurs moyennes retrouvées pour ces terres.	42
Tableau 8 : Propriétés agronomiques moyennes des boues de papèteries (SPP) et du compost de déchets verts (CDV) Source : Valterra Depollution/Rehabilitation	44
Tableau 9 : Conditions de PCR pour amplifier les bactéries	55
Tableau 10 : Composition du milieu réactionnel utilisé pour amplifier l'ADNr 16S bactérien	55
Tableau 11 : Composition du mélange réactionnel utilisé pour l'amplification par PCR en temps réel.....	56
Tableau 12 : Amorces et taille des fragments pour les différents gènes amplifiés	56
Tableau 13 : Composition du gel utilisé en TTGE pour séparer les fragments d'ADN bactérien et conditions de migration des fragments d'ADN.....	58
Tableau 14 : Mesure des paramètres physico-chimiques (n =1) et des teneurs en HAP (moyenne et écart type, n= 3) des terres NM traitées par réaction de Fenton et de la terre témoin. Deux lettres différentes indiquent une différence significative entre les traitements ($p < 0.05$).....	67
Tableau 15 : Paramétrage des procédés d'oxydations par réaction de Fenton et persulfate activé pour l'expérimentation en colonnes de laboratoire	77
Tableau 16 : Concentration en éléments totaux des terres Ch, NM et Ho avant traitement par oxydation chimique et traitement à l'eau (< Lq : Limite de quantification)	84
Tableau 17 : Pourcentage d'oxydants résiduels par rapport à la quantité injectée dans les percolats après traitement. Les cellules grises représentent le traitement où le persulfate n'a pas été utilisé.....	85
Tableau 18 : Mesure de la toxicité des percolats par le test Microtox® (en UT : unité toxique, CI50 : représente la concentration d'un composé qui est requise pour une inhibition d'une réponse biologique ou biochimique à 50% in vitro)	85
Tableau 19 : Pourcentage d'éléments transférés dans les percolats par rapport à la teneur initiale dans les 3 terres traitées (Ch, NM et Ho) par réaction de Fenton (Fenton), persulfate activé (Persulfate) et par l'eau (témoin). Les valeurs < 0,01% correspondent aux cellules grisées	86
Tableau 20 : Concentration en nitrates, sulfates et sodium dans les percolats. Les valeurs en limite de quantification ou incertaines correspondent aux cellules grisées.....	86

Tableau 21 : Paramètres d'oxydation en malaxeur pour les terres artificiellement contaminée (<i>Ch</i>) et la terre de friche industrielle (<i>NM</i>).....	96
Tableau 22 : Abréviations utilisées pour les différentes modalités.....	98
Tableau 23 : Rapports « masses fraîches/masses sèches » des parties aériennes après 3 mois de culture sur les terres oxydées (<i>Ch(Ox)</i> , <i>NM(Ox)</i>) et amendées <i>Ch(OxSPP8)</i> , <i>Ch(OxSPP31)</i> , <i>NM(OxSPP8)</i>).....	101
Tableau 24 : Mesure de la macroporosité pour une surface de 11,45 cm ² identifiée sur les lames minces des différentes modalités, basée sur un traitement numérique selon <i>Nouhou Salifou (2012)</i>	113
Tableau 23 : Paramètres de l'oxydation par réaction de Fenton et persulfate activé utilisés pour le traitement des terres des lysimètres	127
Tableau 26 : Analyse des métaux totaux et extractibles à l'EDTA dans les terres traitées par réaction de Fenton ou persulfate et la terre témoin en fonction de la profondeur.....	136
Tableau 27 : Paramètres physico-chimiques des terres traitées par réaction de Fenton ou persulfate en fonction de la profondeur après traitement.....	139
Tableau 28 : Indices représentant l'activité biologique (I_{AB}), les propriétés physico-chimique (I_{PC}), la teneur en polluant (I_{HAP}) et l'indice global (I_G) pour les différentes expérimentations. Dans chaque expérimentation, les indices ont été calculés de manière totalement indépendante pour chaque type de terre <i>Ch</i> , <i>NM</i> ou <i>Ho</i> . En gras sont représentés les indices mesurés pour les terres non traitées par oxydation chimique.	168

**AUTORISATION DE SOUTENANCE
DU DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Madame Sabine HOUOT, Directrice de Recherches, EGC /INRA Thiverval-Grignon,

**Madame Cécile DELOLME, Docteur Ingénieur HDR, Ecole Nationale des Travaux Publics de
l'Etat Vaulx-en-Velin**

L'Administrateur Provisoire de l'Université de Lorraine, autorise :

Monsieur LAURENT Fabien

à soutenir devant un jury de l'UNIVERSITE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

**"Impact de l'oxydation chimique et de la refunctionalisation sur des paramètres
physico-chimiques et biologiques de terre contaminées aux HAP"**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Intitulé du doctorat : **"Sciences Agronomiques"**

Fait à Vandoeuvre, le **27 janvier 2012**

Pour l'Administrateur Provisoire par délégation,

Le Chargé de Mission,

François LAURENT



Résumé

Afin de dépolluer et de réhabiliter les sols contaminés par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), différentes techniques ont été développées durant les dernières décennies, mais leur impact sur les fonctions du sol est rarement pris en compte. L'objectif de ce travail était d'évaluer l'impact des traitements par oxydation chimique sur différents paramètres physico-chimiques et biologiques de terres contaminées aux HAP et de proposer des solutions pour restaurer le fonctionnement biologique des terres oxydées. Les différentes expérimentations de laboratoire et de terrain ont montré que l'efficacité des réactions d'oxydation chimique (réaction de Fenton et persulfate activé) sur la teneur en HAP dépendait de la disponibilité de la pollution et des propriétés physico-chimiques des terres. Par ailleurs, des processus d'acidification ont été observés sur des terres non carbonatées, altérant fortement et durablement les paramètres physico-chimiques et biologiques. Cette altération était plus forte après utilisation du persulfate activé, engendrant ainsi des pertes en éléments traces métalliques dans les eaux de percolations. L'apport de matériaux susceptibles d'augmenter le pH a permis la restauration des activités biologiques et la capacité des terres à supporter la végétation lorsque les terres ont fortement été acidifiées. L'association de traitements d'oxydation chimique et de refonctionnalisation pourrait présenter un moyen de réhabilitation efficace. Un indice, dont l'objectif était de représenter l'état du sol en fonction du poids accordé à différents paramètres, a été proposé et a permis d'évaluer les variations induites par les traitements d'oxydation et les procédés de refonctionnalisation.

Mots-clés : hydrocarbures aromatiques polycycliques, oxydation chimique, refonctionnalisation, activité biologique, propriétés physico-chimiques

Abstract

In order to clean up polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contaminated soils, various techniques have been developed during the last decades, but their impact on soil functions was rarely considered. The objective of this study was to assess the impact of chemical oxidation treatments on different physico-chemical and biological parameters of PAH contaminated soil and to propose solutions to improve the biological functioning of oxidized soil. Various laboratory and field experiments have shown that the efficiency of chemical oxidation reactions (Fenton reaction and activated persulfate) on PAH concentrations depended on pollutant availability and soil physico-chemical properties. Besides, intense acidification processes have been observed on uncarbonated soil with a strong impact on soil physico-chemical and biological parameters. Moreover, this alteration was higher with activated persulfate treatment, leading to the loss of trace metals in water percolation. In the strongly acidified soil, the input of materials, suitable for pH increase, resulted in the restoration of biological activities and soil capacity to support vegetation. The association of chemical oxidation treatment and restoration techniques could present a good mean for soil rehabilitation. Finally, an index, which aimed to represent soil conditions based on the weight given to different parameters, was proposed and was used to evaluate changes induced by oxidation treatments and restoration techniques.

Key-words: polycyclic aromatic hydrocarbons, chemical oxidation, soil restoration, biological activity, physico-chemical properties