



RE.CO.R.D.

ETUDE N° 00-0405/3A et N° 00-0406/3A

SYNTHESE DE L'ETUDE

FRANÇAIS / ANGLAIS

**EFFETS DU VIEILLISSEMENT SUR LA MOBILITE ET LA
BIODISPONIBILITE DES POLLUANTS ORGANIQUES DANS DES
MATRICES POREUSES TELLES QUE LES SOLS**

janvier 2002

**R. GOURDON - LAEPSI (INSA de LYON)
E. BARRIUSO - INRA GRIGNON**

Sommaire

I- PREAMBULE.....	P. 3
II- INTRODUCTION.....	P. 3
III- PROCEDURES EXPERIMENTALES.....	P. 4
III.1- Caractéristiques des polluants modèles sélectionnés	
III.2- Caractéristiques des sols et fractions de sols utilisés	
III.3- Procédures de vieillissement en conditions abiotiques	
III.4- Procédures de vieillissement en conditions biotiques	
IV- SYNTHESE DES PRINCIPAUX RESULTATS.....	P. 11
IV.1- Vieillissement en conditions abiotiques : Rôle des microstructures	
IV.2- Rôle de l'activité microbienne endogène	
IV.3- Localisation des polluants en fonction du temps de contact	
V- CONCLUSION GENERALE.....	P. 18
VI- PRODUCTION SCIENTIFIQUE ISSUE DU PROGRAMME.....	P. 20

I- PREAMBULE

D'une durée d'environ 3 ans ½(mai 1998 à septembre 2001), le programme a été conduit en collaboration par l'INSA de Lyon et l'INRA de Grignon. Ce rapport final de synthèse a pour objectif de permettre au lecteur d'accéder aux principales procédures expérimentales développées et aux principales conclusions du programme. Les résultats expérimentaux ont été exposés dans le rapport final du programme (septembre 2001), dans les rapports intermédiaires et finals des 3 années d'études et dans les différents rapports académiques (DEA, thèses) ou publications scientifiques issues du programme, dont la liste est fournie à la fin du rapport.

II- INTRODUCTION

Contexte : De nombreux sites pollués par des HAPs existent dans les pays industrialisés. Il s'agit notamment de sites d'anciennes usines à gaz et d'anciennes cokeries. La description du devenir des HAPs dans les sols en fonction du temps de contact, des caractéristiques du milieu et des facteurs climatiques est indispensable pour :

1. évaluer les risques environnementaux dans différents scénarios,
2. prévoir l'efficacité et la durée des traitements notamment biologiques,
3. évaluer les critères d'intervention et les objectifs de traitement des sols pollués.

Les connaissances acquises sur les HAPs dans les sols sont au moins pour partie transposables à d'autres types de polluants organiques hydrophobes et d'autres matrices poreuses.

Objectif : Les objectifs de ce programme étaient de :

- Décrire les principaux mécanismes d'interaction des HAP et des sols, et leur évolution dans le temps sous l'effet de facteurs abiotiques et microbiologiques.
- Evaluer l'effet de ces interactions sur l'extractibilité (qui contrôle la mobilité) et la biodisponibilité des HAPs dans le temps.
- Déterminer le rôle des microstructures des matrices poreuses, de la matière organique endogène et de l'activité microbienne des sols, et la distribution des polluants dans les différents compartiments du milieu poreux en fonction du temps de contact.

Organisation du travail expérimental : L'INSA de Lyon a travaillé sur des HAP légers en conditions abiotiques, et s'est focalisé sur le suivi de la fraction extractible et la caractérisation des microstructures des sols. L'INRA a travaillé en conditions biotiques sur des HAPs plus lourds en utilisant des molécules marquées pour leur suivi analytique dans les différents compartiments du milieu (fractions minéralisée, extractible et non extractible) en fonction du temps de contact.

III- PROCEDURES EXPERIMENTALES

III.1- Caractéristiques des polluants modèles sélectionnés

III.1.1- Caractéristiques physico-chimiques des molécules

Les travaux de l'INSA de Lyon ont été réalisés sur le naphthalène et le phénanthrène (figure 1) qui sont, parmi les molécules de la famille des HAPs, les plus solubles et donc les plus facilement mobilisables dans un sol pollué.

Les molécules sélectionnées pour les travaux à l'INRA couvrent une gamme plus large de molécules de la famille des HAPs : il s'agit du phénanthrène (déjà sélectionné par le LAEPSI), du fluoranthène et du benzo(a)pyrène (voir Fig. 1). L'utilisation d'isotopes radioactifs marqués au ^{14}C facilite d'une part l'étude du comportement à long terme des HAPs moins hydrosolubles que le naphthalène et le phénanthrène et permet, d'autre part, de suivre quantitativement le devenir des polluants : biodégradation, disponibilité vis à vis des micro-organismes du sol et formation de résidus liés.

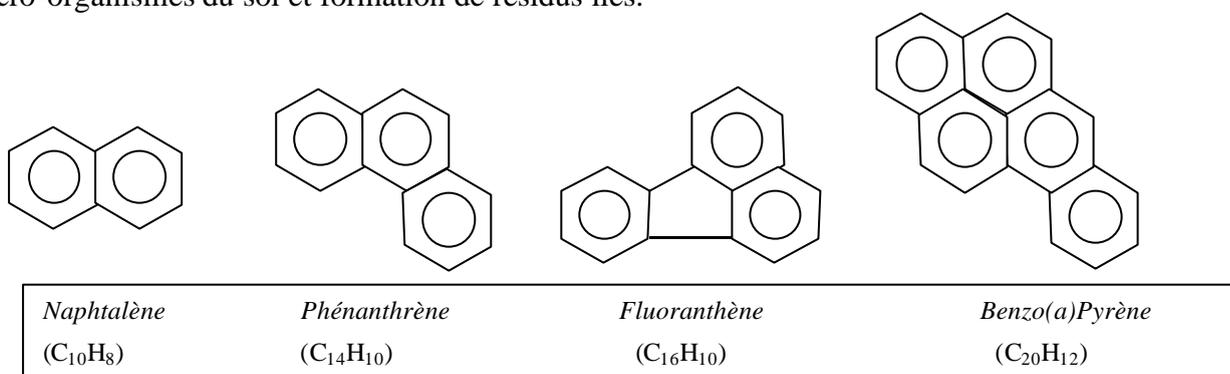


Figure 1 : Structure chimique des 4 HAPs sélectionnés.

III.2- Caractéristiques des sols et fractions de sols utilisés

Plusieurs matrices ont été sélectionnées afin de couvrir une large gamme représentative de différents catégories de sols. La sélection s'est effectuée de manière à travailler sur des matrices ayant une composition et des propriétés physico-chimiques relativement distinctes afin de pouvoir identifier les caractéristiques des sols gouvernant le devenir des polluants organiques dans les sols. Il s'agit des sols et fractions de sols suivants :

- Sable de Fontainebleau (noté **SF**), matrice minérale non poreuse et très peu adsorbante.
- Argile limoneuse Clarsol (notée **ARG**, montmorillonite majoritaire, teneur en carbone organique de 0,7%).
- Craie blanche (notée **CV**), matrice minérale peu poreuse, prélevée sur le site d'une ancienne cokerie dans une zone non polluée (seule la fraction comprise entre 200 et 250 μm a été utilisée).

- Deux sols bruns lessivés limoneux d'origine fluvio-glaciaire, représentatifs de nombreux sols rencontrés en Europe, prélevés sur des parcelles expérimentales de la ferme du lycée agricole de la Côte Saint-André (Isère). Il s'agit du sol **CSAC** sous monoculture de maïs et du sol **CSAP** sous prairie permanente. Ces 2 sols se distinguent essentiellement par leur teneur en carbone organique.
- Deux craies polluées provenant du même site de prélèvement que la craie vierge. Il s'agit d'une craie notée **CP** caractérisée par une pollution relativement uniforme en HAPs et d'une craie notée **CPN** présentant une pollution hétérogène avec des nodules de goudron visibles à l'œil nu.
- Deux sols pollués (notés **SP1** et **SP2**) issus de sites d'anciennes usines à gaz.

Les principales caractéristiques des sols et fractions de sols sont présentés dans les Tableaux 1 à 3.

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques des sols CSAC, CSA et SP1.

	CSAC	CSAP	SP1
Sable grossier (%)	24,1	20,9	33,5
Sable fin (%)	15,7	14,8	15,1
Limon grossier (%)	18,7	19,0	12,9
Limon fin (%)	23,8	23,8	17,4
Argile (%)	17,7	21,5	21,1
Carbone organique (%)	1,49	3,14	9,04
Matière organique (%)	2,6	5,4	15,6
pH eau	7,4	5,5	8,5
KCl	7,0	5,0	8,1
CaCO ₃ (%)	0,2	0,2	32,9
CEC (Cmol/kg)	8,6	12,8	7,3

Tableau 2 : Surfaces et volumes poreux des principales matrices sélectionnées
(*Méthode BET, ** Méthode t ou t-plot)

	Surface porale (m ² .g ⁻¹ matériau sec)		Volume poral (cm ³ .g ⁻¹ matériau sec)	
	Totale* (0,3-100 nm)	Micropores** (0,3-1,7 nm)	Totale (0,3-100 nm)	Micropores** (0,3-1,7 nm)
Argile	130,9	28,4	0,1429	0,0135
Craie	3,5	0,5	0,0082	0,0006
CSAC	10,8	9,3	0,0161	0,0039
CSAP	9,8	4,4	0,0202	0,0019

Tableau 3 : Caractéristiques générales comparées des matrices sélectionnées.

	Caractéristique globale	% C.O.	Nature C.O	Teneur globale en 16 HAPs (mg.kg ⁻¹ sol sec)	Volume poral (cm ³ .g ⁻¹) TOTAL (μpores)
Sable SA	Matrice minérale	0,00	-	--	ND*
Argile ARG	Matrice argilo-limoneuse	0,70	M.O. naturelle	-	0,143 (0,013)
Craie CV	Matrice crayeuse	0,00	-	≈ 0	0,0082 (0,0002)
Craie polluée CP	Matrice crayeuse, pollution uniforme	ND	goudron	257	ND
Craie polluée CPN	Matrice crayeuse polluée, présence de nodules de goudron	ND	goudron	ND	ND
CSAC	Sol non pollué, MOS peu humifiée	1,49	M.O. humifiée	-	0,016(0,004)
CSAP	Sol non pollué, MOS humifiée	3,14	M.O. humifiée + débris végétaux	-	0,020(0,002)
SP1	Sol pollué, pollution homogène	9,04	goudron	2300	ND
SP2	Sol pollué, présence de nodules de goudrons	ND	goudron	2500	ND

ND: Non déterminé.

III.3- Procédures de vieillissement en conditions abiotiques

Deux aspects du vieillissement abiotique ont été étudiés :

- 1- Vieillissement des sols après dopage artificiel en polluant, et effets sur la mobilité du polluant étudié en fonction de l'avancement du vieillissement.
- 2- Vieillissement des sols préalablement au contact avec le polluant, et effets sur leur comportement vis à vis de l'adsorption subséquente du polluant étudié.

Des études en batch et en colonnes ont été réalisées. Le vieillissement a été conduit sur des périodes allant jusqu'à un an. La Figure 2 résume la procédure expérimentale générale des essais en batch.

Les essais en batch sont effectués dans des tubes à centrifuger autoclavés de 26 mL en verre, fermés hermétiquement par des bouchons vissants avec joints en caoutchouc recouverts d'une couche de Téflon[®]. Tous les essais sont menés en triplicats. Le rapport massique entre la phase liquide et la phase solide (L/S) est de 3, soit 6 g sols mis en suspension dans 18 mL d'eau ou de solution aqueuse de polluant à concentration initiale connue. Les suspensions de sol sont agitées à température ambiante par retournements (10 rotations par minute). Après 24 heures d'agitation, les tubes sont soit centrifugés pour faire vieillir le sol en conditions non noyées ou pour réaliser immédiatement des désorptions successives en remplaçant le surnageant par de l'eau, soit stockés verticalement dans une enceinte thermostatée à 20°C à l'abri de la lumière pour le vieillissement en conditions noyées. Les sols sont ainsi vieillis de 24 h à 12 mois en conditions noyées ou non et sous différentes conditions de température (température constante, cycles de gel/dégel).

Après vieillissement, les phases solide et liquide sont séparées par centrifugation. Le surnageant est alors prélevé pour être analysé par HPLC et en déduire par bilan massique les quantités adsorbées. Le surnageant est remplacé par un même volume d'eau afin d'étudier la désorption. On effectue ensuite une seconde, troisième puis quatrième désorption suivant le même protocole (« désorptions 1 à 4») afin d'évaluer l'extractibilité du polluant à l'eau. Après les 4 désorptions successives à l'eau, des extractions par solvant organique ainsi qu'un traitement par sonication sont effectués. L'extraction est réalisée en suivant le même protocole que pour une désorption en phase aqueuse, si ce n'est que le surnageant est remplacé par un même volume de méthanol dans une première étape, puis de butanol-1 sous sonication. Le traitement par ultrasons a pour but de désagréger partiellement le milieu adsorbant. Il consiste à mettre les culots en suspension dans du butanol (ratio L/S de 3), à les sonifier pendant 10 minutes à une puissance de 50 W, à les agiter 24h dans le butanol sur l'éluteur rotatif, puis à renouveler la sonication dans les mêmes conditions. Le traitement ultime, réalisé uniquement sur les échantillons vieillis 1 an, consiste en une extraction soxhlet au CH₂Cl₂ pendant 3 h.

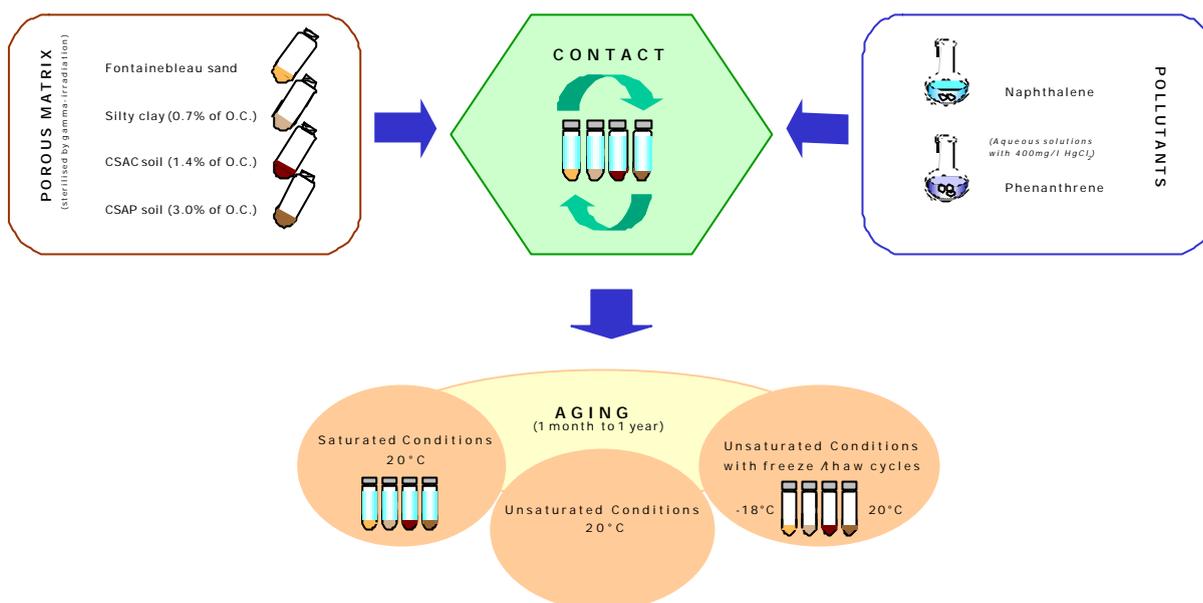


Figure 2 : Protocole général des essais de vieillissement abiotique en batch

III.4- Procédures de vieillissement en conditions biotiques

La figure 3 présente les différentes étapes du protocole général utilisé, avec la mise en place des incubations, la caractérisation de la dynamique des polluants, et l'enchaînement des techniques de caractérisation ci-après décrites.

III.4.1- Modélisation expérimentale du vieillissement - Mise en place des incubations

La simulation du vieillissement au laboratoire se fait à l'aide d'incubations en conditions contrôlées des sols (CSAC, CSAP et SP1) artificiellement pollués avec les HAP marqués au ¹⁴C (PHE, FLT et BaP). L'humidité des échantillons est ajustée à 100 % de la capacité de rétention en eau du sol, à 28°C et à l'obscurité.

Au cours des incubations, l'activité biologique totale et celle qui est spécifiquement impliquée dans la minéralisation (dégradation totale jusqu'à la formation de CO₂) sont évaluées grâce à la mesure du CO₂ total et radioactif dans les pièges de soude introduits dans les dispositifs d'incubation. La mesure de la radioactivité se fait par scintillation en milieu liquide et la quantité totale de CO₂ par colorimétrie en flux continu. Trois répétitions par traitement (sol et polluant) sont sacrifiées après différents temps d'incubation pour évaluer l'extractibilité des résidus de HAP. Les échantillons de sol sont soumis à 3 extractions successives au méthanol. La radioactivité totale extraite est mesurée par comptage en scintillation en milieu liquide. L'analyse des extraits méthanoliques sont concentrés par évaporation sous vide et analysés par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) en phase inverse et double détection barrette de diodes et radioactivité en flux continu. La quantité de résidus des HAP non extractibles est mesurée après combustion.

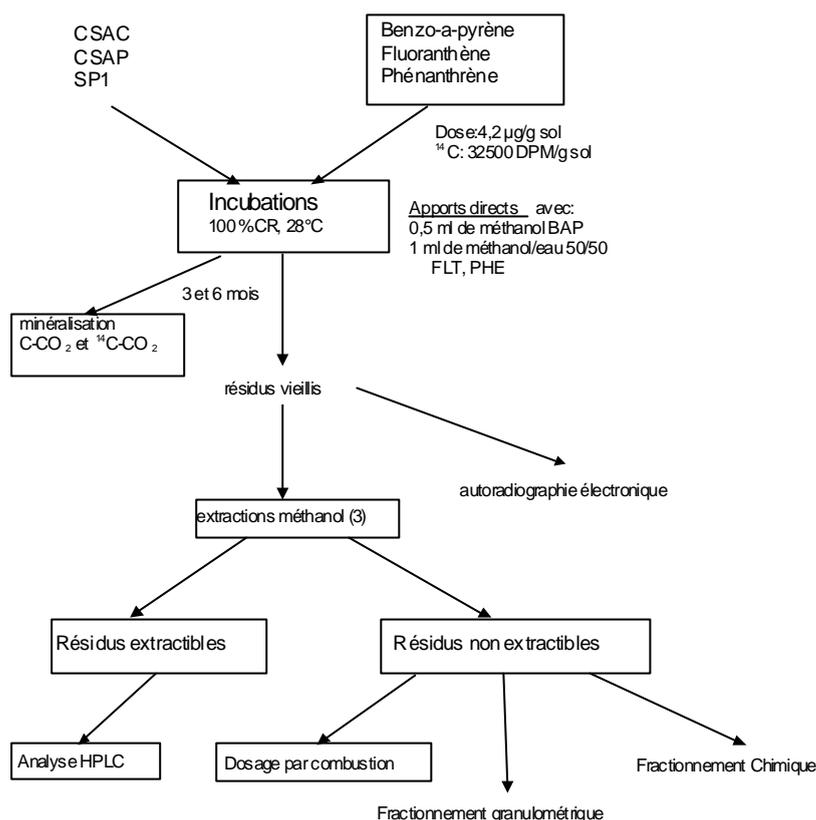


Figure 3 : Protocole général des incubations et du suivi des résidus des polluants.

III.4.2- Localisation des résidus stabilisés sous forme non extractible

III.4.2.1- Localisation spatiale au sein des échantillons

Les résidus issus des incubations sont homogénéisés manuellement. Sur une plaque de verre, une aliquote de sol est étalée de façon à former un pavé carré de 35 mm de côté et d'une épaisseur de 4 mm. La quantification et la répartition des résidus radioactifs provenant des ^{14}C -HAP restant dans les sols est évaluée dans chaque pavé par autoradiographie électronique.

III.4.2.2- Localisation dans des fractions granulométriques des sols

Pour chaque traitement (sol + HAP), les échantillons de sol après extraction contenant les résidus non extractibles marqués au ^{14}C sont mis en suspension dans 100 ml d'eau et fractionnés par tamisage, sédimentation et flottation pour séparer des fractions en fonction de la taille granulométrique : >200 , 200-50, 50-20, 20-5, 5-2 et <0.2 μm . Dans les fractions grossières (>50 μm) la matière organique légère et les débris végétaux libres les moins denses [(>200) μm et $(200-50)$ μm] sont séparés des sables [(>200) μm et $(200-50)$ μm] par flottation. Le carbone organique total des fractions et les résidus de ^{14}C -HAP non extractibles des fractions sont dosés dans toutes les fractions.

III.4.2.3- Localisation dans des fractions "humiques" de la matière organique des sols

Les résidus non extractibles des différents HAP sont fractionnés chimiquement en fonction de leur association aux différentes classes de matière organique du sol séparées en fonction de leur extractibilité dans des solvants alcalins ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ / NaOH 0,1 M) avec obtention des acides humiques et fulviques, solubilisés en milieu alcalin, et de l'humine, fraction de la matière organique des sols non soluble en milieu alcalin. Les acides humiques sont séparés des acides fulviques par précipitation des premiers en milieu acide. La radioactivité associée à chaque fraction est mesurée.

III.4.3- Stabilité chimique des liaisons impliquées dans la stabilisation des résidus vieillis

L'application de techniques hydrolytiques (hydrolyse acides) permet l'hydrolyse des liaisons hétéro-atomiques (type C-O, C-N) provoquant la libération de composés simples, passant en solution ou devenant extractibles avec un solvant organique. Les sols contenant les résidus non extractibles sont soumis à une hydrolyse à reflux avec du HCl 2M. L'extractibilité des résidus non hydrolysables est évaluée par une extraction des culots d'hydrolyse avec du méthanol. La radioactivité des hydrolysats et des extraits méthanoliques est mesurée.

III.4.4- Biodisponibilité des HAP non extractibles dans les résidus vieillis

La stabilisation des résidus de HAP est caractérisée à l'aide d'incubations des sols et des fractions contenant les résidus non extractibles. Pour tester la biodégradabilité de ces résidus, indice de leur biodisponibilité, les échantillons sont incubés dans le sol SP1, sol où nous avons démontré la présence d'une microflore spécifique adaptée à la dégradation des HAP. Les fractions granulométriques contenant les résidus non extractibles de FLT et BaP ont été obtenues par fractionnement des sols incubés pendant 6 mois. Les incubations sont réalisées en microcosme fermé à l'obscurité à 28°C et à une humidité équivalente à 100 % de la capacité de rétention. Au cours des incubations, le $^{14}\text{CO}_2$ provenant de la minéralisation des résidus non extractibles est mesurée par scintillation en milieu liquide.

IV- SYNTHESE DES PRINCIPAUX RESULTATS

La prévision du devenir dans les sols des polluants organiques hydrophobes tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques nécessite de tenir compte de l'ensemble des mécanismes impliqués dans les interactions bio-physico-chimiques entre les polluants et le sol.

Ces interactions sont dynamiques, en ce sens qu'elles évoluent dans le temps sous l'influence de nombreux facteurs, selon des processus conduisant au « vieillissement » du milieu pollué. Certaines interactions sont en effet cinétiquement limitées (diffusion des polluants dans les particules de sols, réactions microbiologiques) et/ou irréversibles (biodégradation, création de liaisons fortes entre les polluants ou leurs produits de dégradation et le sol). La « seule » prise en compte des phénomènes d'adsorption, de convection, de dispersion et de biodégradation qui caractérise la majorité des modèles actuels est donc insuffisante pour décrire le comportement des HAP dans les sols à des horizons de temps de moyen (quelques semaines) et long termes (quelques années). Une meilleure prise en compte des processus d'évolution dans le temps de ces différents phénomènes est indispensable pour gérer les problèmes de pollutions anciennes des sols.

Ce programme de recherche a permis de dégager les principaux mécanismes impliqués dans ces processus de vieillissement. Les principaux points suivants peuvent ainsi être mis en avant :

a) En conditions abiotiques :

- Les résultats confirment que la rétention des polluants organiques hydrophobes dans les sols pollués s'explique essentiellement par des mécanismes d'adsorption des molécules sur la matière organique du sol (MOS) et de partage liquide-solide avec la matière organique xénobiotique (MOX) ou la MOS, ou avec des structures microporeuses minérales (argiles, craie).
- Les phénomènes d'adsorption des HAP à la surface des particules de sol sont très rapides puisqu'un équilibre apparent est atteint en quelques heures dans les essais en milieu dispersé, avec une adsorption quasi instantanée qui affecte généralement plus de la moitié des molécules adsorbées à l'équilibre apparent. A ce stade, la teneur en matière organique du sol est le principal facteur d'influence, l'adsorption étant alors d'autant plus forte que la teneur en matière organique (naturelle et/ou xénobiotique) est forte. Ainsi, les sols riches en humus (sol de prairie CSAP dans cette étude) ou les sols issus de sites pollués et contenant des nodules de goudron ont une très forte capacité de sorption des HAP.
- Après cette étape rapide, une étape de sorption plus lente est observée, dont l'importance relative dans le processus global est d'autant plus grande que la matrice adsorbante (fractions de sols ou sols) est microporeuse, et que la molécule de polluant est petite. Une partie du phénomène global d'adsorption est donc cinétiquement limitée par la diffusion des molécules dans les micro-structures du sol (pores de diamètre inférieur à $2\mu\text{m}$), que celles-ci contiennent ou non de la matière organique, ou dans des phases organiques condensées (humus ou goudron). Ainsi, la sorption du naphthalène par l'argile limoneuse étudiée (matrice essentiellement minérale ayant la plus forte microporosité de toutes celles étudiées dans ce programme, avec plus de $30\text{ m}^2/\text{g}$) est multipliée par un facteur de

l'ordre de 5 lorsque le temps de contact passe de 24 h à 3 mois (pour se stabiliser ensuite, voir Fig. 4). Ce facteur est deux fois moindre pour le phénanthrène, molécule plus grosse que le naphthalène. Le phénomène de sorption lente est considérablement moins important avec la craie, matrice minérale peu microporeuse avec $0,5 \text{ m}^2 / \text{g}$. Il devient même quasi inexistant pour le phénanthrène, dont la taille moléculaire est de l'ordre de grandeur du diamètre moyen des pores de la craie, indiquant une gêne stérique à la diffusion du phénanthrène dans la microporosité de la craie (Fig. 4). Dans le cas des sols agricoles étudiés ici, de microporosité comprise entre 4 et $10 \text{ m}^2 / \text{g}$ environ, l'importance relative de la sorption lente est intermédiaire entre ce qui est observé avec l'argile limoneuse ($30 \text{ m}^2 / \text{g}$) d'une part et la craie ($0,5 \text{ m}^2 / \text{g}$) d'autre part, ce qui confirme l'influence prépondérante de la microporosité. Le phénomène de sorption lente est en outre relativement plus important pour le sol sous culture (CSAC) dont la microporosité ($9,3 \text{ m}^2 / \text{g}$) est double de celle du sol sous prairie CSAP ($4,4 \text{ m}^2 / \text{g}$).

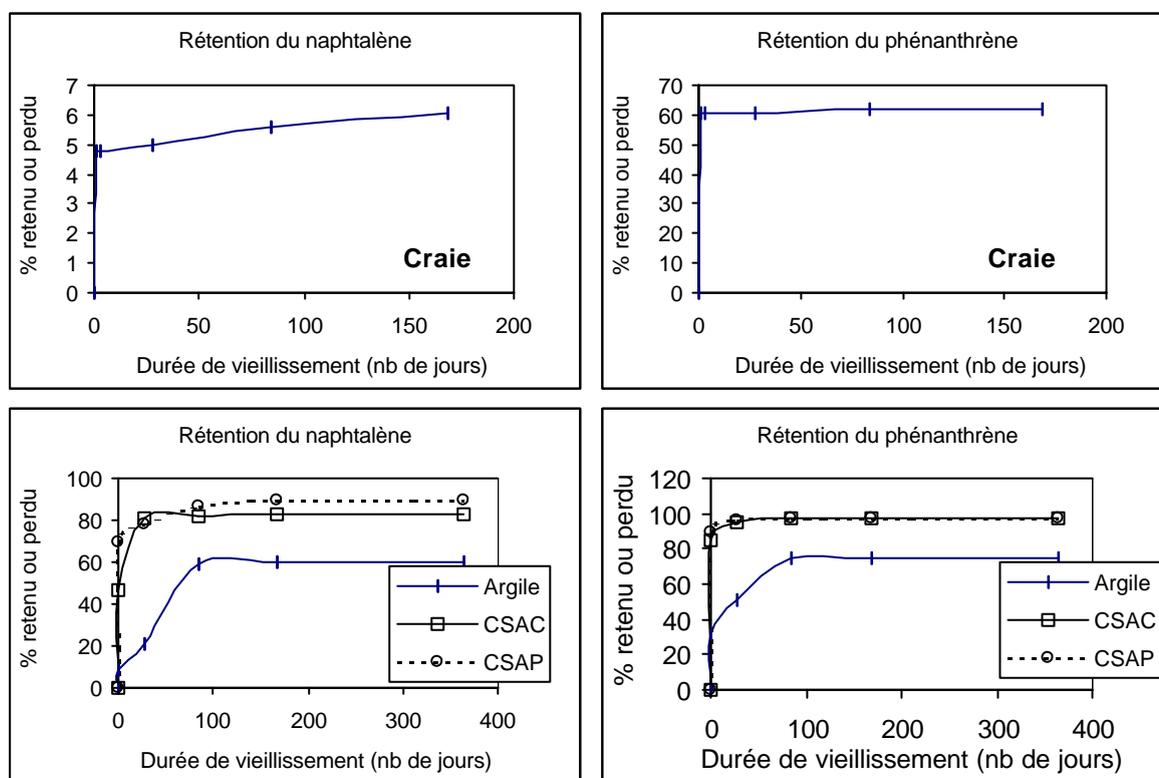


Figure 4 : Cinétiques de sorption du naphthalène et du phénanthrène au cours du vieillissement en conditions saturées en eau à 20°C

- La sorption lente, dont l'effet se stabilise après 3 mois de contact environ dans les conditions abiotiques de vieillissement, entraîne une extractibilité réduite des polluants. En diffusant dans la microporosité ou dans les phases organiques condensées, les molécules de polluant deviennent en effet moins accessibles à l'eau ou aux autres solvants (organiques) d'extraction. Nos résultats montrent que le phénomène est lié à la fois à la microporosité de la matrice et à sa teneur en matière organique. Ainsi, c'est avec le sol CSAC que la réduction de l'extractibilité des polluants pour des temps de contact

croissants est la plus spectaculaire (voir Fig 5). Ce sol, 2 fois moins riche en matière organique que le sol CSAP, adsorbe beaucoup moins les HAP que le sol CSAP en 24 h de contact. Cependant, pour des temps de contact croissants (jusqu'à 3 mois), on observe que la réduction de l'extractibilité du naphthalène est 4 fois plus importante dans le sol CSAC que dans le sol CSAP (Fig. 5). Comme le sol CSAC est 2 fois plus microporeux que le CSAP, on peut conclure que la microporosité joue un rôle important dans le phénomène, car elle accroît la sorption lente comme indiqué plus haut. Cependant, l'argile, pourtant beaucoup plus microporeuse que le sol CSAC, conduit à une réduction d'extractibilité des polluants moindre que le sol CSAC. Ce n'est donc pas seulement la diffusion des polluants dans la microporosité qui explique leur extractibilité réduite, mais bien la diffusion dans une microporosité « interactive », c'est à dire riche en matière organique. Le sol CSAC, à la fois riche en matière organique et relativement microporeux conduit donc à la plus forte séquestration des polluants.

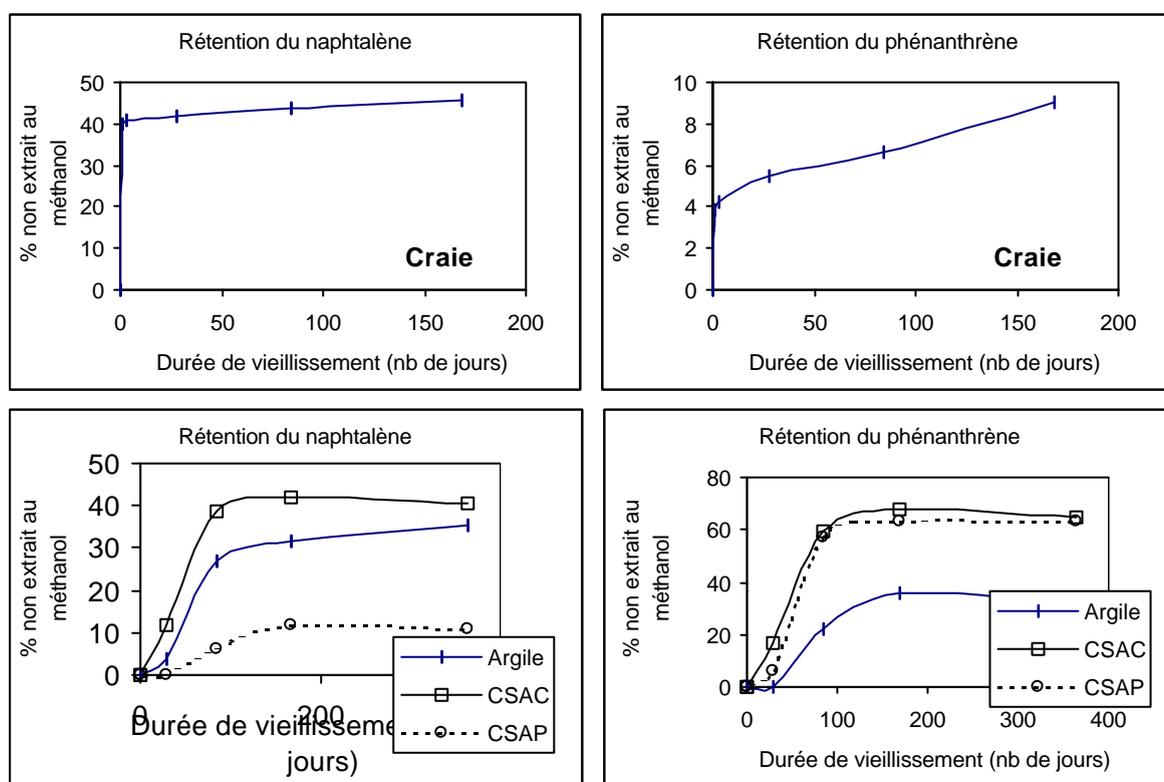


Figure 5 : Effet du vieillissement en conditions noyées à 20°C sur l'extractibilité au méthanol (après 4 désorptions successives dans l'eau) du naphthalène et du phénanthrène adsorbés sur la craie vierge, l'argile limoneuse et les sols CSAC et CSAP.

b) En conditions biotiques :

- Lorsqu'on augmente la concentration de phénanthrène lors des expériences de contamination artificielle des sols, une fraction plus importante de polluant est présente sous une forme plus accessible aux micro-organismes dégradants. Dans le cas des sols CSAC et CSAP, la baisse significative de la fraction extractible, quand le taux de

contamination augmente, indique que la minéralisation du phénanthrène se fait principalement aux dépens de la fraction extractible.

- Le sol pollué d'origine industriel SP1 se comporte différemment des sols CSAC et CSAP. Dans ce sol, le taux de concentration du ^{14}C -phénanthrène appliqué n'a pas d'influence sur ses cinétiques de minéralisation. Ce sol, pollué par des HAP, serait uniformément colonisé par une microflore adaptée à la dégradation de ce type de polluant. La minéralisation des trois HAP est beaucoup plus importante dans le sol pollué SP1. L'augmentation du taux de minéralisation est d'autant plus importante que le HAP est lourd. Ainsi, plus de 10 % du benzo(a)pyrène est minéralisé tandis que dans les sols non-pollués d'origine agricole le taux de minéralisation en fin d'incubation restait autour de 1 %.
- D'autre part, les cinétiques de minéralisation présentent un temps de latence d'autant plus important que le HAP est complexe. Ceci correspond au temps nécessaire aux microorganismes responsables de la dégradation du HAP pour atteindre une taille critique. Une autre explication des temps de latence de minéralisation est l'apparition des phénomènes physico-chimiques de désorption/diffusion limitant la disponibilité des polluants. Dans ces conditions, les phénomènes diffusifs seraient le facteur limitant expliquant le temps de latence de minéralisation, en particulier dans le sol SP1. Ce type de comportement permet aussi d'expliquer pourquoi la minéralisation des HAP est plus importante dans le sol cultivé (CSAC) que dans le sol sous prairie. L'augmentation des teneurs en matière organique dans le sol CSAP favorise la protection par sorption des HAP limitant leur dégradation, ceci couplé à l'absence des microorganismes spécifiques de la dégradation de ces polluants provoque un ralentissement des cinétiques de minéralisation des HAP, malgré une activité biologique globale plus importante que dans le sol sous culture (CSAC).
- L'application du phénanthrène dans une solution méthanolique réduit la fraction minéralisée, en augmentant la fraction de radioactivité extractible au méthanol. La présence d'un solvant polaire aurait pour effet de réduire la biodisponibilité du polluant dans les sols. Ces observations vont dans le sens d'une action protectrice du polluant par une localisation dans des micro-sites peu accessibles par les microorganismes (préservation de phénanthrène non minéralisable) et par le solvant (augmentation des résidus non extractibles). La présence de solvants polaires à grande diffusivité joue un rôle d'"entraîneur" permettant la pénétration des polluants au sein des micro-agrégats ou des colloïdes organiques, et conduisant à sa fixation sur des sites d'adsorption moins accessibles aux micro-organismes. La pollution d'un sol avec des solutions méthanoliques permet de préparer des sols pollués avec une bioaccessibilité du polluant plus réduite que lors la pollution se fait en milieu aqueux.
- La réduction de la minéralisation du phénanthrène en fonction de la durée de contact avec le sol a pour effet d'augmenter la fraction extractible. Il n'y a pas de variation significative du pourcentage de ^{14}C non extractible. Ces observations montrent que la baisse du taux de phénanthrène minéralisé est due à la préservation d'une partie du phénanthrène sous une forme non bioaccessible, mais extractible, donc chimiquement disponible. Elles confirment l'hypothèse que la durée du contact entre le sol et le polluant facilite la « séquestration » du phénanthrène dans la micro-porosité structurale (minérale et/ou organique) diminuant ainsi sa disponibilité.

- La tendance générale est vers une préservation plus importante des résidus des HAP non minéralisables quand la teneur en matière organique des sols augmente. Cette protection se fait aux dépens du compartiment non extractible : plus la teneur en carbone organique du sol augmente plus le rapport [résidus extractibles / résidus non extractibles] est élevé. Autrement dit, la protection des HAP vis-à-vis des microorganismes dégradants fait intervenir la matière organique, mais cette protection ne se fait pas par une immobilisation dans le compartiment des résidus non extractibles, elle se fait probablement par un phénomène de partage qui par la suite peut être déplacé par un partage compétitif entre la matière organique et le solvant lors des processus d'extraction. Ce phénomène est particulièrement important pour le benzo(a)pyrène, le HAP le plus lourd étudié et le plus hydrophobe.
- Dans les extraits issus des incubations des sols avec le fluoranthène, la molécule mère est présente majoritairement, accompagnée des traces d'un métabolite plus polaire. Au contraire, dans les extraits issus des incubations des sols avec du benzo(a)pyrène, la proportion des métabolites est très importante dans les sols d'origine agricole. Les métabolites représentent 60 et 30 % de la radioactivité des extraits du sol CSAP et CSAC respectivement. Tous ces métabolites sont plus polaires que la molécule mère, et ils sont les mêmes dans les deux sols. En revanche, le seul composé détecté dans les extraits du sol pollué SP1 est le benzo(a)pyrène, sans aucune trace des métabolites. Ces observations sont à mettre en relation avec les cinétiques de minéralisation : quand la minéralisation est importante, il n'y a pas d'accumulation de métabolites détectables dans les extraits (cas du phénanthrène) ; tandis que quand la minéralisation est faible, il y a apparition des métabolites. Dans ce dernier cas, il y a une dégradation biologique, mais elle ne va pas jusqu'au stade ultime de la minéralisation, soit parce que le système enzymatique des microorganismes impliqués n'est pas complet, soit parce qu'une stabilisation des métabolites intermédiaires provoque un blocage de la dégradation.
- La micro-localisation des polluants organiques dans les échantillons de sol est hétérogène. Cette hétérogénéité de répartition est étroitement dépendante de la nature du polluant. Plus une molécule est hydrophobe, plus elle sera adsorbée sur le sol, et moins sa distribution sera homogène au sein d'un échantillon de sol. Cette hétérogénéité de répartition est étroitement dépendante de la nature du polluant et se traduit par la formation d'amas avec une localisation ponctuelle à de niveaux de concentration élevée. Ceci a des conséquences sur l'ensemble des phénomènes conditionnant le devenir des polluants. En effet, les gradients de concentration observés au niveau de microsites de stockage peuvent influencer le développement de la microflore dégradante. Cette localisation hétérogène aura des conséquences aussi sur la disponibilité des polluants pour des phénomènes de lixiviation tant naturelle que lors des traitements de dépollution. Pour conclure, la formation d'amas peut être le révélateur macroscopique d'un fonctionnement au niveau moléculaire où la localisation des polluants fait intervenir des interactions entre molécules polluantes, la composante entropique de l'adsorption due à un effet hydrophobe favorisant des « interactions entre molécules » serait prépondérant dans les mécanismes d'adsorption de ce type de molécule.
- Le facteur déterminant la localisation des résidus stabilisés des HAP semble être la teneur en matière organique des sols et des fractions. L'affinité des constituants organiques pour former de résidus stabilisés sous forme non extractible tend à augmenter quand la taille des fractions granulométriques du sol diminue : les fractions les plus riches en résidus non extractibles des HAP sont les fractions contenant de la matière organique fraîche ou peu

transformée (ou des goudrons dans le cas du sol pollué SP1). Mais l'importance relative de chacune des fractions granulométriques dans l'accumulation des résidus non extractibles des HAP est directement fonction de leur importance pondérale : les fractions de la taille des argiles (2-0,2 et >0,2 μm) sont les fractions qui ont la proportion la plus élevée des résidus non extractibles totaux du sol. Dans tous les cas, la matière organique des fractions provenant du sol cultivé CSAC présente la plus grande capacité à former des résidus non extractibles. Pour le phénanthrène, aucune spécificité ne peut être mise en évidence ; néanmoins, on trouve une forte accumulation dans les fractions les plus fines des sols CSAC et SP1. Dans tous les cas, la matière organique des fractions provenant du sol CSAC présente la plus grande capacité à former des résidus non extractibles.

- Pour les trois HAP, la proportion de radioactivité dans la fraction extractible en milieu alcalin est systématiquement plus importante dans les sols d'origine agricole que dans le sol pollué. Dans ce sol, entre 65 et 70 % des résidus non extractibles du phénanthrène et du fluoranthène sont associés à l'humine, tandis que pour le benzo(a)pyrène, ils représentent 92 %. Entre les deux sols non pollués, la proportion de résidus non extractibles pour les 3 HAP est toujours supérieure dans le sol sous culture, ayant une teneur moins importante en matière organique. La quantité de résidus non extractibles associée à l'humine est d'autant plus importante que le HAP est lourd. Dans le sol CSAC, elle est de 1,9 % de l'apport initial pour le phénanthrène, 18,5 % pour le fluoranthène et 33,9 % pour le benzo(a)pyrène. Les quantités de ^{14}C -HAP associées aux acides humiques sont plus importantes dans les sols d'origine agricole que dans le sol pollué. Dans le sol pollué SP1, les résidus non extractibles sont principalement associés à l'humine. Cette fraction représente 62 % et 79 % des résidus non extractibles pour le fluoranthène et le benzo(a)pyrène respectivement.
- La part de résidus non extractibles des ^{14}C -HAP associés aux acides fulviques est faible pour le phénanthrène et le fluoranthène (entre 10 et 18 % des résidus). Cela est encore plus marqué pour le benzo(a)pyrène (entre 3 et 5 % des résidus). Ceci constitue un critère d'évaluation des risques de mobilité des polluants dans le sol associés aux colloïdes organiques, car en effet les acides fulviques représentent les fractions organiques les plus facilement mobilisables. Dans le cas d'un lessivage de ces fractions dans les sols, elles seront des vecteurs de transport des polluants qui lui sont associés. La plus grande proportion des résidus non extractibles des HAP associés aux acides humiques doit être reliée à un caractère hydrophobe plus marqué de ces constituants et à leur caractère colloïdal avec des possibilités de piégeage stérique. Le carbone organique associé aux acides humiques des sols d'origine agricole a une grande capacité à former ou stocker des résidus non extractibles. Cette capacité est plus importante dans le sol CSAC que dans le sol CSAP. Le carbone organique associé aux acides humiques et à l'humine forme d'autant plus de résidus non extractibles que le HAP est lourd.
- L'hydrolyse des liaisons hétéroatomiques facilite l'extraction des résidus des HAP probablement retenus par l'intermédiaire des liaisons du type C-O, mettant en jeu probablement des métabolites hydroxylés des HAP et des composés organiques des sols. La fraction hydrolysée est généralement faible par rapport aux doses initiales : elle est inférieure à 5 % des ^{14}C -HAP apportés initialement. La proportion hydrolysée la plus importante correspond au fluoranthène du sol SP1, dont 8 % de la radioactivité initiale sont hydrolysés. Dans le cas du phénanthrène, la proportion des résidus radioactifs libérés par l'hydrolyse et récupérés dans les hydrolysats varie entre 42 et 60 % des résidus non extractibles. Quel que soit le HAP ou le sol, la quantité de résidus extraits au méthanol

après hydrolyse est plus importante que celle extraite avant hydrolyse. Cela indique que l'hydrolyse acide permet d'hydrolyser des liaisons facilitant une meilleure extractibilité des résidus de HAP. La proportion des résidus non extractibles des HAP formés par l'intermédiaire des liaisons hydrolysables diminue avec la complexité du HAP dans le sens : phénanthrène > fluoranthène > benzo(a)pyrène. Ce type de mécanisme de stabilisation est très important dans le sol pollué SP1 où la totalité des résidus non extractibles du phénanthrène, 50 % de ceux du fluoranthène et 30 % de ceux du benzo(a)pyrène semblent être incorporés par l'intermédiaire de liaisons hydrolysables. La proportion de résidus non hydrolysés extractibles après hydrolyse est plus importante pour les résidus formés dans le sol provenant du site pollué (SP1) que pour ceux qui sont formés dans les sols d'origine agricole (CSAC et CSAP). Elles sont, dans le sol SP1, entre 29 et 100 % et, dans les sols CSAC et CSAP, entre 8 et 41 %.

- Lors des expériences de remobilisation biologique, la minéralisation des résidus non extractibles des sols non fractionnés est en général plus importante que la minéralisation des résidus non extractibles de chacune de leurs fractions. Ce résultat semble indiquer l'absence de phénomènes de protection physique vis-à-vis de la biodégradation. Si cela avait été le cas, la minéralisation aurait été plus importante et plus rapide au niveau des fractions obtenues par désagrégation du sol. Les résidus non extractibles de benzo(a)pyrène des sols agricoles (CSAC et CSAP) et de leurs fractions se dégradent avec une vitesse très lente et constante au cours des incubations. En revanche, les résidus non extractibles de benzo(a)pyrène provenant du sol SP1 présentent une accélération des vitesses de dégradation au-delà de 30 jours d'incubation. Les résidus non extractibles de fluoranthène les moins biodisponibles pour être minéralisés par la microflore du sol SP1 sont ceux associés à la matière organique non humifiée récupérée dans la fraction la plus grossière. Les résidus non extractibles de fluoranthène et de benzo(a)pyrène continuent à être biodisponibles quand ils sont confrontés à une microflore adaptée à la dégradation des HAP. La désagrégation ou un traitement physique dissociant les particules des sols ne semble pas nécessaire pour rendre biodisponibles ces résidus. Leur biodisponibilité semble donc surtout limitée par la présence d'une microflore spécifique.

V- CONCLUSION GENERALE

La prise en compte de l'évolution dans le temps des interactions sols / polluants sous l'influence des facteurs pédo-climatiques est particulièrement nécessaire dans les trois principaux domaines d'application que sont :

- l'évaluation des risques environnementaux dans différents scénarios,
- la prévision de l'efficacité et de la durée des traitements notamment biologiques,
- l'évaluation des critères d'intervention et des objectifs de traitement des sols pollués.

Les résultats de ce programme montrent que la mobilité des polluants apportés dans un sol est considérablement réduite au cours des 3 premiers mois de contact, et ce d'autant plus que le sol est microporeux et riche en matière organique. Les polluants (notamment les petites molécules) diffusent dans la microporosité des particules de sol ou dans des phases organiques condensées (composés humiques, goudrons) et deviennent ainsi plus difficilement accessibles à l'eau, aux solvants organiques, et aux micro-organismes. Pour les molécules plus grosse et donc plus hydrophobe, des liaisons de forte énergie, éventuellement covalentes, peuvent être créées avec les composés organiques des sols en présence d'une activité microbienne, tendant à réduire encore la mobilité des polluants avec le temps. Des résidus de polluants « non extractibles » se créent ainsi progressivement.

L'ensemble de ces processus cinétiquement limités et/ou irréversibles tend ainsi à réduire relativement rapidement la mobilité des molécules d'HAP dans des sols organiques ou des riches en particules microporeuses (comme les argiles). On peut donc s'attendre à une réduction progressive des risques environnementaux présentés par ces sols pollués, dans la mesure bien évidemment où les conditions du « scénario » considéré ne sont pas affectées : pas de nouveaux apports en polluants réalisés (fuites de réservoirs ou de fûts enterrés, mélange de terres fortement polluées et/ou de goudrons, etc...), et pas non plus de modifications des conditions d'accès des populations au site et d'écoulement des eaux de surface et souterraines. La réduction de mobilité des HAP est d'autant plus importante que le sol est riche en matière organique (et microporeux). Ceci explique le rôle de l'apport de matière organique exogène (de type compost, etc...) pratiqué pour le traitement de certains sols, qui « stabilise » les polluants davantage qu'il ne stimule leur biodégradation.

Cependant, ces résidus non extractibles (ou « résidus liés ») continuent à être biodisponibles quand ils sont confrontés à une microflore adaptée à la dégradation des HAP. Les vitesses et les taux de dégradation de ces résidus sont inférieurs à ceux des HAP fraîchement introduits, mais ils sont loin d'être nuls. La désagrégation ou un traitement physique dissociant les particules des sols ne semble pas nécessaire pour rendre biodisponibles ces résidus. Leur biodisponibilité semble donc surtout limitée par la présence d'une microflore spécifique. Ainsi, il est possible qu'une activité microbienne intense, liée à la mise en œuvre d'un traitement biologique du sol, ou à des modifications du scénario (aération du sol lors d'une excavation, reverdissement du site, etc...) entraîne la biodégradation ou la remobilisation partielle ou totale d'une partie des résidus liés.

L'analyse chimique « classique » de sols pollués contenant de tels « résidus liés » (sols pollués riches en matière organique et microporeux) peut sous-estimer fortement la teneur

réelle en HAP du fait que ceux-ci sont très peu extractibles. Dans de tels cas, l'établissement de critères d'intervention et/ou d'objectifs de traitement doit prendre en compte les risques de mobilisation de ces résidus sous l'effet notamment d'une activité biologique. Les résultats obtenus dans ce programme ne sont pas suffisamment avancés pour permettre de se prononcer clairement sur le sujet. Des travaux de recherche complémentaires s'avèrent encore nécessaires.

VI- PRODUCTION SCIENTIFIQUE ISSUE DU PROGRAMME

- Bayard R., Barna L. & Gourdon R. (1998) Influence of organic pollutants on the sorption of naphthalene in soils. *Sixth International FZK.TNO Conference on Contaminated Soil, "Consoil 98"*, Edinburgh, Ecosse, 17-21 Mai 1998, Thomas Telford Publishing Ltd, Vol 2, 849-850
- Bayard R., Barna L., Mahjoub B. & Gourdon R. (1998) Investigation of naphthalene sorption in soils and soil fractions using batch and column assays. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17 (12), 2383-2390.
- Mahjoub B. & Gourdon R. (1999) Effects of aging on the mobility of PAHs in soils. *5th international in-situ and on-site bioremediation symposium*, San Diego, Californie, 19-22 avril 1999, A. Leeson et B.C. Alleman Eds., Battelle Press, 235-240
- Borhane Mahjoub (Thèse soutenue le 29-9-99) Comportement dans le sol de polluants aromatiques issus du goudron de houille. N° 99 ISAL0071, 262 pages.
- Mahjoub B., Jayr E., Bayard R. & Gourdon R. (2000) Phase partition of organic pollutants between coal tar and water. *Water Res.*, **34** (14), 3551-3560.

(D'autres publications sont en préparation)

Summary of objectives and major results :

The fate of organic contaminants such as PAHs in soils is determined by numerous reactions and interactions of physico-chemical and biological natures. The evolution in time of these interactions under the effect of various factors is usually referred to as ageing. The influence of ageing phenomena must be taken into account in a number of fields of application including : (1) environmental risk assessment, (2) prediction of (biological) treatment efficiency, and (3) evaluation of soil cleanup criteria and standards.

The present program focused on the mechanisms of ageing of PAHs in soils under both abiotic and biological conditions. The basic objective was to investigate the effects of micro (nano) porosity and microbial activity of soils in the ageing process. Various soils and soil fractions (sand, silty clay and chalk) were studied, including soils sampled from industrially contaminated sites. Naphthalene, phenanthrene, fluoranthene and benzo(a)pyrene were selected as target contaminants. Soil-contaminant contact times of up to one year were monitored. The fate of PAHs was determined using classical chemical extraction procedures and ¹⁴C-labelled molecules.

Under abiotic conditions, results firstly confirm that surface sorption phenomena onto soil particles are very rapid. The rapid surface sorption increases with the organic matter content of the sorbent. After the rapid phase, a kinetically-limited sorption phase is observed, whose effect is increased when the microporosity of the sorbent increases and the molecular size of the contaminants decreases, indicating that the molecular diffusion into the the sorbent microporosity is the limiting factor. For silty clay as an example, sorption is increased 5 fold when the contact time is increased from 1 to 90 days. For chalk (carbonaceous structure), the small average size of the pores allows the diffusion of naphthalene but limits that of phenanthrene due to sterical hindrance. For organic soils, the diffusion increases with the degree of humication of the organic matter, because humus is a more porous structure than fresh organic debris. For all sorbents, the kinetically-limited sorption phases is observed over about 3 months of contact. Afterwards, sorption seems to stabilize. The extractibility of the sorbed contaminants is also strongly reduced due to the fact that the contaminants become less accessible to the extraction solvents. However, the reduced extractibility is much less significant for mineral sorbents as compared to organic sorbents, indicating that the phenomenon is related to the diffusion of the contaminants into interactive micropores where organic matter is present.

Under biological conditions, the diffusion of the contaminants into the soil microporosity reduces the bioavailability of the molecules and thereby reduced kinetics of biodegradation are observed. This phenomenon is increased when the soil organic matter content is high. However in that case, the poorly bio-available contaminants appear to remain extractible using organic solvents. The formation of « bound » (i.e. non extractible) residues is significantly increased in the presence of highly humified organic matter and when the particle size of the sorbent is small. A strong proportion of the bound residues is produced by

formation of hydrolysable bounds such as C-O bounds, probably via the intermediate formation of hydroxylated metabolites which are more reactive than the initial PAHs molecules. The significance of this mechanism is higher for the most simple PAH molecules such as phenanthrene, and much smaller for the heavier, less biodegradable molecules such as benzo(a)pyrene. The bound residues appear to remain bio-available when the sorbent is incubated in the presence of an adapted PAHs-degrading microflora. Finally, the distribution of the PAHs molecules in spiked soils is not uniform at the microscopic level, especially for the heavier, most hydrophobic molecules which readily adsorb on the surface of the particles and diffuse much less into the particles than the smaller molecules. This micro-heterogeneity may have a significant influence on the local development of the microbial ecosystem, due to the presence of concentration gradients.